

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09895

研究課題名(和文)高齢者の運動機能低下防止へ向けた基盤研究：“筋内腱”の役割を探求するプロジェクト

研究課題名(英文)Basic research to prevent decline in motor function in the elderly: Project to explore the role of "intramuscular tendons"

研究代表者

阿部 伸一 (Abe, Shinichi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40256300

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)：高齢者の運動機能低下防止のため、「骨-腱-骨複合体」の強固な連結を維持することが重要となる。そのために必要な運動器複合体内部の筋内腱をつくる細胞の供給源を調べた。これまでの申請者の研究で、筋芽細胞と腱芽細胞の遊走と形質転換であると考えていたが、その詳細と筋内腱の形態形成の制御機構についてはわかっていなかった。本研究期間で申請者は、筋内腱形態形成のメカニズムを再生という視点から明らかにした。それは、腱芽細胞と筋芽細胞の一部が筋束断端部に遊走し、腱細胞へ分化することにより筋内腱が形成されるというプロセスであった。さらにその形態形成に、Sox9が有用な重要な役割を担う可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の運動機能低下防止のため、「骨-腱-骨複合体」の強固な連結を維持することが重要となるが、その連結には筋内腱が常に機能することが重要で、本研究結果から得られた関連因子(Sox9)を発現させるための研究へつなげる研究である。高齢者の身体内の関節機能の衰えは「ロコモティブシンドローム」と称され、健康寿命を伸ばすためには避けなければならないことが知られてきている。今後は、運動習慣の改善などで「骨-腱-骨複合体」にSox9が発現し筋内腱が強固な連結に影響を与え続ける、という仮説を立証していくことで、本研究がその社会的意義の基盤研究となることを立証できる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of intramuscular tendons at the attachment site of muscle to bone, we considered the mechanism of maintenance of the muscle-tendon-bone complex from the viewpoint of regeneration of tendons at the attachment site of muscle, which is part of the musculoskeletal system. Six-week-old C57BL/6J mice were used as study materials. To confirm the recovery of motor function, the Achilles tendon was injured with a scalpel as the area of interest. The mice were divided into four stages: a sham group (sham operation), a group 1 week after injury (POW1), a group 2 weeks after injury (POW2), and a group 4 weeks after injury (POW4). It was revealed that Sox9 is expressed at the injury site during tendon regeneration. It was also suggested that Sox9-positive cells that accumulate at the injury site are involved in tendon regeneration by switching stem cells that accumulate after injury to Sox9.

研究分野：解剖学

キーワード：筋内腱 運動器 加齢変化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで「筋-腱-骨複合体」を1つの機能的単位とし捉え研究を推進していく中で、組織横断的な何らかの因子が制御していると確信した。またこの筋付着部における運動器は、形成初期に筋束断端付近に筋内腱が出現し、成長過程で部位によっては微細な形態変化をしていることを示し(Abe et al. (7/7人) Arch. Oral Biol. 2017)、筋内腱は運動器の機能変化に合わせ、常にリモデリングし筋付着部の連結を強固にしている事を確信し、筋内腱の形成とその制御機構を解明する本申請研究を着想した。

2. 研究の目的

「骨-腱-骨複合体」の強固な連結を維持するために必要な筋内腱をつくる細胞の供給源は、筋芽細胞と腱芽細胞の遊走と形質転換であると申請者のこれまでの研究成果から考えているが、その詳細と筋内腱の形態形成の制御機構についてはわかっていない。本研究では、筋内腱の細胞供給先の特定と形成メカニズムを解明するため、具体的には「腱芽細胞と筋芽細胞の一部が筋束断端部に遊走し、腱細胞へ分化することにより筋内腱が形成され、その形態形成には Sox9 が関与する」という仮説を検証することを本申請課題の目的とする。本研究目的を達成するために以下(1)(2)の手法を用いる。

- (1)誘導性の Cre-loxP システムを用いた細胞の系譜解析
- (2)コンディショナルノックアウトマウスの作出

3. 研究の方法

1) 実験動物

実験は東京歯科大学の Institutional Animal Care and Use Committee (プロトコル番号 220104) により承認された。Sox9creER (STOCK Tg(Sox9cre/ERT2)1Msan/J), および R26tdTomato (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-tdTomato)Hze/J) マウスは Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入した。Sox9creER マウスを R26tdTomato マウスと交配し、Sox9creER ; R26tdTomato マウスを作製した。腱損傷による Sox9 発現細胞の系統を追跡するために、タモキシフェン (Tam) の投与により Sox9+前駆細胞における Cre 発現が異なる発達段階において誘導可能な二重トランスジェニック Sox9creERT2/Rosa26-loxP-stop-tdTomato レポーターマウスを作製した。

2) 腱損傷モデル

術後合併症を最小限に抑えるために、簡便で再現性の高い部分切断モデルを行った。

3) 生理学的測定

腱損傷後の機能回復を経時的に評価するため、マウスは Y Itoh ら (2017) が記載した手順と同一の方法で検索を行った。

4) 形態学的観察

アキレス腱周辺組織は 4% リン酸緩衝パラホルムアルデヒドで浸漬固定をした。

5) PCR 測定結果

腱組織の採取は踵骨より上部 1mm を切断し近位は筋腱接合部から 2mm 下方部を切断することでの損傷部分のみを顕微鏡 (Stemi305; Carl Zeiss Inc, NY, USA) で選択し、サンプルとして用いた。

6) 免疫組織化学的染色結果

サンプル中のタンパク質の発現を解析するために、*SOX9* と共に腱の再生にかかわる部位であるエpiteノンに関連する二つのマーカー *-SMA*、*Periostin* を調査した。

7) 系統追跡分析結果

試料は4%PFAで2日冷蔵固定し、10%スクロース、20%スクロース、30%スクロース、でそれぞれ3時間ずつ浸漬を行ったのち川本法用凍結包埋材 (CECTION-LAB:C-EM001) にて包埋後、液体窒素にて冷やしたイソペンタン中にて瞬間凍結を行った。

4. 研究成果

1) 生理学的測定結果

生理学的試験の結果、損傷後1週 (POW1) では Sham 群と比べて有意な機能低下を認めた。損傷後2週 (POW2)、損傷後4週 (POW4) では損傷後1週 (POW1) と比較して有意な増加を示した。その後損傷後8週 (POW8) まで機能試験を行ったが機能試験の値に変動は認められなかった。Sham 群と損傷後4週 (POW4) を比較したところ、機能的に有意な差は認められなかった。すなわち腱損傷により、運動器の機能が損傷後1週 (POW1) において低下するが、損傷後2週 (POW2) から増加傾向が認め、損傷後4週 (POW4) においては有意な増加を示し機能が回復することが明らかとなった。

2) 形態学的観察結果

H-E 染色による形態観察を行った。まず初めに epitenon 領域については、損傷後1週 (POW1) で損傷部組織の epitenon の連続性は断裂をしており (Fig.4E)、Sham 群と比較して細胞数の増加が認められた (Fig.4B)。損傷後2週 (POW2) では腱組織の中で外側部分にあたる epitenon の形成がみとめられた (Fig.4.F; allows)。損傷後4週 (POW4) になると損傷部は epitenon で覆われ Sham 群に近似した細胞極性を示した (Fig.4D,G)。次に損傷部内側は、Sham 群と比較して損傷後1週 (POW1)、において有意な細胞数の増加が認められた。損傷後1週 (POW1) と比較すると損傷後2週 (POW2)、損傷後4週 (POW4) と損傷部の細胞密度は優位に減少することが分かった (Fig.4B)。Sham 群と損傷後4週 (POW4) を比較すると細胞の密度は有意な差を示しており、実際の H-E 染色像でも細胞極性も消失したままであった (Fig.4D,G)。また、腱組織の幅径を観察したところ Sham 群と比較してすべての群で増加しており、損傷後4週 (POW4) においても幅径は戻らないことが分かった。(Fig.4C)

次に損傷部のコラーゲン繊維の配向性を確認するために Azan 染色を行った。Sham 群ではアゾカルミンレッドに強く染色されたが、損傷後2週 (POW2)、損傷後4週 (POW4) の損傷部位はアニリンブルーに強く染色されることが分かった。腱再生に重要な役割を示す epitenon の連続性の消失が損傷後1週 (POW1) の時点で消失しており、この時期に最も損傷部の細胞密度が高くなりその後、細胞密度は減少していくことが分かった。損傷後2週 (POW2) から epitenon の形成が始まり、損傷後4週 (POW4) において epitenon 領域は組織的には治癒する事分かった。しかし、細胞の極性や腱組織の幅径などは損傷後4週 (POW4) においても再生しないことが分かった。

3) mRNA の発現

RT-PCR による mRNA の検索より、*SOX9* の発現は Control 群と比較すると損傷後1週 (POW1)、損傷後2週 (POW2) において有意な上昇を示した。しかし、その他の群の間に有意のある差は出なかった。次に *-SMA* では Control 群と損傷後1週 (POW1)、損傷後4週 (POW4) で有意な差を認め、損傷後1週 (POW1) と損傷後4週 (POW4) の間にも有意な差を認

めた(Fig.5B)。 *Periostin*では損傷後1週(POW1)においてその他の対照群すべてと有意な差が認められたが、その差は Control 群と損傷後1週(POW1)との間で最も顕著であった。 *Col1*ではControl群と比較し損傷後1週(POW1)、損傷後2週(POW2)において有意な上昇を示した。また、コラーゲン形成に関与するプロテオグリカンであり腱再生に関与する *Fibromodulin*は損傷後2週(POW2)においてControl群、損傷後1週(POW1)との間に有意な増加を示した。 *Scx*、 *Col1*は損傷後の週を追うごとに増加傾向は認められたが、すべての群において有意な差は認められなかった。

4) Sox9の発現

免疫組織学的染色の損傷後1週(POW1)では、損傷部周囲に *SOX9*陽性細胞が発現を開始した。腱損傷内部ではあまり発現が認められず、腱損傷部外側部分に最も強く発現をした。-SMA、 *Periostin*も同様に損傷部内部と比較して外側部分に強く発現を認めた。epitenonの形成が始まった損傷後2週(POW2)では、各群の中で最もepitenon領域および腱損傷内部に *SOX9*陽性細胞が共に発現を示した。-SMA、 *Periostin*も損傷部内部での発現が強調した。-SMAは血管内皮細胞のマーカでもあるが、損傷後1週(POW1)では損傷部よりも外側の結合組織において発現していたものの損傷後2週(POW2)では損傷部内部にも集積をした。機能的な治癒を認めた損傷後4週(POW4)では、損傷内部に *SOX9*陽性細胞は継続して集積を認めたが-SMA、 *Periostin*は主にepitenon領域に発現しておりSham群と類似傾向を示した。しかし損傷内部にも若干の発現を認めたため完全な極性の回復には至らなかった。損傷部における各タンパクの割合をグラフ化した。*SOX9*においては損傷後2週(POW2)、損傷後4週(POW4)においてすべての群との間に有意な差が認められた。-SMAにおいても損傷後2週(POW2)においてすべての群との間に有意な差を認めた。*Periostin*では、損傷後2週(POW2)においてすべての群との間に有意な差を認め、またSham群と比較して損傷後4週(POW4)において有意な差が認められた。*SOX9*、-SMA、 *Periostin*の3種類のタンパクすべてでSham群と比較して損傷後2週(POW2)で特に増加が認められ損傷後2週がタンパクの集積が最も活発な時期であることが明らかとなった。

腱損傷時における *Sox9*発現細胞の系統を追跡するために、*Sox9-Cre-ERT2*マウスとLSL-tdTomatoマウスを交配させ *Sox9-Cre-Tomato*マウスを作成した。損傷前にタモキシフェンを投与したPre群と比較して損傷後にタモキシフェンを投与したPost群では腱損傷部位における *Sox9-CreERT2*;tdTomato+細胞がPost群で有意に増加することが分かった。損傷部の細胞における *Sox9-CreERT2*;tdTomato+細胞の割合を調べたところPre群と比較してPost群では有意な増加を示した。また、実際の損傷部領域における *Sox9-CreERT2*;tdTomato+細胞の面積においてもPre群と比較してPost群では有意な増加を示した(Fig.7E)。これらのことより、損傷部に集積する *Sox9-CreERT2*;tdTomato+細胞は損傷前と比較して損傷後に有意な増加があることが明らかとなった。

本研究では、腱再生時に重要な部位である腱組織内のepitenonの形成と共に *SOX9*が発現しており、機能的な再生とリンクしていることが明らかとなった。また、腱修復過程において発現する *SOX9*をリネージトレーシングした結果、腱損傷後に *SOX9*にスイッチングした細胞が修復に関与していることが明らかとなった。この結果は、腱再生における組織の再生だけではなく、機能回復に *Sox9*が重要な役割を担っていることが示唆された。また、損傷部位にスイッチングして集積した *Sox9*の由来を明らかとするために現在、当グループではこれらの調査を進めている。

5. 主な発表論文など

〔雑誌論文〕計2件（うち査読付論文2件/うちオープンアクセス2件）

著者名
1. Watanabe G., Yamamoto Y., Taniguchi S., Sugiyama Y., Hirouchi H., Ishizuka S., Kitamura K., Mizoguchi T., Takayama T., Hayashi K. and <u>Abe S.</u>
2. 標題
Chronological changes in expression and localisation of Sox9 from achilles tendon injury to functional recovery in mice
3. 雑誌名
International Journal of Molecular Sciences, 24:11305, 2023
4. 掲載論文の DOI 10.3390/ijms241411305.
5. オープンアクセス、国際共著には該当しない

1. 著者名
Amemiya H., Yamamoto M., Higa K., Watanabe G., Taniguchi S., Kitamura K., Jeong J., Yanagisawa N., Fukuda K. and <u>Abe S.</u>
2. 標題
Effects of myostatin on nuclear morphology at the myotendinous junction
3. 雑誌名
International Journal of Molecular Sciences, 24:6634, 2023
4. 掲載論文の DOI 10.3390/ijms24076634.
5. オープンアクセス、国際共著には該当しない

〔学会発表〕計2件

1. 発表者名
谷口修一朗, 山本将仁, 関谷紗世, 渡辺元次, 山本悠太郎, 高木貴博, <u>阿部伸一</u>
2. 発表標題
筋腱接合部の発育過程にみられる Sox 9 発現の切り替え
3. 学会名
第 312 回東京歯科大学学会（総会）
4. 発表年
2021 年 10 月 16 日

1. 発表者名
渡辺元次, 田中智人, 楊 天意, 廣内英智, 山本将仁, 松永 智, <u>阿部伸一</u>
2. 発表標題
腱損傷修復時に発現する Sox9 の役割解明
3. 学会名
第 129 回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年
2024 年 3 月 21 日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Kitamura K, Watanabe T, Yamamoto M, Ishikawa N, Kasahara N, Abe S, Yamamoto H	4. 巻 38
2. 論文標題 A newly discovered tendon between the genioglossus muscle and epiglottic cartilage identified by histological observation of the pre-epiglottic space.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Dysphagia	6. 最初と最後の頁 315-329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00455-022-10469-7.	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 -

1. 著者名 Yamamoto M, Sakiyama K, Kitamura K, Yamamoto Y, Takagi T, Sekiya S, Watanabe G, Taniguchi S, Ogawa Y, Ishizuka S, Sugiyama Y, Takayama T, Hayashi K, Chang WJ, Abe S	4. 巻 23
2. 論文標題 Development and regeneration of muscle, tendon, and myotendinous junctions in striated skeletal muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23063006	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 Abe S, Yamamoto M	4. 巻 22
2. 論文標題 Factors involved in morphogenesis in the muscle-tendon-bone complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22126365	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 Nagakura R, Yamamoto M, Jeong J, Hinata N, Katori Y, Chang WJ, Abe S	4. 巻 10
2. 論文標題 witching of Sox9 expression during musculoskeletal system development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8425-8425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65339-9	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺元次, 山本将仁, 山本悠太郎, 関谷紗世, 谷口修一朗, 廣内英智, 松永智, 阿部伸一
2. 発表標題 腱損傷修復時に発現するSox9の役割解明
3. 学会等名 第128回日本解剖学会 全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamamoto Masahito, Tetsu Naito, Takahiro Takagi, Chiemi Kanehira, Satoru Mastunaga, Kei Kitamura, Hitoshi Yamamoto, Shinichi Abe
2. 発表標題 Switching of Sox9 expression during musculoskeletal system development.
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会
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
研究協力者	渡辺 元次 (Watanabe Genji)	東京歯科大学・解剖学講座・非常勤講師 (32650)	
研究協力者	山本 将仁 (Masahito Yamamoto)	東京歯科大学・解剖学講座・非常勤講師 (32650)	

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