

平成31年5月7日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成30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。

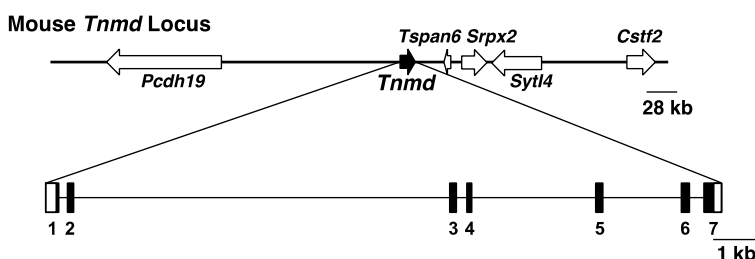
記

1. 研究課題：筋・骨格系を統合する腱・靭帯を解析するための新たな蛍光レポーターマウスの開発
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者：近藤 玄
3. 研究期間：平成30年4月1日～平成31年3月31日

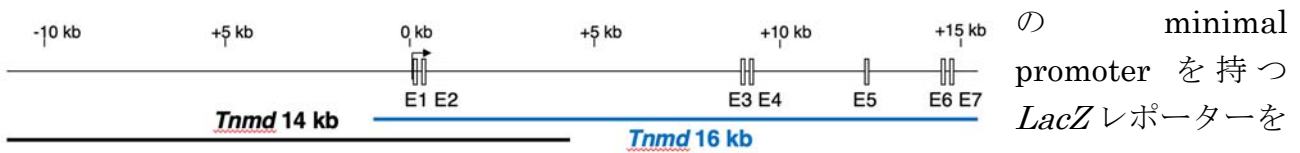
4. 研究経過及び研究成果：

腱は骨格筋の収縮によって生じた力を骨に伝達し、骨を連結する靭帯は可動域を制限して関節を安定化している。いずれの組織も血管網に乏しいため、一旦損傷すると、機能的な回復が難しい。本研究では、腱・靭帯の分子マーカーである *Tenomodulin* (*Tnmd*) 遺伝子の腱・靭帯特異的転写調節領域を同定し、*in vivo*での再生研究に必要な成熟した腱・靭帯で特異的に蛍光レポーターを発現する Transgenic (Tg)マウスを開発することを目指した。

下図に示すように、マウス *Tnmd* 遺伝子は7つの exon で構成され、intron、promoter 領域を含めて約 15 kb からなる。promoter 領域には TATA ボックスが存在し、



と CATCTG の配列を有する E-box に b-HLH 型転写因子である Scx や Twist1 が結合して転写を正に制御していることが明らかになっている (Sci Rep. 8:3155, 2018)。hsp68



用いて、上流 10 kb と exon 1, intron 1, exon 2, intron 2 の一部を含む約 14 kb の領域 (上図)に、Tg マウス胚において、腱・靭帯での発現を drive することの出来る活性が見出されている (右図)。更に分割した DNA 断片を用いて、同様のアッセイを行ったところ、promoter の上流 1 kb あたりに見出される繰り返し配列より上流には、腱・靭帯特異的な



発現を制御する活性は見出されなかった。そこで、promoter の上流 1 kb からマウス *Tnmd* 遺伝子を含む 16kb の DNA 領域の enhancer 活性を検討することにした (上図)。まず、16kb のマウス *Tnmd* DNA 断片を含む BAC clone を有する大腸菌 (DH10B) に温度感受性の Red/ET 発現プラスミドをエレクトロポレーションによって導入して形質転換し、テトラサイクリン耐性によりセレクションを行った。次に、*ColE1* オリジン及びアンピシリン耐性マーカを含む線状 DNA に相同領域を付加した断片をアラビノースによる誘導を行った大腸菌に導入し、相同組み換えによって、アンピシリン耐性のサブクローンを得た。得られた DNA 断片は、*hsp68* の minimal promoter を持つ *LacZ* レポーターの *AscI* 部位にサブクローニングした。*NotI* によって minimal promoter、*LacZ* レポーター、マウス *Tnmd* の遺伝子断片を含む transgene を切り出し、アガロースゲルにて電気泳動後、精製し、マウス受精卵に microinjection を行った。13.5 日胚と 14.5 日胚のファウンダー Tg マウス胚にて、X-gal 染色を行い、enhancer 活性の検討を行った結果、whole mount in situ hybridization で検出されるマウス *Tnmd* の発現領域に一致して、レポーターの活性が認められた。これまでの解析から、intron 2 内に enhancer 活性が認められることが明らかになっているので、promoter 領域から intron 2 までの約 9 kb の DNA 断片の transgene も作製しており、今後、引き続き検討を進める予定である。また、蛍光レポーター遺伝子 *EGFP* の BAC clone 上のマウス *Tnmd* 遺伝子へのノックインのために、野生型 *rpsL* 遺伝子によるストレプトマイシン感受性を利用したカウンターセレクションを行った。合成した *rpsL-Neo* カセットの両端に相同配列のアームを付加し、PCR により増幅した断片を用いて、BAC クローン上のマウス *Tnmd* 遺伝子へノックインし、カナマイシン耐性によりセレクションを行った。得られたクローンを含む大腸菌に、*EGFP* の両端にマウス *Tnmd* 遺伝子のホモロジー領域を付加した DNA 断片を導入し、ストレプトマイシン耐性によってセレクションを行った。マウス *Tnmd* 遺伝子座に *EGFP* をノックインした BAC クローンを有する DH10B から、promoter の上流 1 kb からマウス *Tnmd* 遺伝子を含む 16kb の DNA 領域を retrieve し、*AscI* による transgene の切り出し、精製を行った。今後、transgene をマウス受精卵に microinjection することにより、enhancer 活性を確認し、蛍光レポーター Tg マウスの系統を樹立する予定である。

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, Tanak 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
doi: 10.1038/s41598-018-21194-3.
2. Takimoto A, Kokubu C, Watanabe H, Sakuma T, Yamamoto T, **Kondoh G**, Hiraki Y, **Shukunami C***, Differential transactivation of the upstream aggrecan enhancer regulated by Pax1/9 depends on Sox9-driven activation. **Sci Rep.** 9:4605, 2019
doi: 10.1038/s41598-019-40810-4. (平成 28 年度と平成 29 年度採択課題の研究結果)

招待講演

1. 腱・靭帯研究の現状と展望：宿南知佐：第 36 回日本骨代謝学会学術集会 Meet the Experts 5(長崎), 2018.

学会発表

1. 腱・靭帯研究のためのインビボシステムの構築：宿南 知佐：第 19 回運動器科学研究会 (岐阜), 2018