

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791532

研究課題名(和文) 腱細胞培養系の樹立と腱細胞分化における新規マイクロRNAの同定

研究課題名(英文) Establishment of culture system for tenocyte and identification of novel micro RNA in tenocyte differentiation

研究代表者

伊坪 敏郎 (ITSUBO, Toshiro)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90467168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、マイクロRNA(miRNA)が細胞の分化において重要な役割を担っていることが報告されているが、腱細胞に特異的なmiRNAは未だ同定されていない。我々はマウス筋芽細胞株をGDF8で刺激することで、腱細胞への分化がSmad2/3シグナルを介して誘導されることを発見した。本培養系を用いたマイクロアレイによる解析では、miR-214を含む計8つのmiRNAの発現が分化誘導後に増加している事が確認され、さらにmiR-214の標的遺伝子候補としてSmad7が検出された。Smad7はSmad2/3シグナルを抑制する因子であることから、miR-214が腱細胞の分化を促進している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, microRNAs(miRNAs) have been emerged as important regulators in cell differentiation, but miRNA which regulates tenocyte differentiation has not been identified. We found that GDF8 promoted differentiation of mouse myoblast cell line into tenocyte through Smad2/3 signaling. Microarray assay showed that expression of eight miRNAs, including miR-214, increased after induction of tenocyte differentiation and Smad7 was identified as miR-214 target gene. Since Smad7 is negative regulator of Smad2/3 signaling, our data suggest that miR-214 promotes tenocyte differentiation.

研究分野：整形外科

キーワード：腱細胞 GDF8 筋芽細胞株 マイクロRNA 標的遺伝子 Smad7

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの腱縫合の基礎研究は、腱縫合モデルを用いた縫合方法、抗張力の変化、摩擦力などに関する研究が主流であり、成績不良例の根絶、後療法単純化、治癒期間の短縮を得るには従来の生体力学的研究では限界がある。新たなアプローチとして腱の癒合機序を分子生物学レベルで解明し治療に応用する方法が模索されるべきである。

屈筋腱の治癒過程において、実際の臨床の場では intrinsic healing の機序以外に滑膜などの周辺組織から細胞が損傷部位に遊走し治癒を促進させる extrinsic healing の機序も働いている。extrinsic healing が強いと癒着が生ずるため、臨床成績を向上させるには intrinsic healing の機序を増強させる必要がある。しかし腱組織に存在する細胞の数は他組織に比べ少なく、intrinsic healing の機序を促進する事は困難であると考えられてきた。近年、腱組織内にも幹細胞が存在する事実が明らかとなったが、腱の治癒過程における幹細胞から腱細胞への分化・増殖の分子生物学的機序は不明である。

2008年以降、骨、軟骨、筋肉など腱以外の間葉系組織に特異的なマイクロRNA(miRNA)があいついで同定され、miRNAがそれらの組織における細胞の分化・増殖をコントロールしていることが明らかにされた。近年ではそれらmiRNAの働きを人工的にコントロールする事を目的とした核酸医薬開発の試みもなされている。他組織と同様、miRNAが腱細胞の分化・増殖に重要な役割を果たしていることが予想されるが、腱細胞に特異的なmiRNAは未だ同定されていない。その要因の一つとして in vitro で腱細胞の分化を再現性よく観察する標準的培養系が未だ確立されていないことが挙げられる。

一方、マウスの未分化間葉系細胞株であるC3H10T1/2がSmad8の活性化により腱細胞に分化することが既に報告されている。この研究は腱細胞の分化に関わるシグナル分子の流れを明らかにしたが、Smad8の上流で活性化を促進する増殖因子を同定するまでには至らなかった。GDF6とGDF7はin vivoにおいて腱や靭帯様の組織を再生させる働きがあることや、in vitroの系においてSmad1/5/8を活性化させる機能を持つことが確認されている。またGDF8ノックアウトマウスでは腱は細く脆弱であることや、GDF8添加により腱組織由来線維芽細胞における腱細胞の分化マーカーの発現が認められるとの報告もある。我々はこれらの増殖因子と未分化間葉系細胞の最適な組み合わせを見つけることにより効率的かつ再現性の高い腱細胞培養系を確立できる可能性が高いと考える。さらに、この培養系を用いることにより、in vivoでは困難な分化誘導前後でのサンプルの回収が可能となり、腱細胞の分化の前後で発現量が大きく変化するmiRNA、すなわち腱細胞の分化に関わる可能性のあるmiRNAを

検出する可能性がより高まることが予想される。

### 2. 研究の目的

本研究では、未分化間葉系細胞株から腱細胞への分化を効率的に観察できる培養系を確立し、同培養系を用い腱細胞の分化に際して特異的に発現量が変化するmiRNAを検出、その機能を解析して腱細胞の分化のコントロールと腱組織の再生医療への可能性を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) マウス未分化間葉系細胞株であるC3H10T1/2はSmad8の活性化により、腱細胞へ分化することが知られている。またマウス筋芽細胞株であるC2C12も多分化能を持つ一方で、腱細胞のマーカーも既に発現していることが知られている。両細胞株を維持培養後、GDF5, 6, 7, 8を添加し腱細胞への分化の状態を観察した。その際、増殖因子の濃度ならびに刺激時間についても検討を行った。腱細胞への分化状態の評価には、リアルタイムPCRによる腱細胞特異的マーカー(Tenomodulin)の定量を行った。また他の間葉系細胞の分化マーカーについても定量を行った。

(2) (1)の結果、最も腱細胞の分化が効率よく観察できた細胞株と増殖因子の組み合わせにおいて、細胞の形態学的な評価と免疫組織学的解析を行い、ウェスタンブロットにより腱細胞マーカーの蛋白レベルでの発現量を調べた。また腱細胞の分化に関与するシグナル伝達経路を同定する目的で、候補となる各シグナル伝達経路の阻害剤を用いて腱細胞分化に与える影響を調べた。

(3) 同培養系において、腱細胞の分化誘導前後でRNAを回収し、マイクロアレイにより発現量が2倍以上増加するmiRNAを検出。データベース上のプログラム(MiRanda, TargetScan, DIANA MicroT Analyzer)を用いて腱細胞分化に影響を与える可能性があるmiRNAとその標的遺伝子の検出を行った。腱細胞の分化に関与する可能性があるmiRNAについては、その標的遺伝子とともにリアルタイムPCRにより発現量の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 当初、血清入の培養液を用いて実験を行っていたが、いずれの増殖因子においても腱細胞の分化マーカーの有意な発現上昇が観察できなかったため、無血清条件下での培養が可能であるC2C12を対象を絞り、無血清培養下で同様の実験を行った。その結果、GDF8による刺激では他の増殖因子と比較し腱細胞分化マーカーであるTenomodulinの発現量が著しく上昇する事が確認された。(図1)また同条件下では過去の報告と同様、筋細胞の分化マーカーの発現も抑制されていた。

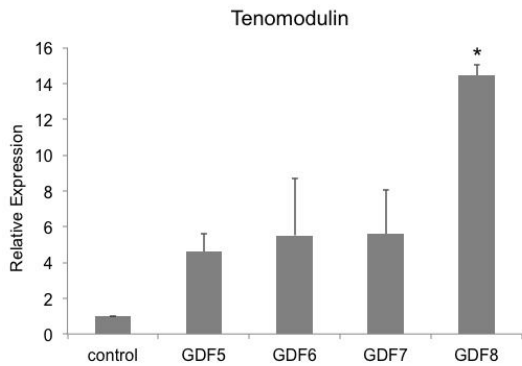


図1 GDF8はTenomodulinの発現を最も効率よく促進する

(2) 組織学的には、無血清培地でのみの培養条件下では、マイオチューブの形成を認めたが、GDF8の刺激によりマイオチューブの形成は抑制され、腱細胞様の紡錘形細胞が観察された。免疫組織学的には、GDF8の刺激により大部分の細胞でMyogeninの発現が抑制され、Tenomodulinの発現が誘導されていた。(図2) また蛋白レベルでの腱細胞分化マーカーの発現については、無血清培地のみで培養したものと比較し、明らかな差を認めなかった。シグナル伝達経路の阻害剤を用いた実験ではALK-Smad2/3の阻害剤により、Tenomodulinの発現が著しく抑制され、同シグナル伝達経路が腱細胞の分化に重要である可能性が示唆された。(図3)

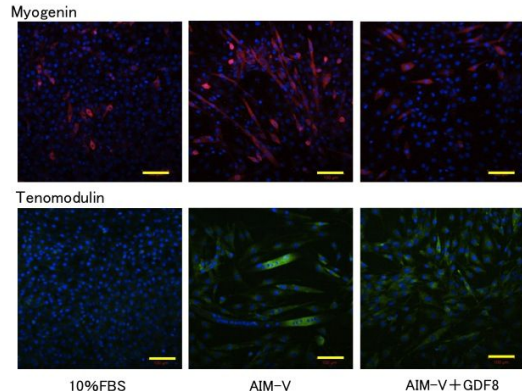


図2 GDF8の刺激によるMyogeninの発現抑制と紡錘形細胞からのTenomodulinの発現誘導

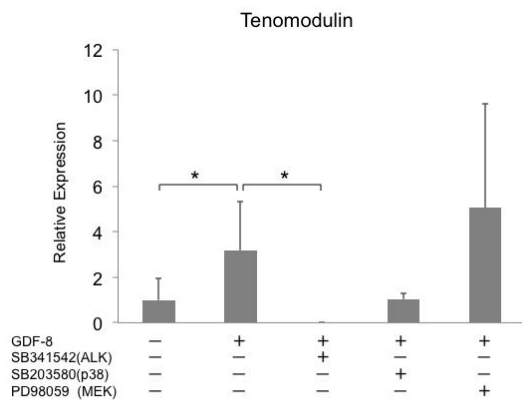


図3 Smad2/3を介したシグナルの抑制によるTenomodulinの発現抑制

(3) 本培養系を用いたマイクロアレイのデータ解析では、miR-214とmiR-322を含む計8つのmiRNAの発現が分化誘導後に増加している事が確認され、さらにデータベース上での標的遺伝子の解析により、miR-214とmiR-322それぞれの標的遺伝子候補としてSmad7、Tubulin polymerization-promoting protein 3 (Tppp3)が検出された。リアルタイムPCRによる分化誘導前後でのmiRNAと標的遺伝子の発現解析では、Smad7、Tppp3いずれも分化に伴いmRNAレベルでの発現が低下したが、GDF8の添加の有無では発現量に差を認めなかった。またmiR-214についてはGDF8刺激時により発現が促進されることが確認された。miR-214の標的遺伝子候補であるSmad7はSmad2/3シグナルの抑制作用を持つことから、miR-214がSmad7を抑制することにより、腱細胞への分化が促進される可能性が示唆された。(図4)

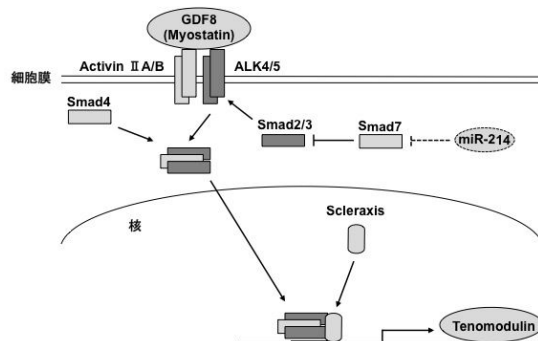


図4 Smad2/3を介した細胞内シグナル伝達

### 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)

[学会発表](計3件)

植村一貴、林正徳、内山茂晴、伊坪敏郎、加藤博之、マウス筋芽細胞株を用いた腱細胞培養系の確立、第57回日本手外科学会学術集会、2014.4.17-18、沖縄コンベンションセンター、ラグナガーデンホテル、宜野湾市

Kazutaka Uemura, Masanori Hayashi, Shigeharu Uchiyama, Toshiro Itsubo, Hiroyuki Kato, GDF-8 Induces Differentiation of Myoblastic C2C12 Cells into Tenocytes, Orthopaedic Research Society 2014 Annual meeting, 2014.3.15-18, New Orleans, USA

植村一貴、林正徳、内山茂晴、伊坪敏郎、加藤博之、マウス筋芽細胞株を用いた腱細胞培養系の確立、第28回日本整形外科学会基礎学術集会、2013.10.17-18、幕張メッセ国際会議場、千葉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊坪 敏郎 (ITSUBO, Toshiro)

信州大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90467168

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：