

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09482

研究課題名(和文) 肩腱板entheses再生のためのSox9/Scx標的遺伝子検索と機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Sox9/Scx-target genes for regeneration of shoulder rotator cuff entheses

研究代表者

前田 真吾 (Maeda, Shingo)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：60353463

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)：本研究目的は、Sox9とScxが協調的に誘導する標的遺伝子を同定し、entheses再生における役割を解析する事である。Sox9/Scxそれぞれの発現アデノウイルスを作製し、初代マウス間葉系幹細胞に感染させた後のmRNAサンプルを用いてRNAシーケンス解析を施行した。Sox9とScxを同時に加えた時に2倍以上の発現増加がある遺伝子224個を得た。Gene Ontology解析すると、オプソニン化、カルシウム・シグナル、骨格筋収縮、炎症反応、骨リモデリング制御、アクチン制御などに関わる遺伝子群が増えており、パスウェイ解析では、補体凝固経路、神経活性化経路、アクチン骨格制御経路などが動いていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sox9とScxが間葉系幹細胞において協調的に誘導する遺伝子群が、オプソニン化、カルシウム・シグナル、骨格筋収縮、炎症反応、骨リモデリング制御、アクチン制御などに関わる事が示唆された。これらは、補体凝固経路、神経活性化経路、アクチン骨格制御経路などの制御に関わると予想され、既存のentheses形成の概念からは大きく乖離した部分も大きい。興味深いのは補体活性化経路であり、無菌的な環境下でSox9とScxがなぜこれを誘導するのか、補体の新たな機能を解明するきっかけにもなるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to identify the genes which were cooperatively induced by Sox9 and Scleraxis (Scx) transcription factors, and analyze the functions in regeneration of entheses. We generated adenovirus vectors that express Sox9 or Scx, then infected them into primary mouse mesenchymal stem cells. The cells were subjected to mRNA purification and direct RNA sequence analysis. Total of 224 genes with Entrez gene ID, which expression was increased by twice upon combined infection of adenoviruses expressing Sox9 and Scx, were identified. The following gene ontologies were affected; opsonization, complement activation, calcium-mediated signaling, skeletal muscle contraction, steroid metabolic process, inflammatory response, regulation of bone remodeling, and sequestering of actin monomers. KEGG pathway analysis revealed that, complement and coagulation cascades, neuroactive ligand-receptor interaction, and regulation of actin cytoskeleton were affected.

研究分野：骨軟骨代謝学

キーワード：entheses Sox9 Scx

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肩腱板の変性と断裂は、肩関節の堪え難い疼痛と機能障害を来す頻度の高い病変である。腱板の full-thickness tear に対する外科的修復術は、報告によっては 94%にも上るほど高い再断裂率が、大きな課題として横たわっている(Galatz LM, *et al.*, *J Bone Joint Surg Am*, 2004)。ほとんどの腱板断裂は、腱-骨移行部、すなわち enthesis で起きる。Enthesis は発生・発育期に 4 つの組織成分[線維性腱部-非石灰化線維軟骨部-石灰化線維軟骨部-骨性部]を構成して骨に連結する。この複雑・巧妙な 4 層構造が、筋のダイナミックな牽引力を静的な骨に破綻なく伝えるのに必須である。一旦成熟した enthesis の損傷はこの 4 層構造が再生されず、瘢痕組織が占めるのみで、従って力学的に脆弱で、高い再断裂率の主な理由がここにある。したがって、4 層構造を伴った enthesis の再生を得なければ、機能的な腱板治癒は得られないので、それを再現する分子生物学が求められる。Enthesis 形成を誘導する分子は、transforming growth factor (TGF)- β であり、このシグナルによって、軟骨分化マスター転写因子 Sox9 と腱・靭帯分化マスター転写因子 Scleraxis (Scx)の両者が共発現する、軟骨・腱ハイブリッド表現型ポテンシャルをもった特異的な細胞集団隆起(eminence)が enthesis の原基を形成する。この eminence はさらに骨形成タンパク(BMP)シグナルが加わる事で線維軟骨に分化・成長し、BMP はインディアン・ヘッジホグと共に基質石灰化を誘導し、4 層構造を成す機能的な enthesis が完成する(Blitz E, *et al.*, *Development*, 2013; Schwartz AG, *et al.*, *Development*, 2015)。本研究の学術的問いは、損傷腱板の enthesis 再生において、その細胞主役と考えられている間葉系幹細胞(MSC)が、TGF- β シグナルを介して Sox9+/Scx+ status の細胞に分化する意義、すなわちこれら転写因子の標的遺伝子は何か?である。この二者が協調して誘導する enthesis 特異的な実働遺伝子がある可能性があり、これを人為的に修復腱板に導入すれば、広い生理活性を有する故に side-effect も懸念される TGF- β と BMP を加えずに、ピンポイントで enthesis の 4 層構造を伴った修復を得る再生医療に繋がるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究目的は、Sox9 と Scx が協調的に誘導する標的遺伝子を同定し、その機能、すなわち enthesis 再生における役割を解析する事である。

腱板修復にサイトカインを導入する研究は、現時点で TGF- β や BMPをはじめ、PDGF- β 、IGF-1、FGF、VEGF などについてあり、これらを含む platelet-rich plasma (PRP)、そして組織リモデリング促進に対して MMP やアポトーシスの役割も検討されているが、いずれも有意義な改善効果は報告されていない。本研究は、腱板修復には enthesis 再生が不可欠である事、enthesis 形成には Sox9+/Scx+ status の細胞が重要である事に立脚し、Sox9 と Scx が協調的に誘導する未知の enthesis マスター因子と呼ぶべき特異的遺伝子を同定し、これを治療分子標的として機能評価する事をコンセプトとしている。

3. 研究の方法

マウス MSC における Sox9/Scx の標的遺伝子の検索

Enthesis 修復において MSC はその細胞性ソースの主役であり、術中のドリリング等により骨髄から遊走する MSCに加えて、腱自体にも MSC が存在するので(Campbell TM, *et al.*, *J Shoulder*

Elbow Surg, 2019)、マウス腱板断裂(損傷)修復モデルにおける enthesis 再生実験を想定し、マウス MSC を本研究に使う細胞の軸に選定した。重要な事は、必ずしも発現増加する促進因子のみではなく、enthesis 抑制因子が減少する可能性もある事に留意した。

Sox9 と Scx の過剰発現には動物実験を見据えてアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いたが、その血清型は骨、軟骨、筋への誘導が報告されている 6 型(AAV6)を選択した。AAV で十分な過剰発現効果が得られない場合は、アデノウイルス発現系などへの変更を考慮した。十分な過剰発現が得られた MSC サンプルから mRNA を抽出し、RNA シークエンス解析を施行した。

In vivo における候補因子発現確認

上記解析から得られた候補遺伝子またはそのコード蛋白について、腱板再生動物モデルにおける発現を確認することを計画した。マウスまたはラット肩腱板 enthesis 部にドリリングまたは needle-punch 法で擬似腱板再生状態を作り、その場所における遺伝子発現 (*in situ* hybridization 法)または蛋白発現(免疫組織化学染色)を評価することとした。

4. 研究成果

まず内因性のSox9とScxを同時に発現誘導できるより強力な因子の検索を行った。モデル細胞はマウスMSC、ATDC5細胞、そしてC3H/10T1/2細胞など、軟骨細胞腱細胞両分化ポテンシャルを持つものを用いた。Enthesis再生にTGF- とBMP (共にTGF- ファミリー分子群)の必要性が報告されているので、商品ベースで購入可能な各種TGF- ファミリー・リガンド(TGF- 1, TGF- 2, TGF- 3, myostatin, activin A, BMP-2, BMP-3, BMP-6, BMP-9, BMP-10, BMP-14, GDF-3, GDF-6, GDF-7, GDF-9, GDF-15, nodal, inhibin A, Lefty A)をそれぞれ添加して、Sox9とScxの発現増加率をRT-qPCRで評価した。その結果、TGF- 1, TGF- 2, myostatin, activin A にSox9/Scx double positive状態を誘導する能力が高いことが分かった。

Sox9とScxのAAVシステムを構築し、AAVの初代マウスMSCへの導入を行ったが、内因性同遺伝子に対して10倍以下の弱い発現レベルしか得られなかったため、一過性であるが強い感染効率を得られるアデノウイルスシステムに変更した。Sox9、Scxそれぞれの発現アデノウイルスは、m.o.i.=300でそれぞれ内因性遺伝子発現レベルの20倍以上と170倍以上の強制発現レベルを示した。このサンプルを用いてRNAシークエンス解析を施行した結果、Sox9とScxを同時に加えた時

に2倍以上の発現増加がある遺伝子のうち、Entrez Gene IDが付与されているものが224個同定された。これをGene Ontology解析すると、オプソニン化、カルシウム・シグナル、骨格筋収縮、炎症反応、骨リモデリング制御、アクチン制御などに関わる遺伝子群が

表1: Gene Ontology解析

GOTERM_BP_DIRECT GO:1903028	positive regulation of opsonization
GOTERM_BP_DIRECT GO:0050848	regulation of calcium-mediated signaling
GOTERM_BP_DIRECT GO:0006956	complement activation
GOTERM_BP_DIRECT GO:0003009	skeletal muscle
GOTERM_BP_DIRECT GO:0008202	steroid metabolic
GOTERM_BP_DIRECT GO:0002017	regulation of blood volume by renal aldosterone
GOTERM_BP_DIRECT GO:0032354	response to follicle-stimulating
GOTERM_BP_DIRECT GO:0050727	regulation of inflammatory response
GOTERM_BP_DIRECT GO:0007165	signal transduction
GOTERM_BP_DIRECT GO:0021516	dorsal spinal cord development
GOTERM_BP_DIRECT GO:0007565	female pregnancy
GOTERM_BP_DIRECT GO:0030317	flagellated sperm motility
GOTERM_BP_DIRECT GO:0031640	killing of cells of other organism
GOTERM_BP_DIRECT GO:0046850	regulation of bone remodeling
GOTERM_BP_DIRECT GO:0003376	sphingosine-1-phosphate signaling pathway
GOTERM_BP_DIRECT GO:0042311	vasodilation
GOTERM_BP_DIRECT GO:0006936	muscle contraction
GOTERM_BP_DIRECT GO:1902476	chloride transmembrane transport
GOTERM_BP_DIRECT GO:0042989	sequestering of actin monomers
GOTERM_BP_DIRECT GO:0006954	inflammatory response
GOTERM_BP_DIRECT GO:0007166	cell surface receptor signaling pathway
GOTERM_BP_DIRECT GO:0000122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter

増えていた(表1)。KEGGパスウェイ解析では、補体凝固経路、神経活性化リガンド・受容体経

路、アクチン骨格制御経路などが動いていた(表2)。

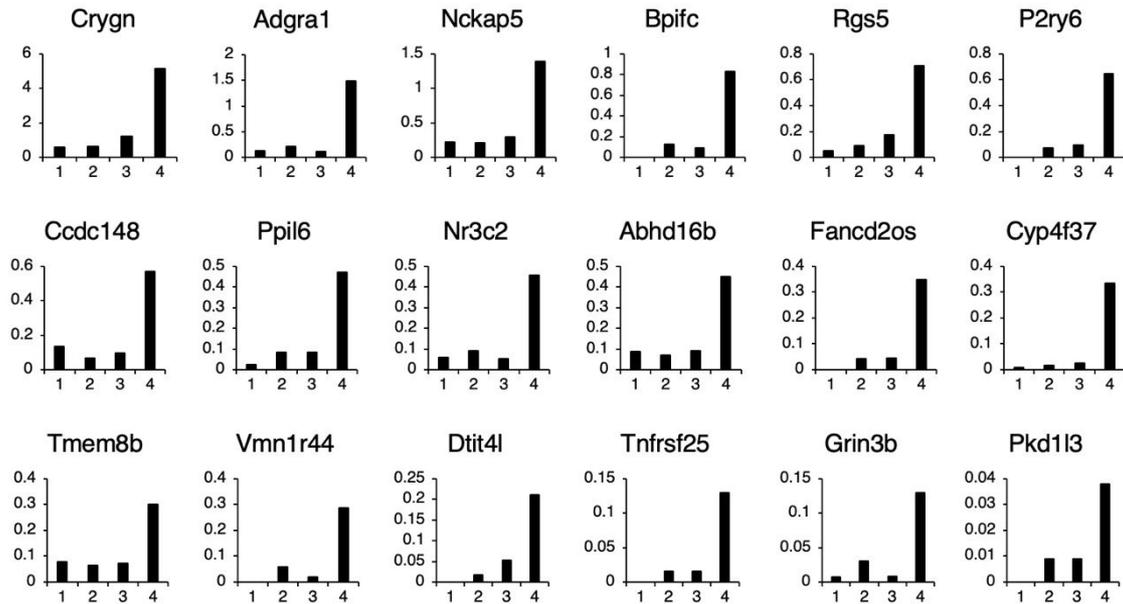
4倍以上の発現増加で抽出すると、18個の遺伝子が残り、発現レベルの高い遺伝子として網膜色素上皮に発現するCrygn、Adgra1やNckap5など脳に発現

表2: Pathway解析

KEGG_PATHWAY mmu04610: Complement and coagulation cascades
 KEGG_PATHWAY mmu04080: Neuroactive ligand-receptor interaction
 KEGG_PATHWAY mmu04810: Regulation of actin cytoskeleton
 KEGG_PATHWAY mmu05150: Staphylococcus aureus infection
 KEGG_PATHWAY mmu05171: Coronavirus disease - COVID-19

するもの、G蛋白結合7回膜貫通型受容体のP2ry6、転写因子としてはアルドステロン核内レセプターであるNr3c2、などが含まれた(図1)。

図1: Sox9 Ax + Scx AxがSox9 Ax, Scx Ax単独よりも4倍以上増加した遺伝子
 1: LacZ Ax, 2: Sox9 Ax, 3: Scx Ax, 4: Sox9 Ax + Scx Ax



これら一見enthesisとは無関係に見える遺伝子群一つ一つが複雑に絡み合って相互作用する事で、enthesis再生の環境と材料が整備される可能性が示唆された。今後はこれら一つ一つの機能解析をすることで、その再生メカニズムの全貌に迫りたい。

動物モデルにおける発現確認については、マウスとラットの両者において肩腱板enthesis部にドリリングまたはneedle-punch法によるモデル作製を試みたが、その微小部位のために均一な再現性を得る事が困難であり、過去の報告にある様な一定のenthesis再生を得られなかった。しかし、腱板インピンジメントモデルの再現と、腱板損傷後関節症モデルの開発には成功したので、今後はこれらを用いて上記遺伝子群の発現を検証したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Jokoji G, Maeda S, Oishi K, Ijuin T, Nakajima M, Tawaratsumida H, Kawamura I, Tominaga H, Taketomi E, Ikegawa S, Taniguchi N.	4. 巻 297
2. 論文標題 CDC5L promotes early chondrocyte differentiation and proliferation by modulating pre-mRNA splicing of SOX9, COL2A1, and WEE1.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100994	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 Yahiro Yuhei, Maeda Shingo, Morikawa Masato, Koinuma Daizo, Jokoji Go, Ijuin Toshiro, Komiya Setsuro, Kageyama Ryoichiro, Miyazono Kohei, Taniguchi Noboru	4. 巻 8
2. 論文標題 BMP-induced Atoh8 attenuates osteoclastogenesis by suppressing Runx2 transcriptional activity and reducing the Rankl/Opg expression ratio in osteoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone Research	6. 最初と最後の頁 32 (2020)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41413-020-00106-0	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 Tachibana N, Chijimatsu R, Okada H, Oichi T, Taniguchi Y, Maenohara Y, Miyahara J, Ishikura H, Iwanaga Y, Arino Y, Nagata K, Nakamoto H, Kato S, Doi T, Matsubayashi Y, Oshima Y, Terashima A, Omata Y, Yano F, Maeda S, Ikegawa S, Seki M, Suzuki Y, Tanaka S, Saito T.	4. 巻 8
2. 論文標題 RSP02 defines a distinct undifferentiated progenitor in the tendon/ligament and suppresses ectopic ossification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eabn2138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abn2138.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 城光寺豪, 前田真吾, 大石一樹, 伊集院俊郎, 中島正宏, 俵積田裕紀, 河村一郎, 富永博之, 武富榮二, 池川志郎, 谷口昇
2. 発表標題 CDC5LはSOX9, COL2A1, Wee1のpre-mRNAスプライシングを調整し初期軟骨細胞分化と増殖を促進する
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shingo Maeda
2. 発表標題 CDC5L modulates pre-mRNA splicing of chondrogenic genes to promote early chondrocyte differentiation and proliferation
3. 学会等名 Japan Bone Academy 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前田真吾, 今村健志
2. 発表標題 骨芽細胞分化の選別と成熟の分子制御機構
3. 学会等名 第 1 2 回 Orthopedic Research Club
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前田 真吾, 城光寺 豪, 伊集院 俊郎, 河村 一郎, 今村 勝行, 梶 博則, 篠原 直弘, 八尋 雄平, 谷口 昇
2. 発表標題 BMPシグナルと骨軟骨代謝~ Negative feedback機構 ~
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shingo Maeda
2. 発表標題 Evaluation of phosphorylated Smad1/5 expression in a novel animal model of shoulder cuff tear arthropathy
3. 学会等名 13th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiro Ijuin, Kazuki Oishi, Hiroki Tawaratsumida, Shingo Maeda, Noboru Taniguchi
2. 発表標題 Establishment of rat rotator cuff tear arthropathy model and analysis of the phenotype
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊集院俊郎、依積田裕紀、前田真吾、谷口昇
2. 発表標題 ラットrotator cuff tear arthropathyモデル の確立と表現型の解析
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 依積田裕紀、前田真吾、伊集院俊郎、谷口昇
2. 発表標題 SAMP8老化促進マウスの オステオサルコペニア・モデルとしての可能性
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 依積田裕紀、前田真吾、伊集院俊郎、河村一郎、富永博之、谷口昇
2. 発表標題 二つのサルコペニア・マウスモデルにおいて筋萎縮マーカー(Irisin、Atrogin1、Murf1)の発現は筋萎縮と必ずしも相関しない
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊集院 俊郎、大石 一樹、俵積田 裕紀、前田 真吾、谷口 昇
2. 発表標題 ラット肩腱板インピンジメントtendinopathyモデルにおける腱板の組織学的・機械的特性とHmgb1発現
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiro Ijuin, Tomohiro Iuchi, Hiroki Tawaratsumida, Yusuke Masuda, Shingo Maeda, Noboru Taniguchi
2. 発表標題 A novel rat model of cuff tear arthropathy: evaluating the role of the glenohumeral capsuloligamentous complex
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiro Iuchi, Toshiro Ijuin, Hiroki Tawaratsumida, Yusuke Masuda, Shingo Maeda, Noboru Taniguchi
2. 発表標題 An extensive gene expression analysis of rotator cuff tendinopathy in a rat subacromial impingement model
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Masuda; Hiroki Tawaratsumida; Toshiro Ijuin; Tomohiro Iuchi; Hiroyuki Tominaga; Shingo Maeda; Noboru Taniguchi
2. 発表標題 Aged Senescence-accelerated Mouse Prone 8 Exhibits Osteopenia With Increased Osteoid
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroki Tawaratsumida; Toshiro Ijuin; Yusuke Masuda; Tomohiro Iuchi; Hiroyuki Tominaga; Shingo Maeda; Noboru Taniguchi
2. 発表標題 Detection Of Novel Myokines Commonly Down-regulated Both In Hindlimb Unloading And Aged Sarcopenia Mice
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊集院俊郎、井内智洋、依積田裕紀、増田裕介、前田真吾、谷口昇
2. 発表標題 腱板断裂性関節症の病態を模した新規動物モデルの開発とその表現型の解析
3. 学会等名 第35回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鹿児島大学整形外科教室ホームページ https://www.orthop-kagoshima-u.com/ 日本骨代謝学会：1st Author http://www.jsbmr.jp/1st_author/426_smaeda.html</p>
--

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
研究分担者	谷口 昇 (Taniguchi Noboru) (20626866)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	

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
---------	---------