

論 文 内 容 要 旨

Tendon-Specific Dicer Deficient Mice Exhibit Hypoplastic Tendon Through the Downregulation of Tendon-Related Genes and MicroRNAs

(腱特異的 Dicer 欠損マウスは、腱関連遺伝子と microRNA の下方制御を介して腱の低形成を呈する)

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10, 898428, 2022.

主指導教員: 安達 伸生教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員: 大段 秀樹 教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員: 味八木 茂講師

(広島大学病院 未来医療センター)

大本 武児

(医歯薬保健学研究科医歯薬学専攻)

腱は力を伝達する関節運動に重要な線維性結合組織であり、分子生物学的に未知な点が多い。臨床では修復腱の石灰化や癒痕形成が問題になるが、治療法の進歩は乏しい。遺伝子改変マウスより *Scleraxis* (*Scx*) や *Mohawk* (*Mkx*) といった腱の発達・成熟に重要な転写因子や、*Tenomodulin* (*Tnmd*) などの腱特異的な細胞外マトリックス (ECM) が明らかになってきたが、腱の分化や修復の詳細な分子機構は未だ不明である。*microRNA* (*miRNA*) は、標的遺伝子を負に制御し、発生や細胞・組織恒常性の維持のほか、その発現異常により様々な疾患に関与している。*miRNA* の生成に関与する RNA プロセッシング酵素の *DICER* は、その欠損による *miRNA* 生成・機能不全から胎生致死となり、軟骨特異的 *Dicer* 欠損マウスでは軟骨発生に関与しているとされる。しかし、腱での *DICER*-*miRNAs* の役割や腱特異的な *miRNA* は不明である。

本研究は、腱での *Dicer*-*miRNA* の役割を明らかにし、腱特異的 *miRNA* の同定を目的とした。

腱特異的転写因子 *Scx* の発現制御領域下に *Cre* リコンビナーゼをノックイン (KI) した *Scx:CreKI* マウスと *Dicer* floxed マウスを交配し、腱特異的 *Dicer* 欠損 (*Dicer* cKO) マウスを作製・解析した。

1. 腱特異的 *Dicer* cKO マウスの腱の表現型

① 腱の脆弱性

体長や体重に差は無いが、アキレス腱、膝蓋腱、前腕筋腱での肉眼的脆弱性を認めた。アキレス腱組織の横断面積は *Dicer* cKO で小さく、単位面積の細胞数に差はなかった。さらに、透過型電子顕微鏡でコラーゲン線維径を計測すると、*Dicer* cKO では小径のコラーゲンが多数存在し、線維径の分布が乱れていた。

② 腱の機能低下

Dicer cKO では、筋力測定やアキレス腱の破断強度に差はなかったが、腱の引っ張りによる伸長が大きくなり、歩行動作解析で足関節の可動域が拡大した。

③ 治癒能力の低下

アキレス腱損傷モデルを作成し、腱修復の組織学的な違いを腱修復スコアリングシステムで比較した。*Dicer* cKO では、修復腱に異所性骨化へと至る軟骨化生像が散見され、治癒能力の低下を認めた。

④ 腱線維芽細胞の増殖細胞数の低下

DICER は細胞死や増殖、分化に関与するとされるが、生後 3 日の *Dicer* cKO のアキレス腱では EdU 陽性である増殖腱線維芽細胞数が低下した。一方で、TUNEL 陽性腱線維芽細胞は検出されず、免疫染色では細胞外基質の *Type I Collagen* や *TENOMODULIN* の差異は検出されなかった。

2. *Dicer* cKO のアキレス腱での腱関連遺伝子及び *miRNA* の発現

Dicer cKO による *miRNA* の発現低下や遺伝子発現の変化が腱の低形成に関与すると考え、RNA シーケンスによる網羅的遺伝子および *miRNA* 発現解析、リアルタイム PCR を行った。*Dicer* cKO で腱関連転写因子である *Scx*、*Mkx*、*Egr1* の発現が低下し、それらに制御される主要な腱関連基質の *Coll1a1*、

Col3a1、*Tnmd* 等の発現低下を認めた。また、腱幹/前駆細胞マーカー遺伝子の *Pdgfra* や *Tppp3* の発現も低下した。実際に遺伝子オントロジー (GO) 解析で、*Dicer* cKO で発現が減少した遺伝子群は、骨格系の発生や ECM の組織化といった生物学的プロセスに関与していた。さらに、腱で高発現し、*Dicer* cKO によって発現が減少する miRNA が *Dicer* cKO の表現型に深く関与する腱特異的な miRNA と考え、*Dicer* cKO で発現差が著しい上位 10 の miRNA に着目した。中でも miR-135a と miR-1247 は腱特異的な発現パターンであり、*Dicer* cKO で発現が低下していた。さらに、損傷腱由来腱線維芽細胞への miR-135a mimic の過剰導入は、転写因子 *Scx* や *Tnmd* などの腱基質遺伝子や腱幹/前駆細胞マーカー遺伝子 *Tppp3* の発現を誘導した。そして、*Dicer* cKO で発現が増加した miR-135a の標的候補を含む遺伝子群は、GO 分析で細胞周期に最も関連していた。miR-135a は、腱幹/前駆細胞の増殖・分化に関与し、*Dicer* cKO で観察された腱の低形成に関連しているかもしれない。

本研究は、腱特異的 *Dicer* KO マウスが腱関連遺伝子や miRNA の発現減少を介した腱の脆弱性や機能低下、治癒能力の低下を示したことから、DICER-miRNA は腱の成熟に関与しており、miR-135a の重要性を示唆した。今後、miR-135a の標的遺伝子の同定や腱発生・成熟への関与を遺伝子改変マウスで明らかにし、それを利用した新たな腱再生・修復治療法の開発が期待される。