

平成 29 年 4 月 24 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成 28 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：広島大学・大学院医歯薬保健学研究科

職名：教授

氏名：宿南 知佐

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： ゲノム編集技術を用いた椎間板機能の恒常性維持機構の解明
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 開 祐司 教授, 滝本 晶 特定助教
3. 研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

4. 研究経過及び研究成果：

椎骨を連結し力学的負荷を緩衝する椎間板の弾力性は、Aggrecan (Acan) のようなプロテオグリカンが水を保持することによって生じる。本共同研究では、Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) を用いたゲノム編集により、Paired box gene (*Pax* 1) と *SRY-Box9* (*Sox9*) によって制御される *Acan* の転写制御領域 (*enAcan*) を改変したマウスを作出し、*enAcan* の機能を *in vivo* で解析した。

本共同研究では、まず TALEN を用いたゲノム編集により、359 bp の *enAcan* (図 1) に存在する *Sox9* と *Pax1* の結合部位を標的として、マウスのゲノム DNA に変異・欠失を導入した。その結果、標的領域に変異・欠失が導入された 35 頭のファウンダーマウスが得られた。この中から、*Sox9* 及び *Pax1* の結合部位と欠失塩基数を考慮し、表 1 に示す 5 種類のマウス系統を確立した。

次に、各マウス系統の肋軟骨及び尾椎の椎間板線維輪における *Acan* の発現レベルを、リアルタイム PCR 法により解析した。各遺伝子型 (*enAcan*^{+/+}、*enAcan*^{+/-}、及び *enAcan*^{-/-}) の 3 週齢の雄性マウス 3 頭又は 4 頭から抽出した total RNA は、逆転写反応後リアルタイム PCR により解析し、One-way analysis of variance 法により有意差検定を行った。その結果、欠失塩基数が 13

bp の系統 A 及び 33 bp の系統 B では、肋軟骨及び椎間板線維輪のいずれにおいても、各遺伝子型の間で *Acan* の発現レベルに有意な差が認められなかった。一方、105 bp を欠失した系統 C の *enAcan*^{-/-} では、椎間板線維輪の *Acan* の発現レベルが *enAcan*^{+/+} と比較して約 16% 低下していた ($P < 0.01$)。しかし、系統 C の肋軟骨では、各遺伝子型の間で *Acan* の発現レベルに差は認められなかった。また、133 bp を欠失した系統 D の *enAcan*^{-/-} では、*Acan* の発現レベルは肋軟骨において約 34%、椎間板線維輪において約 28% 低下していた (いずれも $P < 0.001$ vs. *enAcan*^{+/+})。本報告書作成時点で解析が終了していない系統 E についても、試料の収集を進め、今後解析を行う予定である。

enAcan には転写因子 Sox5、Sox6、及び Sox9 が結合し、これにより *Acan* の組織特異的発現が強力に誘導されることが明らかになっているが (Mol Cell Biol 28, 4999-5013, 2008)、本共同研究の結果から、Sox9 の結合部位のみを欠失させることによって、*Acan* の発現レベルは有意に変化しないことが明らかになった。研究代表者は、ゲノム編集技術を用いて 359 bp の *enAcan* 全体を欠失するマウス系統の作出にも着手しており、これによって軟骨及び椎間板線維輪における *enAcan* の役割がより明確になるものと期待される。

```

1  GTCCAGAATGGAAGGGACCAAGGTGCCAGGGATGACCAATCCCTCAAGAA
51  TCCCCCTGGAAACTCCTCCCTGGAGACACCCTTCCCCAGAATAGGCAAGG
101 AGGGCTAGAAACACCCACATAAACAGCGCATCCACAAAACCCCACTGTCC
151 CCAGGCTTTCCTCCCTCAGCCCTTGCTATTTTTATCTGGAGAGCAAGAGG
201 GGGTTGCCAGGCAGGGCCACGCCGCTGTTTATGTCTGAAATTTGAAAAGA
251 TGCACAGTGTACTTGGGAGAAGGCGTTGCAGGGAAAGGAATTTTCAGAGAA
301 TTTCAAACCTGGCAGGGTGAATAGGTGCTTGTGTTTCAGGCTTATGACTC
351 TGGAAAGCTACTCAACCCATGGCATGAAGAGGGGCCATGGACGGGTGCA
401 AATGCCACGTGTGAGATTTGGGATAGATGGAGACTCAGTTTACCTGGCT
451 GAGGGGATCAACCGATCTCAGACTGGGGTGCTTTGTGAGGAAGTCCTTCT
501 ACCCCCGAATAACACTTCTCTTTATGGCTTCCACATTGACACTTGAGTAT

```

図 1. *enAcan* (下線) を含むマウスのゲノム領域の配列

TALEN 標的配列(青囲み線)は、Sox9 結合部位(赤)とその近傍の Pax1 結合部位を取り囲む領域に設計した。

| マウス系統 | 欠失領域* | 欠失塩基数 (bp) | 欠失した結合部位 |
|-------|---------|------------|-----------|
| A | 320-332 | 13 | Sox9 |
| B | 320-352 | 33 | Sox9・Pax1 |
| C | 310-414 | 105 | Sox9・Pax1 |
| D | 198-330 | 133 | Sox6・Sox9 |
| E | 325-532 | 208 | Sox9・Pax1 |

表 1. TALEN によるゲノム編集により得られた *enAcan* の部分欠失マウス系統

*欠失領域は、図 1 の塩基配列の数で示している。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等

学会発表

“Regulation of intervertebral disc development by Pax1 and Sox9.” Chisa Shukunami (invited speaker), Cartilage Biology and Pathology (Gordon Research Conference). Renaissance Tuscany Il Ciocco Lucca (Barga), Italy, April 4, 2017.