

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03107

研究課題名（和文）転写因子Scleraxisによって制御される筋骨格システムの統合的理解

研究課題名（英文）Understanding of the musculoskeletal system regulated by the transcription factor Scleraxis

研究代表者

宿南 知佐（Shukunami, Chisa）

広島大学・医系科学研究科（歯）・教授

研究者番号：60303905

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、トランスジェニックマウス胚を用いたレポーターアッセイによって、Scxの腱・靭帯特異的転写制御を担うエンハンサー領域を遺伝子の下流に同定した。ScxCre knock-inマウスと交配したRosaTomatoマウスを用いた系譜解析では、腱・靭帯だけでなく、成長板、一次海綿骨、皮質骨などにもScxを発現する細胞集団が存在することを見出し、Scx欠失マウスやSox9発現領域でScxを欠失したマウスではアキレス腱付着部の形成不全や骨量が著明に減少することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋骨格システムは、basic helix-loop-helix型の転写因子であるScleraxis(Scx)が発現する腱・靭帯によって統合されている。本研究では、Scx遺伝子の時空間的発現制御に関わるエンハンサーを同定し、筋骨格システムにおいてこれらの遺伝子を発現する細胞系譜を明らかにした。また、Scx欠失マウスの解析によってScxの個体レベルでの機能を解析した。得られた研究成果は、筋・骨コンポーネントの連結の要となる腱・靭帯で発現するScxを基軸とする生命現象の統合的理解を深め、損傷すると修復が困難な腱・靭帯の再生技術の基盤を構築することに寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed reporter assays using LacZ reporter transgenic mouse embryos to identify a downstream enhancer that is responsible for tendon/ligament-specific transcriptional regulation. Cell lineage analyses using ScxCre knock-in mice and RosaTomato reporter mice revealed localization of cell populations that express Scx not only in tendons and ligaments, but also in growth plates, primary cancellous bone, and cortical bone. We found that Scx-deficient mice and conditional knockout mice in which Scx was deleted in the Sox9-expressing region showed defective enthesis formation and a marked decrease in bone mass.

研究分野：分子生物学

キーワード：腱・靭帯 Scleraxis エンハンサー 遺伝子改変動物 Sox9

1. 研究開始当初の背景

形態が多様で複雑な頭蓋顎顔面領域は、発達成長の障害に伴って様々な異常が起こりうる。その多くが、硬組織の連結に関わる形態形成の異常に起因することから、硬組織の連結に関わる腱・靭帯・縫合部の細胞群の実体を分子レベルで明らかにすることは基礎生物学的だけでなく臨床的な見地からも、重要であると考えられている。腱は骨格筋の収縮力を硬組織に伝達し、靭帯は硬組織間を連結し関節を安定化することによって、筋骨格システムを統合し、身体の支持と運動機能の発現に不可欠の役割を果たしている。腱・靭帯の形成過程で発現する basic helix-loop-helix 型の転写因子 Scleraxis (*Scx*) が欠失すると、部位に関わらず、成熟分子マーカーである *Tenomodulin (Tnmd)* の発現が腱・靭帯で消失する。硬組織との連結部においては、*Scx* は軟骨形成に必須の転写因子である *Sox9* と共発現し、エンターシスの形成に寄与している(図1)。腱・靭帯では、*Scx* は持続的に発現するが、硬組織との連結部においては、*Scx* の発現は一過性である。部位によって、持続的あるいは一過性に発現するダイナミックな *Scx* の発現局在が、どのような分子機序によって制御されているかについては、明らかにされていない。また、*Scx* は腱・靭帯とその連結部以外の部位においても発現していることが報告されているが、個体レベルでの機能については、ほとんど知られていない。

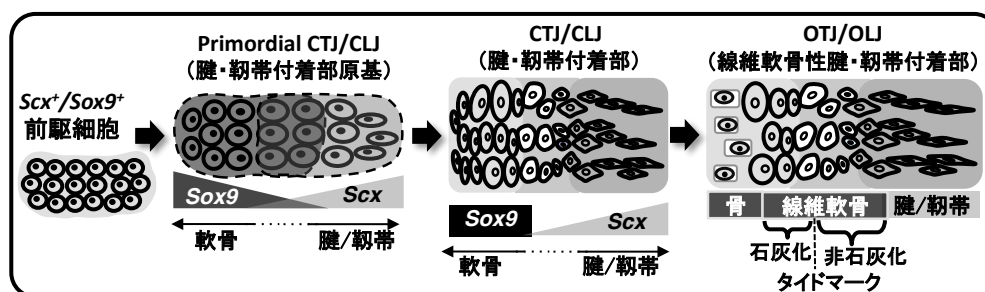


図1. 硬組織連結部(エンターシス)の形成過程

2. 研究の目的

本研究では、筋・骨コンポーネントの連結の要となる腱・靭帯に発現する転写因子である *Scx* に着目し、独自に作製した遺伝子改変動物を用いて、*Scx* の上流と下流で制御に関わる分子ネットワークの実体を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) *Scx* の上流で制御に関わる分子ネットワークの解析

ダイナミックに変化する *Scx* 遺伝子の時空間的な発現制御の実体を解明するために、*Scx* の enhancer 領域を同定する。*hsp68* の minimal promoter を有する *LacZ* reporter ベクターにマウス *Scx* のゲノム領域を組み込んで構築した transgene を用いて、Transgenic (Tg) レポーター胚の X gal 染色によって、組織特異的転写に寄与する enhancer 領域を検索する。*Scx* の promoter 領域を同定後、候補領域にとらわれない enhancer 領域の検索を行うために、enChIP 法による解析を行う。一連の解析で同定された enhancer 領域を組み込んだレポーターベクターを前駆軟骨細胞株 ATDC5 やヒト胎児由来腎臓上皮細胞株 HEK293T に lipofection によって導入し、dual luciferase assay を行って、転写活性化能を解析する。また、enhancer 領域の塩基配列情報に基づいて結合する転写因子を予測する。

(2) *Scx* の下流で制御に関わる分子ネットワークの解析

生後の成長過程における筋骨格システムにおける *Scx*、*Sox9* の寄与を明らかにするために、*Scx*^{Cre/+};*RosaTomato* マウス、*Scx*^{CreERT2/+};*RosaTomato* マウス、*Sox9*^{Cre/+};*RosaTomato* マウス、*Sox9*^{CreERT2/+};*RosaTomato* マウスを用いて系譜解析を行う。硬組織との連結部における *Scx* の機能は、*Scx* を欠失する *Scx*^{A11/A11} マウス、*Scx*^{flox/flox};*Sox9*^{Cre/+} マウスを用いて、川本法による組織学的解析、免疫染色、マイクロ CT による解析を行う。また、*Scx* 陽性領域で EGFP を発現する *ScxGFP* Tg マウスを用いて、歯周靭帯における *Scx* の発現制御について解析を行う。

4. 研究成果

(1) *Scx* の上流で制御に関わる分子ネットワークの解析

マウスの 15 番染色体上の *Scx* 遺伝子は、2 つの exon で構成されており、転写開始点の上流には TATA box (TATAAA) 配列が存在する(図 2)。転写開始点と近傍にある TATA box を含む長さの異なるゲノム断片を promoter less の pGL4.10 ベクターに組み込んだレポーターを HEK293T に導入し dual luciferase assay を行ったところ(図 2)、いずれの断片においても promoter 活性が検出された。同様のプロモーター活性は、ATDC5 においても検出された。enChIP を行うために、同定した promoter 領域の上流を標的とする guide RNA を設計し、In-Fusion クローニング法により pAM_dCas9 ベクターに組み込んだ。

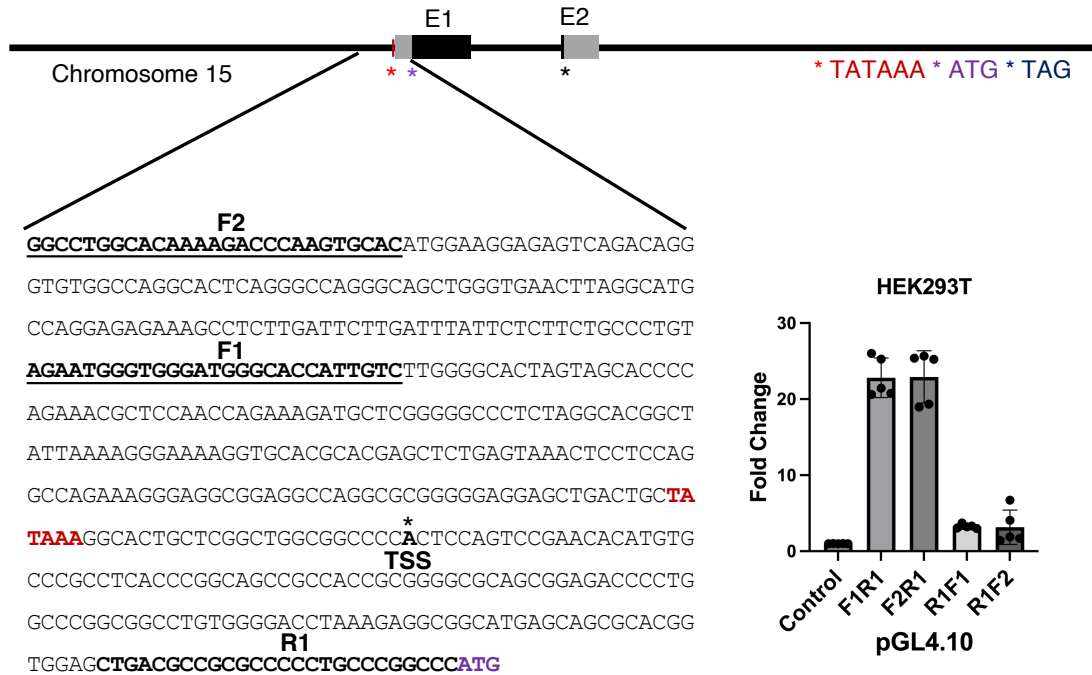


図2. マウス *Scx* 遺伝子の promoter 領域

遺伝子の上流と下流を含む ~10.86 kb のゲノム領域には、腱・靭帯特異的な転写制御を担う活性が見出されている (図 3)。このゲノム領域を分割し、*hsp68* の minimal promoter と *tol2* 配列を有する *LacZ* reporter ベクターにマウス *Scx* のゲノム領域を組み込んで構築した transgene を用いて、Tg マウス胚において X-gal 染色によって *LacZ* の活性を解析し、*Scx* 遺伝子の下流を含む 5.3 kb の領域に enhancer 活性が存在することを見出した(図 3)。5.3 kb のゲノム領域を分割し、1.97 kb の領域にも同様の活性を見出した。更に、ゲノム領域を分割し、343 bp のゲノム断片に enhancer 活性が検出され、哺乳類、鳥類、シーラカンスまで高度に保存されているモチーフが存在することを見出している。前駆軟骨細胞株 ATDC5 を用いた dual luciferase assay では、このゲノム領域に伸展刺激応答性の活性があることが明らかになっている。

(2) *Scx* の下流で制御に関わる分子ネットワークの解析

生後の成長過程における筋骨格システムにおける *Scx*、*Sox9* の寄与を明らかにするために、*Scx^{Cre/+};RosaTomato* マウス、*Scx^{CreERT2/+};RosaTomato* マウス、*Sox9^{Cre/+};RosaTomato* マウス、*Sox9^{CreERT2/+};RosaTomato* マウスを用いて系譜解析を行った。*Scx* は、腱・靭帯とその連結部だけでなく、成長板や膝関節の軟骨細胞、一次海綿骨や皮質骨の骨芽細胞の subpopulation においても発現していた。また、軟骨だけでなく、エンテシスから離れた腱や骨格筋の形成においても、*Sox9* 陽性の前駆細胞が寄与していることが明らかになった。

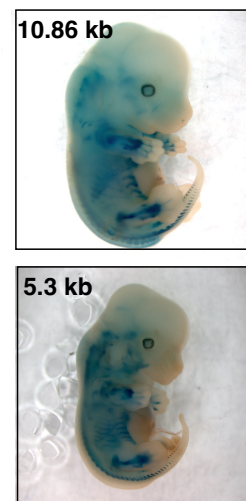


図3. *ScxLacZ* Tg 胚 (E13.5)

4週齢の $Scx^{A11/A11}$ マウスの解析では、野生型と比較して、脛骨が細くなりアルカリフォスファターゼ陽性領域も減少していた。マイクロCTを用いた骨形態計測では、 $Scx^{A11/A11}$ マウス、 $Sox9$ 発現領域で Scx を欠失した $Scx^{lox/lox}; Sox9^{Cre/+}$ マウスのいずれにおいても、骨量の著明な減少が観察された。 $Scx^{GFP Tg}$ マウスを用いた解析では、歯周靭帯において、伸展刺激依存的に発現が上昇する Scx が、 $ephrin A2$ を介して、伸展刺激によって誘導される歯周靭帯細胞の骨芽細胞への分化を抑制することが明らかになった。

線維軟骨性エンターシス

は、胎生期・出生時は硝子軟骨(HC)・腱(T)の2層構造をとるが、骨端の硝子軟骨の骨への置換と連動して、軟骨下骨(SB)・石灰化線維軟骨(UFC)・腱(T)の4層構造をとるようになる。 Scx 欠失マウスでは、アキレス腱付着部は線維軟骨の低形成によって丸みを帯びた形態となり、野生型マウスでは軟骨下骨に隣接する成熟石灰化線維軟骨(MFC)で発現している分子マーカであるSclerostinの発現がほぼ消失していた(図4)。

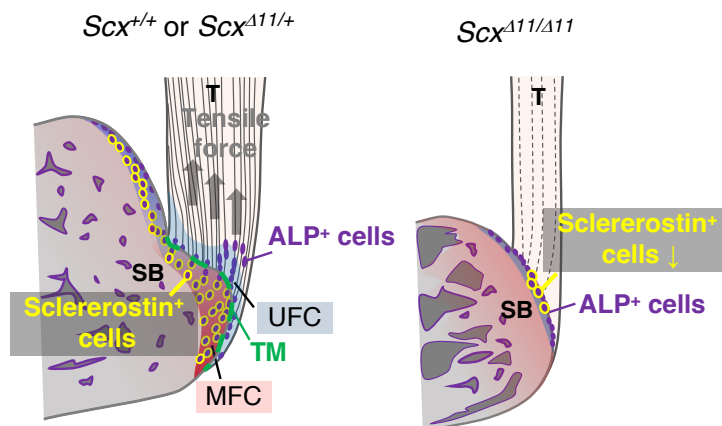


図4. Scx 欠失マウスにおけるSclerostin発現低下

Yambe et al., Frontiers in Cell and Dev, 2024

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yambe S, Yoshimoto Y, Ikeda K, Maki K, Takimoto A, Tokuyama A, Higuchi S, Yu X, Uchibe K, Miura S, Watanabe H, Sakuma T, Yamamoto T, Tanimoto K, Kondoh G, Kasahara M, Mizoguchi T, Docheva D, Adachi T, Shukunami C.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sclerostin modulates mineralization degree and stiffness profile in the fibrocartilaginous enthesis for mechanical tissue integrity.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2024.1360041	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 該当する

1. 著者名 Ono, Y., Schlesinger, S., Fukunaga, K., Yambe, S., Sato, T., Sasaki, T., Shukunami, C., Asahara, H., Inui, M.	4. 巻 150
2. 論文標題 Scleraxis-lineage cells are required for correct muscle patterning	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.201101	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 Fuiten, A.M., Yoshimoto, Y., Shukunami, C., Stadler, H.S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Digits in a dish: An in vitro system to assess the molecular genetics of hand/foot development at single-cell resolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1135025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1135025	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 該当する

1. 著者名 内部健太、余 昕怡、山家新勢、宿南知佐	4. 巻 81
2. 論文標題 軟骨細胞	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 最新の骨粗鬆症学 (第2版) 日本臨床	6. 最初と最後の頁 90-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Kroner-Weigl, N., Chu, J., Rudert, M., Alt, V., Shukunami, C., Docheva, D.	4. 巻 11
2. 論文標題 Dexamethasone Is Not Sufficient to Facilitate Tenogenic Differentiation of Dermal Fibroblasts in a 3D Organoid Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 772-772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11030772	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 該当する

1. 著者名 Nakamichi, R., Ma, S., Nonoyama, T., Chiba, T., Kurimoto, R., Ohzono, H., Olmer, M., Shukunami, C., Fuku, N., Wang, G., Morrison, E., Pitsiladis, Y.P., Ozaki, T., D'Lima, D., Lotz, M., Patapoutian, A., Asahara, H.	4. 巻 14
2. 論文標題 The mechanosensitive ion channel PIEZO1 is expressed in tendons and regulates physical performance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 5557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.abj5557	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 該当する

1. 著者名 Omoto, T., Yimitei, D., Sanada, Y., Toriyama, M., Ding, C., Hayashi, Y., Ikuta, Y., Nakasa, T., Ishikawa, M., Sano, M., Lee, M., Akimoto, T., Shukunami, C., Miyaki, S., Adachi, N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Tendon-Specific Dicer Deficient Mice Exhibit Hypoplastic Tendon Through the Downregulation of Tendon-Related Genes and MicroRNAs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 898428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.898428	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 Yoshimoto, Y., Uezumi, A., Ikemoto-Uezumi, M., Tanaka, K., Yu, X., Kurosawa, T., Yambe, S., Maehara, K., Ohkawa, Y., Sotomaru, Y., Shukunami, C.	4. 巻 10
2. 論文標題 Tenogenic Induction From Induced Pluripotent Stem Cells Unveils the Trajectory Towards Tenocyte Differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 780038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.780038	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 Kawatsu M, Takeshita N, Takimoto A, Yoshimoto Y, Seiryu M, Ito A, Kimura S, Kawamoto T, Hiraki Y, Shukunami C, Takano-Yamamoto T.	4. 巻 149
2. 論文標題 Scleraxis upregulated by transforming growth factor- 1 signaling inhibits tension-induced osteoblast differentiation of priodontal ligament cells via ephrin A2.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115969-115977
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.115969.	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13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shinsei Yambe, Yuki Yoshimoto, Xinyi Yu, Haruhiko Akiyama, Taiji Adachi, Chisa Shukunami
2. 発表標題 Sclerostin, a marker for mature fibrochondrocytes, modulates the stiffness gradient to maintain tissue integrity of the fibrocartilaginous enthesis.
3. 学会等名 33rd Australian & New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting (ANZBMS) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 余昕怡、吉本由紀、山家新勢、秋山治彦、安達泰治、川上良介、宿南知佐
2. 発表標題 硬組織連結に寄与するScx+/Sox9+細胞の不均一性とScx欠失による腱・靭帯・軟骨分化プロセスへの影響
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山家新勢、吉 由紀、余昕怡、秋山治彦、安達泰治、宿南知佐
2. 発表標題 線維軟骨性エンテシスにおけるSclerostinの機能的役割
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 余昕怡、吉本由紀、山家新勢、秋山治彦、安達泰治、川上良介、宿南知佐
2. 発表標題 硬組織連結に寄与するScx+/Sox9+細胞の不均一性とScx欠失による腱・靭帯・軟骨分化プロセスへの影響
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山家新勢、吉本由紀、余昕怡、秋山治彦、安達泰治、宿南知佐
2. 発表標題 線維軟骨性エンテースにおけるSclerostinの機能的役割
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shinsei Yambe, Yuki Yoshimoto, Xinyi Yu, Haruhiko Akiyama, Taiji Adachi, Chisa Shukunami
2. 発表標題 Sclerostin, a marker for mature fibrochondrocytes, modulates the stiffness gradient to maintain tissue integrity of the fibrocartilaginous enthesis.
3. 学会等名 33rd Australian & New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting (ANZBMS) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山家新勢、余昕怡、吉本由紀、樋口真之輔、秋山治彦、安達泰治、宿南知佐
2. 発表標題 線維軟骨性エンテースの形成・維持に寄与する細胞群の特性解析
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 余昕怡, 山家新勢, 樋口真之輔, 宿南知佐
2. 発表標題 Pax1による椎間板の成熟と維持の制御
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本由紀, 上住聡芳, 上住円, 田中かおり, YU Xinyi, 黒澤珠希, 山家新勢, 前原一満, 大川恭行, 外丸祐介, 宿南知佐
2. 発表標題 腱・靭帯分化誘導システムにおけるシングルセル解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宿南知佐
2. 発表標題 軟骨分化誘導系の確立から腱・靭帯研究への歩み(学術賞受賞講演)
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本由紀, 山家 新勢 宿南知佐
2. 発表標題 ScxGFP iPS細胞を用いて樹立したin vitro腱・靭帯分化誘導におけるシングルセル解析
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山家新勢, 吉本由紀, 樋口真之輔, 味八木茂, 宿南知佐
2. 発表標題 TnmdCreノックインマウスの作製とTnmd陽性細胞の系譜解析
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 樋口真之輔, 川上良介, 山家新勢, 余昕怡, 今村健志, 宿南知佐
2. 発表標題 頭蓋顔面領域におけるScx+/Sox9+細胞の局在と形態形成への寄与
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生体分子機能学 http://tnmd.hiroshima-u.ac.jp/j_html/j_gyouseki.html
--

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	隅山 健太 (Sumiyama Kenta) (00370114)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	樋口 真之輔 (Shinnosuke Higuchi) (20847131)	神戸大学・附属学校部・附属中等教育学校教諭 (14501)	
研究分担者	吉本 由紀 (Yuki Yoshimoto) (40735304)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	

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			
ドイツ	ヴェルツブルク大学			