

平成 30 年 8 月 3 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成 29 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

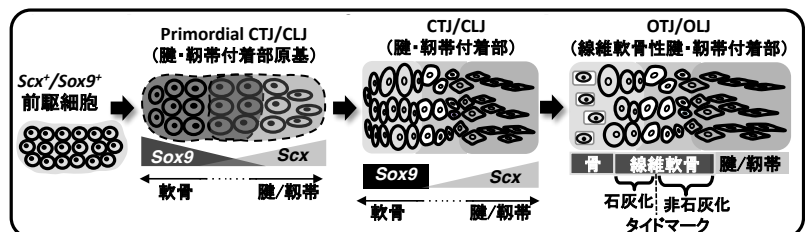
1. 研究課題：腱・靭帯付着部形成を制御する分子機構の解析

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 研究員、
渡邊 仁美 助教

3. 研究期間：平成 29 年 4 月 1 日～平成 30 年 3 月 31 日

4. 研究経過及び研究成果：発生過程では、骨格、筋、腱、靭帯などの運動器の各原基は、それぞれ独立したコンポーネントとして形成される。やがて、組織形成の進行に伴って、硝子軟骨と腱・靭帯は連結され腱・靭帯付着部の原基が作られる。腱・靭帯付着部形成には、軟骨形成に必須の転写因子である SRY-box 9 (Sox9) と腱の成熟に必要な basic helix-loop-helix 型の

転写因子である Scleraxis (Scx) を発現する $Scx^+/Sox9^+$ 細胞が寄与する (右図)。また、Scx の発現領域で Sox9 が欠失する $ScxCre; Sox9^{flox/flox}$ マウスでは、腱・靭帯が付着する領域の軟骨が形成されないことが明らかになっている。一方、Scx が欠失したマウスでは、成熟した腱・靭帯細胞に発現する II 型膜タンパク質である Tenomodulin の発現が消失し、



腱・靭帯付着部の形成過程

成熟した腱・靭帯細胞に発現する II 型膜タンパク質である Tenomodulin の発現が消失し、

成長に伴って、腱・靭帯付着部の線維軟骨層や種子骨において形成不全が観察される。

本研究課題では、腱・靭帯付着部の幹細胞である $Scx^+/Sox9^+$ 細胞の *in vivo* 可視化モデルを構築するために、 $ScxGFP$ マウスと同様の転写制御領域 (Scx 遺伝子上流 4kb および下流 5kb を含む約 11.7kb の領域) を用いて、赤色蛍光蛋白質 TdTomato を発現する Tg マウスを作成した。Transgene はマウス Scx 遺伝子の翻訳開始点直後に in-frame で TdTomato のコーディング配列を挿入して構築した。精製した Transgene をマウス前核期受精卵にインジェクションして作製した Founder マウスを野生型マウスと交配して Scx 発現領域で TdTomato を特異的に発現する $ScxTomato$ Tg の系統を確立した。次に、系統化した $ScxTdTomato$ Tg マウスを $Sox9GFPKI$ マウスと交配し、 Scx の発現を赤色蛍光で、 $Sox9$ の発現を緑色蛍光で可視化できる $ScxTdTomato;Sox9GFP$ マウスを得た。胎生 15.5 日の $ScxTomato;Sox9GFP$ マウス胚を 4% パラフォルムアルデヒドに 1 時間固定後、60% 2,2'-チオジエタノールに 1 時間浸漬することにより、蛍光蛋白質が拡散することなく、良好に透明化できることが明らかになっている。

Scx^{flox} マウスの作製では、ゲノム編集技術を用いてノックイン (KI) を行った。マウス Scx 遺伝子は 2 つの Exon で構成されており、アミノ酸をコードする領域の約 94% が Exon1 に含まれる。そこで、この領域を挟み込むように *LoxP* 部位を挿入し、guide RNA の標的配列にサイレント変異を導入したターゲティングベクターを構築した。この際、KI されたアレルをスクリーニングできるよう、HindIII サイト、PstI サイトを導入し、また TatI サイトは欠失するように設計した。gRNA の標的配列の 5' 側には約 3.2 kb、3' 側に約 4.9 kb の相同配列を付与した。作成したターゲティングベクターから 8.1 kb の 2 本鎖 DNA 断片を切り出し、Cas9 タンパク質、gRNA と共にマウス前核期受精卵へインジェクションし、2 細胞期に発生した胚を仮親の卵管へ移植し、Founder マウスを得た。F0 個体を野生型マウスと交配して Scx^{flox} マウスとして系統化し、現在、 $Scx^{flox/flox};Sox9^{Cre}$ マウスの解析を進めている。

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

原著論文

1. **Shukunami C***, Takimoto A, Nishizaki Y, Yoshimoto Y, Tanaka S, Miura S, Watanabe H, Sakuma T, Yamamoto T, Kondoh G, and Hiraki Y. *in press*. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. **Sci Rep.** 8:3155, 2018

招待講演

1. Regulation of intervertebral disc development by Pax1 and Sox9 : Shukunami C : Gordon Research Conference (Barga, Italy), 2017.
2. $Scx/Sox9$ 陽性前駆細胞は腱・靭帯付着部の形成に寄与する : 吉本由紀、滝本 晶、開 祐司、宿南知佐 : 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 (松本), 2017

学会発表

1. 転写因子 Scleraxis は筋骨格系を連結する組織の成熟を制御する：吉本由紀、滝本晶、渡邊仁美、近藤 玄、佐久間哲史、山本 卓、開 祐司、宿南知佐：2017年度生命科学系学会合同年次大会（神戸），2017.