

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791540

研究課題名(和文) 運動器連結システムの構築におけるコラーゲン線維形成の機能的役割

研究課題名(英文) The functional roles of collagen fibrillogenesis in tendons and ligaments during establishment of the musculoskeletal system

研究代表者

滝本 晶 (Takimoto, Aki)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定助教

研究者番号：00378902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：腱による骨格及び筋肉の機能的連結は、運動器としての組織構築に極めて重要であるが、連結部の形成機構はほとんど解明されていない。本研究では、コラーゲン線維形成に必要な分子シャペロンHsp47を腱特異的に欠失するconditional knockout (CKO)マウスを作成し、運動器の連結におけるコラーゲン線維形成の役割を解析した。CKOマウスでは、胎生期において腱組織のコラーゲン線維形成が著しく抑制されていたが、細胞による運動器の連結は維持されていた。従って、胎生期における運動器の連結部形成には、コラーゲン線維形成以前に構築されている細胞間の連結が重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Establishment of the musculoskeletal connections is critical for the formation of functional locomotive system. However, the molecular mechanism underlying the formation of entheses or musculo-tendinous junctions remains largely unknown. In this study, we generated mice lacking Hsp47, a collagen-specific molecular chaperon, and investigated how collagen fibrillogenesis in tendons affects the formation of the musculoskeletal connections. The tendon-specific Hsp47 conditional knockout mice exhibited drastic reduction of collagen fibers in tendons, while the cells expressing tendon-specific markers were still observed at the connection sites. Our results suggest that intercellular connections between tendon cells formed prior to the collagen fibrillogenesis play a crucial role in the establishment of musculoskeletal system during embryogenesis.

研究分野：発生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：腱・靭帯 コラーゲン線維

1. 研究開始当初の背景

運動器の形成過程では、骨格、筋肉、及び腱・靭帯の原基は、独立した細胞集団として出現する。発生の進行に伴って各原基は細分化され、それと同時に骨格及び筋肉は腱・靭帯組織によって機能的に連結される。腱と筋肉との連結部ではコラーゲン線維と共にラミニン等の基底膜成分が介在して Myotendinous junction (MTJ) が形成される。一方、骨格系組織との連結部である Enthesis では、部位によっては線維軟骨を介して、腱・靭帯のコラーゲン線維が骨または軟骨組織の細胞外基質に入り込むことで運動器を連結する。このような連結部の組織構築は、運動器の機能において重要な役割を担っているが、腱と筋肉及び骨格組織との連結部の形成機構に関してはほとんど解明されていない。

コラーゲンは、細胞内において小胞体中存在する分子シャペロン heat-shock protein 47 (Hsp47) によりプロセシングされた後、分泌される (Journal of Cell Biology 150, 1499-1505, 2000)。Hsp47 遺伝子の Knockout マウス胚では、I 型及び IV 型コラーゲンの生合成が消失することから、主に I 型コラーゲンで構成される腱・靭帯のコラーゲン線維は、Hsp47 の欠失により消失すると考えられた。腱・靭帯細胞により形成されるコラーゲン線維は、運動器の強靭な連結に中心的な役割を担っていることから、Hsp47 を腱・靭帯特異的に欠失させることにより、コラーゲンを介した運動器の連結のプロセスを詳細に解析できると考えられた。

2. 研究の目的

腱・靭帯細胞により形成されるコラーゲン線維は、運動器の強靭な連結に中心的な役割を担っている。本研究では、Hsp47 の欠損により、腱・靭帯のコラーゲン線維を欠失した Conditional Knockout (CKO) マウスを作製し、コラーゲン線維による運動器の連結のプロセスを解析することを目的とした。また、運動器の連結における腱・靭帯を介した組織間の相互作用を明らかにすることにより、運動器の損傷における治療や再生に必要な知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

コラーゲン線維形成に必要な分子シャペロン Hsp47 を欠失させるため、Hsp47-loxP マウスを使用した。さらに、腱・靭帯特異的な遺伝子欠失を誘導するため、Scleraxis (Scx) の遺伝子発現を制御する領域を用いて Cre recombinase を発現する ScxCre トランスジェニックマウス (ScxCre Tg) または ScxCre ノックインマウス (ScxCre KI) を使用した。マウスの運動器の組織形態を観察するため、それぞれのマウスで骨格標本作製した。

さらに組織切片を作製し、Masson's trichrome 染色及び TUNEL 法により解析した。腱・靭帯、骨芽細胞、及び軟骨細胞の分化マーカーの発現は、*in situ* hybridization 及び免疫染色により解析した。小胞体ストレスマーカー分子である Bip/GPR78 の発現は、免疫染色により検出した。

4. 研究成果

(1) ScxCre Tg あるいは ScxCre KI と Hsp47-loxP マウスを交配して得られた CKO マウスの腱・靭帯組織においては、Masson's trichrome 染色で染色されるコラーゲン線維の減少が認められた。特に ScxCre Tg; Hsp47^{lox/lox} マウスでは、胎生期において腱・靭帯のコラーゲン線維形成がほとんど認められず、出生直後に死亡した。一方、ScxCre KI; Hsp47^{lox/lox} マウスでは、腱・靭帯のコラーゲン線維形成の低下は部分的であり、出生後も生存していた。このような結果から、本研究では、主に ScxCre Tg により得られた CKO マウスを解析した。

(2) ScxCre Tg; Hsp47^{lox/lox} のマウス胚から組織切片を作製し、Masson's trichrome 染色により解析した結果、筋組織の統合性に異常が認められた。発生過程において、筋原基は腱原基と共に細分化し、最終的に腱から移行する筋上膜によって筋線維束が統合され、個々の骨格筋となることが知られている (Development 125, 4019-4032, 1998)。従って、腱のコラーゲン線形成は筋組織の統合性を決定又は維持する重要な働きを担っていることが示唆された。そこで、マウス胚の連続切片を Masson's trichrome 染色し、得られた画像を三次元構築することにより、腱組織と筋組織の位置関係を解析した。その結果、コントロールマウス胚では、腱組織に連続するコラーゲン線維が個々の筋組織を隔てている状態が観察された。一方、ScxCre Tg; Hsp47^{lox/lox} のマウス胚では、腱組織だけでなく、腱組織から連続する筋組織間のコラーゲン線維もほとんど形成されず、それにより筋組織の統合性が異常となっていることが明らかになった。

(3) 出生直後のマウスのアキレス腱を電子顕微鏡により解析した結果、ScxCre Tg; Hsp47^{lox/lox} マウスの腱組織においては、細胞外に形成されるコラーゲン fibril が著しく減少し、異常な形態の粗面小胞体が発現していた。ScxCre Tg; Hsp47^{lox/lox} マウス胚の後肢を TUNEL 法により解析した結果、腱原基から未成熟な腱組織が形成される胎生 13.5 日目において、一部の腱の細胞集団がアポトーシスを起こしていることが明らかになった。さらに、ScxCre

Tg;Hsp47^{flox/flox} マウス胚の腱組織においては、小胞体ストレスマーカーである Bip/GPR78 の発現上昇が認められた。従って、*Hsp47* の欠損は、単にコラーゲン線維の形成を阻害するだけでなく、小胞体ストレスを上昇させることにより、腱細胞の生存にも影響することが明らかになった。

(4) 骨芽細胞や軟骨細胞においては、小胞体ストレスの上昇が分化状態にも影響を及ぼすことが報告されている (Nature Cell Biology 10, 1197-1204, 2009, Nature Cell Biology 10, 1205-1211, 2009)。そこで、*ScxCre Tg;Hsp47^{flox/flox}* マウス胚の腱・靭帯細胞において、軟骨細胞及び骨芽細胞のマーカー分子の発現を免疫染色により解析し、腱・靭帯細胞の分化転換の可能性について検討した。しかし、*ScxCre Tg;Hsp47^{flox/flox}* マウス胚の腱・靭帯組織において、これらのマーカー分子の異所性発現は検出されず、さらに *In situ* hybridization による解析では、*Scx* 及び *Tenomodulin* の発現は大部分の腱・靭帯組織において維持されていた。*Scx* 及び *Tenomodulin* の発現レベルは、コラーゲン線維形成が著しく抑制された *ScxCre Tg;Hsp47^{flox/flox}* マウス胚においてもコントロールと同程度のレベルで維持されていたことから、*Hsp47* の欠損による小胞体ストレスの上昇は、腱・靭帯細胞の分化には顕著な影響を与えないことが示唆された。

(5) *ScxCre Tg;Hsp47^{flox/flox}* マウス胚の腱・靭帯組織においては、組織形成の初期段階において、一部の細胞集団がアポトーシスを起こしていた。このことから、腱・靭帯細胞の小胞体ストレスに対する感受性は、分化段階や存在部位によって異なっている可能性が示唆された。現在、申請者らは腱・靭帯細胞の分化・生存と小胞体ストレスとの関係について詳細に調べるため、誘導型 Cre (*ScxCreERT2 Tg*) によって腱・靭帯細胞の *Hsp47* を欠失する CKO マウスを作製し、解析を進めている。

(6) 本研究で得られた CKO マウスでは、胎生期において腱・靭帯組織のコラーゲン線維形成が著しく抑制されていた一方で、MTJ 及び Enthesis においては、腱・靭帯と筋肉または骨格との連結が維持されていた。従って、胎生期における運動器の連結には、コラーゲン線維形成以前に構築されている腱・靭帯細胞間の連結が重要な役割を果たしていることが示唆された。成熟な組織では、腱・靭帯組織は Enthesis や MTJ も含めて全てが連続した一様の組織像として観察される。しかし、運動器全体の牽引及び圧迫の力学負荷に対応する必要性から、腱・靭帯を構成する細胞の性質や分化状態は、部位によって異なっていると考えられ

る。申請者らは、腱・靭帯の形成過程において、線維軟骨等の特殊な細胞集団がいつどのようにして生み出されるのかに着目し、現在解析を進めている。

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1件)
Sugimoto Y, Takimoto A, Hiraki Y, Shukunami C. Generation and characterization of *ScxCre* transgenic mice. Genesis, 査読有, 2013; 51(4):275-283

[学会発表](計2件)
滝本晶, 宿南知佐, 川津正慶, 清流正弘, 山本照子, 開祐司. 歯根膜における Scleraxis の発現とその制御. 第30回日本骨代謝学会学術集会. 2012年7月, 東京.

川津正慶, 宿南知佐, 滝本晶, 岩崎将也, 清流正弘, 池田悦子, 山本照子. 矯正の歯の移動モデルを用いた歯根膜における Scleraxis の機能解析. 第71回日本矯正歯科学会. 2012年9月, 岩手.

[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:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te01/index-j_1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝本 晶 (TAKIMOTO, Aki)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユ
ニット・特定助教

研究者番号：00378902

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし