

令和元年6月28日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15679

研究課題名（和文）腱・靭帯を見分けるmolecular signatureの探索

研究課題名（英文）Search for molecular signatures that discriminate between tendon and ligament tissue

研究代表者

二藤 彰 (NIFUJI, AKIRA)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：00240747

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：腱と靭帯は形態学的には極めて類似しているが、力学的な機能は異なっており、分子的な相違も想定されるが、不明な点が多い。本研究では腱組織と靭帯組織を分離し、in vivoとin vitroでそれぞれの遺伝子発現の比較をすることで、差として得られるものをmolecular signatureの候補とすることを目指した。それらの候補は腱組織において力学的な刺激に対する転写活性の変化が見られるか、さらに成長因子TGFβ2に対する応答性があるか、という点から候補分子の機能の推定を行った。これらにより、力学的な刺激ならびに成長因子に対する応答性の異なる、複数の候補分子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱組織は骨と筋肉を連結する組織であり、筋肉からの収縮 - 伸張サイクルの影響を受け長さが変化する。一方靭帯組織は関節を形成する骨と骨を連結し運動を制御する制動器官としての働きをもつ。ともに線維性結合組織を主たる成分とし、力学的負荷に対応する構造を持つが、それらを区別できる分子（群）があるか否かについては不明である。本研究で行った転写産物の解析から、いくつかの分子（群）が、異なる発現量を示すこと、それらが力学的負荷に対応する変化を示すことが解った。これらの知見は腱・靭帯に関わる疾患への基礎的基盤に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our aging population will increase the prevalence of musculoskeletal diseases, so the importance of tendon and ligament tissue that support muscles and skeletons is recognized. Tendon and ligament tissues are morphologically similar, but their functional properties seem to be different. This study aimed to search for molecular signatures that can discriminate molecular differences between the two tissues. By dissecting mouse tendon and ligament tissues, we compared whole transcripts of two tissues by RNA sequencing. We also compared the transcripts which were expressed in the primary cells isolated from those tissues. We found groups of transcripts differentially expressed between two tissues. The expressions of some transcripts changed after mechanical loading, and treatment with TGFβ2 resulted in changes of those transcripts in tenocytes. Thus those newly identified genes could be functional in tendon and/or ligament tissues.

研究分野：骨格系組織の発生分化

キーワード：腱組織 靭帯組織 転写産物 力学的負荷

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の到来により筋骨格系の疾病は増加しており、筋と骨格を支える腱・靭帯機能の重要性が再認識されている。腱と靭帯はほぼ直走する強靱なコラーゲン線維を主体とする線維性結合組織であり、形態学的には極めて類似している。しかし電子顕微鏡レベルで観察した線維束構造には明らかな形態的相違が見られ、構造的な相違が腱と靭帯の力学的な機能の相違をもたらすと推察される。

構造と力学的機能の相違の解明は靭帯と腱の発生理解に極めて重要である。しかし腱特異的分子として同定・クローニングされた、Scx, Mxk, Egr, Tnmd などの遺伝子欠損マウスで、腱・靭帯の分化・維持への影響は、ほぼ一括りに評価されてきた。様々な成長因子 (FGF, PDGF, TGF- $\beta$ , BMP など) が腱や靭帯細胞の分化形質や増殖に与える影響についても同様であり、細胞機能や molecular signature について、腱と靭帯を比べた研究は少ない。

研究代表者は骨・軟骨ならびにそれを維持する腱・靭帯の発生・分化機構の解明に焦点を当てている。組織構造的に類似した腱と靭帯は、骨格系組織の発生において、異なる力学的要求に答える組織として形成される。そして、そのような組織の発生・分化機構を知るために、マウスの腱・靭帯細胞の分離を試みてきた。その結果、マウスから高い増殖能を維持した腱と靭帯細胞を分離培養できる条件を同定できたため (Histochem Cell Biol 2014)、それを応用し分子的・機能的差異の解明を目指す本研究計画を着想した。

### 2. 研究の目的

解剖学的には骨と筋、あるいは骨と骨をつなぐ組織をそれぞれ腱、靭帯と呼ぶが、細胞・分子レベルでの違いについては不明な点が多い。本研究では腱・靭帯を見分ける molecular signature (発現分子の差) があるかという課題に取り組むことを目的とする。

### 3. 研究の方法

マウスを用い、解剖学的に容易に見分けのつく、長趾屈筋腱と膝内側側副靭帯それぞれから腱組織、靭帯組織を分離し、RNA を抽出した。また同時にこれらの組織からわれわれの開発したゲル培養法によりそれぞれ腱細胞、靭帯細胞の培養を行い、RNA を抽出し、RNAseq 解析を行った。さらに差があった分子について、力学的負荷時の反応性を調べ、さらに分化調節に働くと考えられる成長因子 TGF $\beta$ 2 に対する反応性の差異を調べた。

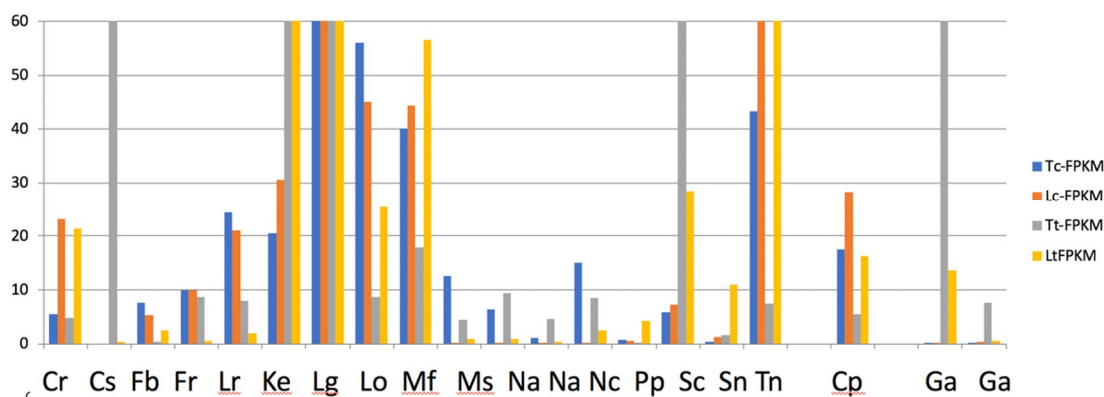
### 4. 研究成果

長趾屈筋腱と膝内側側副靭帯それぞれの組織ならびに細胞を分離し、RNA を抽出後、その違いについて転写産物の網羅的比較をしたところ、比較しうる約 3 万の転写産物が得られた。それらからさらに絞り込むために、in vivo での腱組織における発現変動が見られるものを、Gene Expression Omnibus (GEO) repository gene expression Data Sets (National Center for Biotechnology Information) において検索した。いくつか検討したがその中で、GSE120027 は in vivo で成体マウスアキレス腱に負荷を行ったのちの発現プロファイルを比較した Data Sets であり、本研究に有用であると判断した。

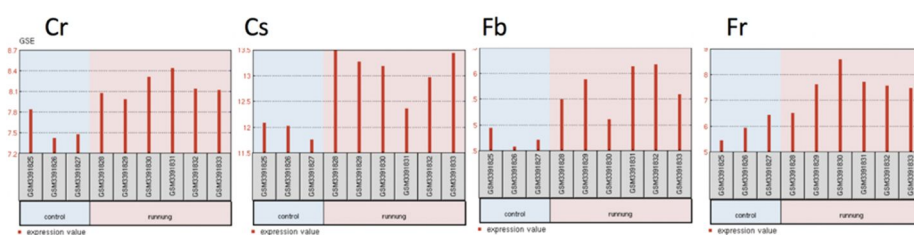
コントロールと力学的負荷時における発現を比較し、約 4 万超の転写産物のうち adjusted P Value が低値であるものを中心に選択した。次にそれらと、本研究の RNAseq Data Sets で Z-score of M-values per gene で並べたものの上位のものと比較した。両方で共通して見られたものは、腱・靭帯に発現の差がみられしかも、力学的負荷に応答して変化が見られるものと判断し、それらのうちまず 22 遺伝子を選択した。それらのうち、代表的なものの発現を図 1 に示し、力学的負荷時における発現を図 2 A、B に示す。腱組織、靭帯組織での発現を Lt、Tt でそれぞれ表す。靭帯組織で高く、腱組織への力学的負荷によって発現抑制が認められるものは、靭帯組織で機能していることが推察される (図 1, 2 における Pp Sn)。またそれとは逆に、腱組織で高く、腱組織への力学的負荷によって発現増強が認められるものは、腱組織における積極的な機能が推察される (図 1, 2 における Cs、Fr、Sc)。

腱細胞は TGF $\beta$  に反応して、より分化が進むと報告されている。実際我々は初代腱細胞に TGF $\beta$  2 を作用させると、腱特異的な転写因子 Scleraxis の発現が上昇することを観察している。そこで前記 22 遺伝子のうち 16 遺伝子に対する TGF $\beta$  2 の影響を調べたところ、2 遺伝子の発現が増加し、11 遺伝子の発現は抑制され、多くが TGF $\beta$  に反応して発現制御を受けることが判明した。注目すべきことに靭帯組織で機能していることが推察される Pp Sn でも顕著に発現抑制されていた。また多くが細胞外マトリックスの形成、修飾、分解、リモデリングに関わる分子であり、このことは 2 つの組織の細胞外成分の違いを反映している可能性が示された。以上のことから本研究で見出された分子が機能し、その発現量の差異が、組織の性質や機能の差を反映を示す可能性が示唆された。

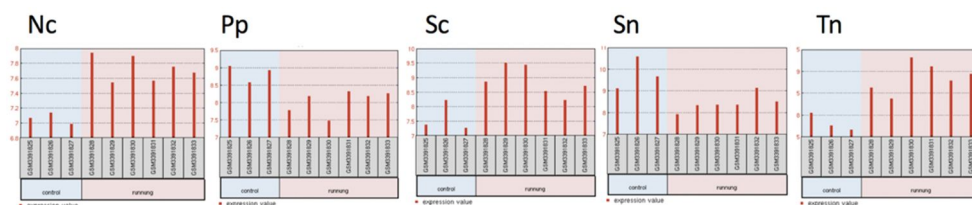
☒ 1



☒ 2 A



☒ 2 B



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1 Shimada A, Ideno H, Arai Y, Komatsu K, Wada S, Yamashita T, Amizuka N, Pöschl E, Brächvogel B, Nakamura Y, Nakashima K, Mizukami H, Ezura Y, Nifuji A.

Annexin A5 Involvement in Bone Overgrowth at the Enthesis.

J Bone Miner Res. 査読有り, 2018,33(8):1532-1543. doi: 10.1002/jbmr.3453.

2 Hayashi N, Sato T, Kokabu S, Usui M, Yumoto M, Ikami E, Sakamoto Y, Nifuji A, Hayata T, Noda M, Yoda T.

Possible association of oestrogen and Cryba4 with masticatory muscle tendon-aponeurosis hyperplasia.

Oral Dis. 査読有り, 2018, 23. doi: 10.1111/odi.12876.

3 Kamiunten T, Ideno H, Shimada A, Arai Y, Terashima T, Tomooka Y, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M, Nifuji A.

Essential roles of G9a in cell proliferation and differentiation during tooth development.

Exp Cell Res. 査読有り, 2017, 357(2):202-210. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.05.016.

4 Kawasaki M, Izu Y, Hayata T, Ideno H, Nifuji A, Sheffield VC, Ezura Y, Noda M.

Bardet-Biedl syndrome 3 regulates the development of cranial base midline structures.

Bone. 査読有り, 2017,101:179-190. doi: 10.1016/j.bone.2016.02.017.

5 Huynh NC, Everts V, Nifuji A, Pavasant P, Ampornaramveth RS.

Histone deacetylase inhibition enhances in-vivo bone regeneration induced by human periodontal ligament cells.

Bone. 査読有り, 2017,95:76-84. doi: 10.1016/j.bone.2016.11.017.

6 Komatsu K, Shibata T, Shimada A, Ideno H, Nakashima K, Tabata Y, Nifuji A.

Cationized gelatin hydrogels mixed with plasmid DNA induce stronger and more sustained gene expression than atelocollagen at calvarial bone defects in vivo.

J Biomater Sci Polym Ed. 査読有り, 2016;27(5):419-30. doi:10.1080/09205063.2016.1139486.

7 Pawaputanon Na Mahasarakham C, Ezura Y, Kawasaki M, Smriti A, Moriya S, Yamada T, Izu Y, Nifuji A, Nishimori K, Izumi Y, Noda M.

BMP-2 Enhances Lgr4 Gene Expression in Osteoblastic Cells.

J Cell Physiol. 査読有り, 2015,31(4):887-95. doi:10.1002/jcp.25180.

<sup>8</sup> Ideno H, Nakashima K, Nifuji A.

Roles of the histone methyltransferase G9a in the development and differentiation of mesenchymal tissues.

J Phys Fitness Sports Med, 査読有り,2015,4(5) : 001-006、doi:10.7600/jpfsm.4.000

[学会発表](計35件)

<sup>1</sup> Ideno H, Komatsu K, Nakashima K, Arai Y, Ezura Y, Nifuji A Annex5 suppresses excessive entheses calcification induced by mechanical loading, possibly through regulating extracellular pyrophosphate. 第36回日本骨代謝学会学術集会、2018年

<sup>2</sup> Ideno H, Arai Y, Komatsu K, Nakashima K, Wada S, Yamashita T, Ernst Pöschl, Bent Brachvogel, Ezura Y, Nifuji A.: "Annexin A5 prevents force-mediated bone ridge overgrowth at the enthesis" 第40回米国骨代謝学会(ASBMR) 2018年

<sup>3</sup> 出野 尚、小松浩一郎、中島和久、新井嘉則、立花 誠、木村 宏、二藤 彰: ヒストンメチル化酵素 G9a による骨芽細胞分化における Runx2 の転写活性化能の制御. 第41回日本分子生物学会年会、2018年

<sup>4</sup> 出野 尚、新井嘉則、和田悟史、中島和久、小松浩一郎、山下照仁、江面陽一、二藤 彰: Annexin A5 による力学的負荷を介した腱・靭帯付着部(enthesis)石灰化の制御. 第4回日本アネキシン研究会、2018年

<sup>5</sup> Shimada A., Arai Y., Komatsu K., Wada S., Ideno H., Nakashima K., Yamashita T., Ezura Y., Amizuka N., Pöschl E., Brachvogel B., Nakamura Y., Nifuji A.: "Annexin A5 prevents force-mediated bone ridge overgrowth at the enthesis." Cold Spring Harbor Lab meeting, Annexins: 9th International Conference on the Annexins、2017年

<sup>6</sup> Ideno H, Komatsu K, Shimada A, Arai Y, Nakashima K, Tachibana M, Kimura H, Nifuji A.: "Histone methyltransferase G9a is essential for osteoblastic differentiation and skull bone formation during development" 第57回米国細胞生物学会議(ASCB) 2017年.

<sup>7</sup> 出野 尚、上運天太一、島田明美、寺島達夫、中島和久、友岡康弘、中村芳樹、木村 宏、立花 誠、二藤 彰: ヒストンメチル化酵素 G9a はマウス歯胚の増殖と分化を制御する. 第35回日本骨代謝学会学術集会、2017年

<sup>8</sup> 島田明美、新井嘉則、小松浩一郎、和田悟史、出野 尚、中島和久、山下照仁、江面陽一、網塚憲生、中村芳樹、二藤 彰: 腱・靭帯付着部(enthesis)において Annexin A5 は線維軟骨の分化を負に制御する. 第35回日本骨代謝学会学術集会、2017年

<sup>9</sup> 島田明美、新井嘉則、和田悟史、出野 尚、中島和久、小松浩一郎、山下照仁、江面陽一、網塚憲生、中村芳樹、二藤 彰「Annexin a5 による腱・靭帯付着部(enthesis)における線維軟骨層の石灰化の制御」第34回日本骨代謝学会学術集会、2016年

<sup>10</sup> 出野 尚、上運天太一、島田明美、中村芳樹、中島和久、木村 宏、立花 誠、二藤 彰「マウス歯牙形成過程におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能 Essential roles of H3K9MTase G9a during tooth development」第34回日本骨代謝学会学術集会、2016年

<sup>11</sup> 和田悟史、出野 尚、島田明美、上運天太一、中村芳樹、中島和久、木村 宏、眞貝洋一、立花誠、二藤 彰「ヒストンメチル化酵素 G9a は腱組織の正常な発生に必要である」第58回歯科基礎医学会学術大会、2016年

<sup>12</sup> 出野 尚、小松浩一郎、島田明美、新井嘉則、中島和久、荒木良子、安倍真澄、立花 誠、木村 宏、二藤 彰「ヒストンメチル化酵素 G9a の骨芽細胞分化における機能」第39回日本分子生物学会年会、2016年

<sup>13</sup> 和田悟史、出野 尚、島田明美、上運天 太一、中村芳樹、中島和久、木村 宏、眞貝洋一、立花 誠、二藤 彰「腱組織形成におけるヒストンメチル化酵素 G9a の機能」第39回日本分子生物学会年会、2016年

<sup>14</sup> 島田明美、新井嘉則、和田悟史、出野 尚、中島和久、小松浩一郎、山下照仁、江面陽一、中村芳樹、二藤 彰 Annexin a5 による腱・靭帯付着部(enthesis)における骨の増大 第2回 アネキシン研究会年会 2016年

<sup>15</sup> 島田明美、小松浩一郎、新井嘉則、大貫芳樹、中島和久、山下照仁、奥村 敏、二藤 彰、アネキシン A5 欠損マウスは歯の咬耗と腱付着部における顎骨の肥大を呈する、第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年

<sup>16</sup> Shimada A, Arai Y, Wada S, Ideno H, Kamiunten T, Nakashima K, Komatsu K, Yamashita T, Ezura Y, Amizuka N, Pöschl E, Brachvogel B, Nakamura Y, Nifuji A 「Annexin A5 inhibits bony outgrowth at tendon/ligament insertion sites.」 ASBMR 2015 annual meeting、2015年

<sup>17</sup> Wada S, Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Nakamura Y, Nakashima K, Kimura H, Tachibana M, Nifuji A. 「Histone 3 lysine 9 methyltransferase G9a is essential for the growth and differentiation of tenocytes.」 ASBMR 2015 annual meeting、2015年

<sup>18</sup> Ideno H, Komatsu K, Shimada A, Kamiunten T, Arai Y, Nakashima K, Araki R, Nakamura Y, Abe M, Tachibana M, Kimura H, Nifuji A. 「Deletion of G9a, histone methyltransferase, causes impaired bone formation.」 ASM 2015, Joint ANZBMS, MEPSA and MBSANZ Annual Scientific Meeting、2015年

<sup>19</sup> 和田悟史、出野 尚、島田明美、上運天太一、中村芳樹、中島和久、木村 宏、眞貝洋一、立花 誠、二藤 彰 「ヒストンメチル化酵素 G9a 遺伝子欠損による腱の形成阻害」第38回日本

分子生物学会、2015年

<sup>20</sup> Ideno H, Komatsu K, Shimada A, Kamiunten T, Arai Y, Nakashima K, Araki R, Nakamura Y, Abe M, Tachibana M, Kimura H, Nifuji A. 「Histone methyltransferase G9a is essential to progress osteoblastic differentiation in vitro, and skull bone formation in vivo」ASCB、2015年

<sup>21</sup> 島田明美、新井嘉則、和田悟史、出野 尚、上運天太一、中島和久、小松浩一郎、山下照仁、江面陽一、網塚憲生、中村芳樹、二藤 彰 「Annexin a5 による腱・靭帯付着部 (enthesis) における骨形成の調節」第33回日本骨代謝学会学術集会、2015年

<sup>22</sup> 和田悟史、出野 尚、島田明美、上運天太一、中村芳樹、中島和久、木村 宏、立花 誠、二藤 彰 「ヒストンメチル化酵素 G9a は腱細胞の増殖および分化に必須である」第33回日本骨代謝学会学術集会、2015年

<sup>23</sup> 出野 尚、小松浩一郎、島田明美、上運天太一、新井嘉則、中島和久、荒木良子、中村芳樹、安倍真澄、立花 誠、木村 宏、二藤 彰 「ヒストンメチル化酵素 G9a 欠損マウスは骨形成阻害を示す」第33回日本骨代謝学会学術集会、2015年

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：江面 陽一

ローマ字氏名：EZURA, Yoichi

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：難治疾患研究所

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50333456

研究分担者氏名：荒木 良子

ローマ字氏名：ARAKI, Ryoko

所属研究機関名：国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所

部局名：放射線障害治療研究部

職名：チームリーダー(定常)

研究者番号(8桁)：40392211

研究分担者氏名：中島 和久

ローマ字氏名：NAKASHIMA, Kazuhisa

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：90252692

研究分担者氏名：島田 明美

ローマ字氏名：SHIMADA, Akemi

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：00389813

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。