

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659669

研究課題名(和文) 脊椎椎間板の形成・維持を担う分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms in disk formation and homeostasis

研究代表者

浅原 弘嗣 (Hiroshi, Asahara)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：70294460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、腱・靭帯に特異性の高い発現を示し、腱形成に必須の転写因子としてMkxを同定しているが、このMkxは椎間板線維輪においても発現し、Mkxノックアウトマウスでは、加齢と共に椎間板の変性が見られることを明らかにした。ヒト線維輪細胞を用いてMKXをノックダウンさせると、SCXやTNMDなどの靭帯関連遺伝子の発現が低下し、軟骨分化のマスター制御因子であるSOX9の発現が上昇した。さらにC3H10T1/2細胞においてMkxを過剰発現させた細胞では、腱・靭帯関連遺伝子の発現が増大し、軟骨分化、骨分化を抑制することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have identified the transcription factor Mx, that is expressed in tendon/ligament and plays an important role in tendon formation. The Mx is also expressed in annulus fibrosus of intervertebral disc. The aged Mx knockout mice showed degeneration of annulus fibrosus. Tendon markers, such as SCX and TNMD were reduced by MKX knockdown in human annulus fibroblasts whereas SOX9, a master chondrogenesis regulator, was upregulated. Moreover, overexpression of Mx in C3H10T1/2 cells promoted the expressions of tendon markers, and chondrogenesis and osteogenesis were inhibited.

研究分野：システム発生・再生医学分野

キーワード：Mohawk 椎間板 腱 靭帯

1. 研究開始当初の背景

腱・靭帯は、それぞれ筋肉と骨、骨と骨を結合する組織であり、力や運動を伝達し、我々の"動く"という重要な生理機能を担う要となっている。腱や靭帯は、外傷や加齢によって損傷・変性するが、栄養血管が少ないため、その治癒力は非常に弱く、再生が困難であり、新しい再生医療技術の発展が望まれている。そのため治療法の開発に向けて基盤となる分子レベルでの研究が急務とされている。しかしながら、腱・靭帯の発生・分化における遺伝子制御機構についてや、これら組織の変性メカニズムは、未だにほとんど不明であり、臨床および基礎研究が最も遅れた組織の1つに挙げられている。

申請者らは、E9.5、10.5、11.5のマウス胚において、遺伝子発現(転写)のスイッチである約1,500個の転写因子・転写コファクターのWhole-mount in situ hybridization (WISH)データベース"EMBRYS" (<http://embrys.jp/>)を構築し、時空間特異的な発現制御により成り立っている個体発生における、複雑な遺伝子ネットワーク解明の足がかりとなるシステムを作り上げた(Yokoyama et.al. Dev Cell 2009)。このデータベースを基に、腱・靭帯に特異的な遺伝子としてホメオボックス遺伝子であるMohawk (Mkx)を同定し、このMkxが腱の形成に重要な転写因子であることをノックアウトマウスの解析により明らかにした(Ito et. al. Proc Natl Acad Sci USA 2010)。さらに我々はMkxノックアウトマウスでは野生型と比べて椎間板を構成する靭帯様組織である線維輪の線維束が不明瞭になっていることを見出した(未発表データ)。またスクリプス研究所との共同研究により、ヒトの加齢に伴う変性を来した前十字靭帯から採取した細胞のMkxの発現レベルが減少していることがわかった(未発表データ)。以上の結果から、Mkxが腱の形成のみならず靭帯の変性を抑制する働きを持っている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

脊椎椎間板は、椎骨と結合し脊柱を構成する組織であり、加齢や力学的負荷による椎間板の変性・損傷は、椎間板ヘルニアなどを引き起こし、患者に激痛を与え、日常生活に多大な影響を及ぼす。椎間板の損傷・変性は、栄養血管が少ないことからその治癒力は非常に弱く、再生が困難であり、新たな再生医療技術の開発が望まれており、治療法の開発に向けての基盤となる分子メカニズムの解明が急務とされている。しかしながら、椎間板の発生における遺伝子ネットワークやこれら変性メカニズムは未だ殆ど分かっていない。

本研究では、腱・靭帯特異的なホメオボックス遺伝子であるMkxの椎間板の変性における機能を明らかにするために、Mkxのノックアウトマウスを用いた解析、および細胞レ

ベルでの解析を行い、椎間板変性における分子メカニズムの解明、さらには臨床応用への貢献を目指す。

3. 研究の方法

(1) Mkxノックアウトマウスの解析

各月齢の野生型およびMkxノックアウトマウスの椎間板線維輪の組織学的な解析を行い、その変性度を調査した。

(2) ヒト線維輪細胞でのMKXノックダウンによる効果

ヒト線維輪細胞にMKXに対するsiRNAをLipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)によりトランスフェクションし、それによる各遺伝子の発現変化をリアルタイムPCRにより調査した。

(3) C3H10T1/2細胞へのMkx過剰発現によるin vitroおよびin vivoでの効果の検討

C3H10T1/2細胞にレトロウイルスベクターを用いて、VenusおよびVenus-Mkxを導入し、その発現変化をリアルタイムPCRにより調査した。また、軟骨分化および骨分化誘導を行い、Mkx過剰発現による影響について調査した。さらに、その過剰発現細胞を用いて、C3Hマウスの椎間板線維輪への移植を行い、それによる椎間板線維輪の再生について検討を行った。

4. 研究成果

(1) Mkxノックアウトマウスの解析

まず、Mkxの椎間板における発現について調査した。E14.5、E18.5、P1、4週および10週齢のMkx-Venusノックインマウスを用いて、その発現を、GFP抗体を用いた免疫染色により調査した結果、線維輪の外輪側で強いMkxの発現が確認された。Mkxの発現は、E14.5において既に観察された。また、スクリプス研究所との共同研究により、ヒト線維輪でのMKXの発現をリアルタイムPCRにより調査した結果、マウスと同様に、外輪側で高い発現を示した(図1)。

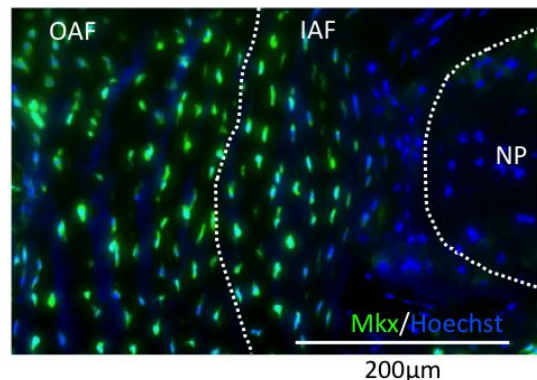


図1 10週齢のマウス椎間板におけるMkxの発現

OAF: outer annulus fibrosus
IAF: inner annulus fibrosus
NP: nucleus pulposus

次に、10週、12ヶ月および21ヶ月齢におけるMkxノックアウトマウスの椎間板の表現型について調査した。10週齢においては、H&E染色およびサフラニン染色の組織像は、見かけ上大きな差は見られなかった。しかし、電子顕微鏡観察を行った結果、コラーゲン原線維の径が、野生型と比較して小さくなっていることがわかった(図2)。12ヶ月齢以降になると、椎間板の強い変性が観察され、21ヶ月齢においては、ノックアウトマウスにおいて骨棘の形成も確認された。

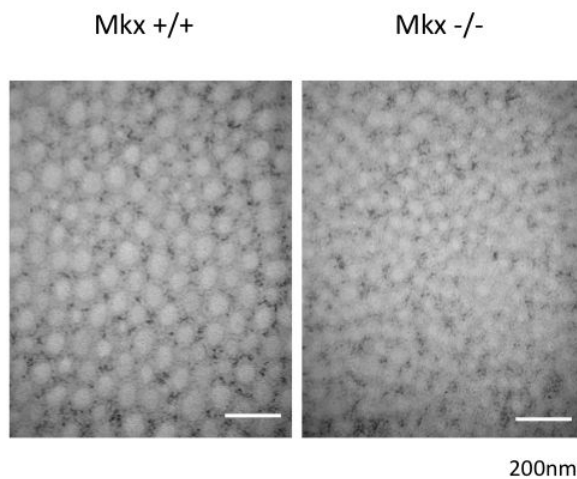


図2 10週齢のマウス椎間板線維輪の電子顕微鏡像

10週齢の野生型およびMkxノックアウトマウスの線維輪外側からプライマリー細胞を樹立・培養し、その線維輪細胞からRNAを抽出し、リアルタイムPCRを行った。その結果、Col1a1、Col1a2、Scxなどの腱・靭帯マーカー遺伝子の発現が低下していることがわかった。

(2) ヒト線維輪細胞でのMKXノックダウンによる効果

ヒト線維輪細胞を用いてMKXをsiRNAによるノックダウンを行い、リアルタイムPCRによる発現解析を行った。その結果、SCXおよびTNMDといった腱・靭帯関連マーカー遺伝子の発現が低下した。一方、SOX9およびACANといった軟骨関連遺伝子の発現が上昇していることがわかった。

(3) C3H10T1/2細胞へのMkx過剰発現によるin vitroおよびin vivoでの効果の検討

マウス間葉系幹細胞株のC3H10T1/2細胞を用いて、Mkx過剰発現による影響について調査した。レトロウイルスベクターを用いてVenusをN末端に付加したMkx(Venus-Mkx)を過剰発現させると、Venusのみを導入した場合と比較して、細胞形態がスピンドル状に

変化することがわかった。Venus-Mkx細胞では、Col1a1、Col1a2、Scxなどの腱・靭帯関連遺伝子の発現が亢進していることがわかり、Mkx導入により、間葉系幹細胞が腱・靭帯様の細胞に変化していることが明らかになった。また、Venus-Mkx細胞では、TGF-βシグナル系のSmad2/3およびTgfrの発現が亢進し、BMPシグナル系のSmad1/8およびBmprの発現が低下することがわかった。さらに、VenusおよびVenus-Mkx細胞を用いて、骨分化、軟骨分化誘導を行ったところ、Venus-Mkx細胞では、骨・軟骨への分化が抑制されることが明らかになった。

TGF-βは、腱の初期発生や腱前駆細胞の維持に重要であるのに対し、BMPは骨・軟骨分化に重要であることが明らかになっているが、MkxはBMPシグナルを抑え、TGF-βシグナルを活性化することで腱・靭帯細胞への分化方向づけ・維持を担っている可能性が示唆された。

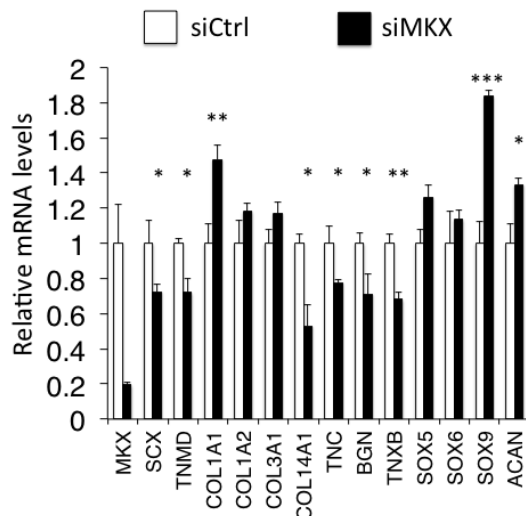


図3 ヒト線維輪細胞におけるMKXノックダウンによる各遺伝子発現の変動

次に、VenusおよびVenus-Mkx細胞を混合したコラーゲンゲルを、C3Hマウス線維輪に穴を空け、移植し、in vivoでのMkx過剰発現細胞の機能について調査した。その結果、Venus-Mkxを導入した細胞を移植した場合、Venus細胞と比較して形成されたコラーゲン繊維の原線維の径が大きくなっていることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

すべて査読有り

Onizuka N, Ito Y, Inagawa M,

Nakahara H, Takada S, Lotz M, Toyama Y, Asahara H. The Mohawk homeobox transcription factor regulates the differentiation of tendons and volar plates. **J Orthop Sci**. Jan;19(1):172-80. 2014
Takada S, Sato T, Ito Y, Yamashita S, Kato T, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, Igarashi A, Kato T, Tamano M, Asahara H. Targeted gene deletion of miRNAs in mice by TALEN system. **PLoS One**. Oct 16;8(10):e76004. 2013
Shimizu H, Kubo A, Uchibe K, Hashimoto M, Yokoyama S, Takada S, Mitsuoka K, Asahara H. The AERO system: a 3D-like approach for recording gene expression patterns in the whole mouse embryo. **PLoS One**. Oct 16;8(10):e75754. 2013
Nakahara H, Hasegawa A, Otabe K, Ayabe F, Matsukawa T, Onizuka N, Ito Y, Ozaki T, Lotz MK, Asahara H. Transcription factor Mohawk and the pathogenesis of human anterior cruciate ligament degradation. **Arthritis Rheum**. Aug;65(8):2081-9. 2013

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅原 弘嗣(Hiroshi Asahara)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：70294460

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：