

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06697

研究課題名(和文)由来の異なる筋肉と腱はいかにして出会うのか

研究課題名(英文)how skeletal muscles find correct tendons to connect during embryogenesis

研究代表者

乾 雅史 (Inui, Masafumi)

明治大学・農学部・専任准教授

研究者番号：20643498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は脊椎動物ではほとんど明らかになっていない、腱から骨格筋への情報伝達による筋配向制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのために、発生中の胚から腱を除去するアプローチで腱から骨格筋への情報伝達の重要性を示した。またその際に発現変動する遺伝子群から筋腱結合を制御する因子の同定を試みた。本研究の結果から、筋腱境界領域に発現し、結合形成に關与する可能性のある20以上の遺伝子群を同定し、またiGonad法を用いた遺伝子ノックダウンから筋腱結合を制御する分泌遺伝子ファミリーを1つ同定した。本研究の結果から、発生中の胚の筋腱相互作用について多数の新たな知見が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、哺乳類の全身に多数存在する骨格筋が間違いなく正しい腱・骨と結合するメカニズムの一端を明らかにすることができた。この成果は生物の複雑な形態形成を理解するという基礎研究としての意義があるだけでなく、将来的には骨格筋や腱の再生医療に際し、より効率よく・正しい形態で再生組織を形成するための重要な情報を提供する基盤となる研究であり、基礎研究・応用研究両面から意義のあるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to shed light on to the mechanisms underlie the muscle - tendon connection formation during embryonic development in mammal. We have generated the mouse in which tendon progenitor cells were reduced from the embryo, and showed their essential role in muscle patterning. By analyzing gene expression in this mouse, we have identified more than 20 genes that are expressed in muscle-tendon interface in the embryo. Moreover, gene knockdown using iGonad method revealed that loss of function of multiple ligands of a particular signaling pathway (anonymized here) affected the patterning of hind limb muscles. In sum, substantial progress was made through this study to understand the molecular mechanism for muscle-tendon interaction during embryonic development.

研究分野：発生生物学

キーワード：骨格筋 腱 軟骨 発生 Scleraxis

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の身体運動は骨格筋（以下「筋肉」）で生じる張力が腱靭帯を通じて骨格に伝わることで起こる。複雑な身体運動を実現するためには発生中に全身の 200 以上の骨と 600 以上の筋肉が適切な位置および形態で筋-腱-骨結合を形成しなくてはならないが、そのメカニズムはほとんど分かっていなかった (1)。例えば四肢に存在する多数の筋-腱結合が再現性よく形成されることは、この二つの組織の発生の由来が全く異なること（四肢の筋肉は体節由来、腱は側板中胚葉由来）、近傍に多数の筋-腱結合が存在すること（四肢には狭い範囲に 10 以上の筋肉が存在）を考えると驚くべきことである。筋前駆細胞は体節で形成された後に HGF などの分泌因子によって四肢への移動が誘導されることが知られているが (2)、上記のような多数かつ複雑な組織間の結合を保障するためには、長距離に働く因子の誘導のみでは不十分であり、結合がおこる局所において筋相互のシグナル伝達による制御が不可欠であると考えられた。研究開始当初までに筋から腱への分化誘導シグナルとして TGF β が同定されていたが (3)、脊椎動物において腱から筋への情報伝達は報告がなかった。

2. 研究の目的

本研究は脊椎動物ではほとんど明らかになっていない腱から筋への情報伝達による筋配向制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。そのために、発生中の胚から腱を除去するというシンプルなアプローチで腱から筋への情報伝達の重要性を示し、遺伝子発現解析と高効率ノックアウトマウス作製によりその情報を担う分子を同定することとした。研究開始時点までに腱特異的 Cre 発現マウス (ScxCreL-Tg) と Cre 依存的細胞死誘導マウス (Rosa26LSLDTA) を掛け合わせ (以後 Scx-DTA マウスと称する)、腱細胞特異的に細胞死を導き腱組織の減少に伴う筋配向の変化を観察していた。また、変化した筋配向は腱組織が残存する関節に向く傾向があることから、腱から筋へ誘導因子が分泌されていることが示唆された。Scx-DTA マウスでは筋前駆細胞の体節から四肢への移動は正常に起こっていることから、上記の結果は筋肉の「体節から四肢への移動」と「四肢での正しい配向・腱-骨との結合」は独立した別個のステップであること、そして後者にはローカルな筋腱相互作用が必要なことを示唆していた。しかし、筋腱相互作用が起こる時期や、それを担う分子の実体、相互作用が阻害された Scx-DTA マウスで起こる細胞・組織レベルでの応答には不明な点が多かったため、本研究ではこれらの不明点を明らかにするために以下のような実験を行なった。

3. 研究の方法

(1) Scx-DTA マウスの筋肉配向の解析

Scx-DTA マウスにおける骨格筋パターンニング変化が時期的・分化段階的にいつから起こるのか、時系列を追って whole mount in situ hybridization (WISH) 法で検証した。E11.5-14.5 の野生型および Scx-DTA マウス胚に対し、Pax3, myog, myh3 の RNA probe および MHC の抗体により筋芽細胞・筋繊維の位置を可視化した。

(2) Scx-DTA マウスの遺伝子発現解析

骨格筋と腱の相互作用を担う分子を同定するため、E13.5 の Scx-DTA マウス胚とコントロールマウス胚の肢芽の網羅的な発現比較解析を行った。遺伝型ごとに 3 匹ずつの胚から肢芽の zeugopod/stylopod 領域を単離、total RNA を抽出し、RNAseq 解析を行なった。遺伝型間で 1.5 倍以上の発現量の増減および統計的に優位 (FDR < 0.05) な発現変動を示す遺伝子群をリスト化し、Gene Ontology 解析を行った。

(3) Scx-DTA マウスの発現変動遺伝子の空間的発現解析

項目(2)で見出された Scx-DTA マウスにおいて発現が減少する遺伝子のうち、空間的発現パターンが不明であった遺伝子について WISH による発現解析を行った。E12.5-14.5 の野生型マウス胚に対し上記遺伝子群の RNA probe を用いて、筋腱結合が形成される時期の空間的な発現パターンを可視化した。

(4) Scx-DTA マウスの発現変動遺伝子の機能解析

項目(2)で見出された Scx-DTA マウスにおいて発現が減少する遺伝子のうち、細胞外に分泌され細胞間相互作用に関わることが予想された遺伝子群について、i-GONAD 法を用いてノックダウン胚を作成し、E14.5 で骨格筋のパターンニングを myh3 の WISH によって可視化した。ノックダウンにあたっては、ノックアウト系統の樹立ではなく遺伝子改変を行なった当代 (F0) の胚の解析を行う必要から、一つの遺伝子について 2-3 箇所の guideRNA を設計・同時に作用させることで、ノックダウン効率の向上を行った。また、F0 解析の利点を生かし、複数のファミリー遺伝子の同時ノックダウンを行った。

4. 研究成果

(1) Scx-DTA マウスの筋肉配向の解析

Scx-DTA マウスでは E11.5 での Pax3 や E12.5 での myog の発現パターンに変化がなかったため、肢芽への移動や初期の分離に異常はないことが明らかとなった。一方で E13.5 の myh3 の発現パターンや E14.5 の MHC の染色パターンにはコントロールとの明確な差異が認められたため、Scx 細胞系譜は E13.5 以降の筋繊維のパターニングに必要であることが明らかとなった。

(2) Scx-DTA マウスの遺伝子発現解析

Scx-DTA マウスにおいてコントロールより有意に発現が高い遺伝子が 666、有意に発現が低い遺伝子が 151 同定された。有意に低発現だった 151 遺伝子について Gene Ontology 解析を行ったところ、Scx-DTA マウスにおいて組織の減少が見られた腱や軟骨などの関連遺伝子の enrich が見られ解析の妥当性が示された。また、細胞外マトリクスや BMP シグナルに関与する遺伝子の enrich も見られたため、これらの因子が腱や軟骨細胞、あるいは骨格筋と腱の相互作用に関与する可能性が示唆された。

(3) Scx-DTA マウスの発現変動遺伝子の空間的発現解析

本研究期間中に 45 の遺伝子について発現パターンを検証し、腱に発現のあるものを 20、筋腱境界に発現のあるものを 7 つ同定した (図 1)。これらの中には他グループの報告から腱靭帯での発現や機能が推測されるものや全く新規のものが含まれ、今後の腱・筋腱境界の形成過程の理解の基盤となる結果である。

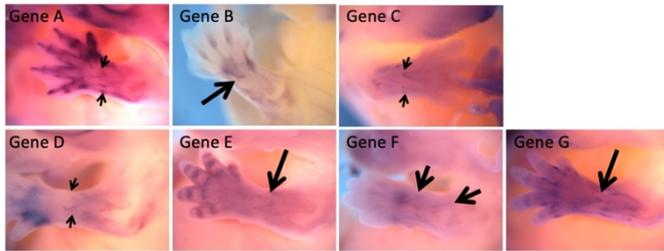


図1 筋腱境界で発現が確認された遺伝子

(4) Scx-DTA マウスの発現変動遺伝子の機能解析

本研究期間中に 2 つのシグナル伝達因子ファミリー、6 遺伝子についてノックダウンを行った。その過程で、一度のノックダウン (iGONAD 法) にて 8 種類の異なる crRNA を同時に用いても十分な活性を示すこと、ただし用いる crRNA が高濃度になると得られる胚の数が減少することを見出した。また、検証した二つの 2 つのシグナル伝達因子ファミリーの内の一方の 3 遺伝子を同時にノックダウンすると、後肢の一部の骨格筋のパターニングが変化することを見出した (図 2)。この表現型は Scx-DTA に比べマイルドなものであったことから、筋腱の相互作用にはこのファミリーを含む複数のシグナル伝達が関与する可能性が示唆された。

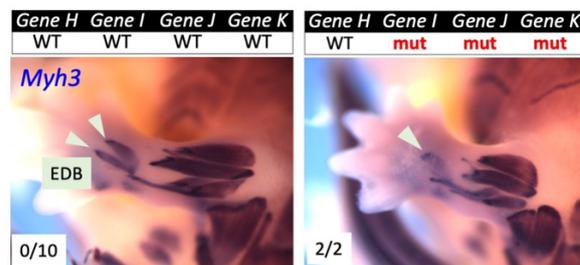


図2 候補遺伝子ノックダウン胚の後肢筋肉パターン変化

<引用文献>

- Schweitzer, R., Zelzer, E., and Volk, T. (2010). Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development* 137, 2807–2817.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A., and Birchmeier, C. (1995). Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768–771.
- Pryce, B.A., Watson, S.S., Murchison, N.D., Staverosky, J.A., Dunker, N., and Schweitzer, R. (2009). Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFβ signaling are essential for tendon formation. *Development* 136, 1351–1361.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fukunaga Kanako, Tanji Masafumi, Hanzawa Nana, Kuroda Hiroki, Inui Masafumi	4. 巻 27
2. 論文標題 Protocadherin-1 is expressed in the notochord of mouse embryo but is dispensable for its formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101047 ~ 101047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saotome Hideka, Ito Atsumi, Kubo Atsushi, Inui Masafumi	4. 巻 21
2. 論文標題 Generation of a Quantitative Luciferase Reporter for Sox9 SUMOylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1274 ~ 1274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21041274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 乾 雅史
2. 発表標題 腱細胞による骨格筋の正確な配向の制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾野雄大、乾雅史
2. 発表標題 腱細胞から分泌される筋配向制御因子の探索
3. 学会等名 第7回日本筋学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yudai Ono, Tempei Sato, Hiroshi Asahara, Masafumi Inui
2. 発表標題 Scx positive tendon cells are required for correct muscle patterning in mammalian embryo
3. 学会等名 Society of Muscle Biology, Frontiers in Myogenesis meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾野雄大、乾雅史
2. 発表標題 腱細胞から分泌される筋配向制御因子の探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乾 雅史
2. 発表標題 Scleraxis-lineage cells are required for correct muscle patterning
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------