

令和2年5月22日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点  
2019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・医系科学研究科  
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・靭帯形成の分子メカニズムの解明
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：2019年4月1日～2020年3月31日

4. 研究経過及び研究成果：

basic helix-loop-helix 型の転写因子 Scleraxis (*Scx*) の欠失マウスでは、腱・靭帯の成熟は損なわれるが(図 1)、腱・靭帯原基そのものは正常に形成されることから、*Scx* の上流で腱・靭帯の初期形成を司る分子ネットワークが存在することが示唆されている。本研究では、*Scx* の腱・靭帯特異的発現に関わる enhancer を同定し、その発現を制御する転写因子の実体を明らかにすることを目指した。

*Heat shock promoter 68 (hsp68)* の minimal promoter と *LacZ* reporter を有する *Asshsp68lacZpA* ベクターにマウス *Scx* のゲノム領域を組み込んで構築した transgene を用いて、胎生 13.5 日の Transgenic(Tg)マウス胚で enhancer 活性を解析した。*Scx* 遺伝子の下流を含む 5.3 kb の領域は、10.8 kb のゲノム領域と同じような腱・靭帯組織特異的な転写制御を担う領域を含んでいた(図 2)。そこで、このゲノム領域を更に細分化して、同様に、

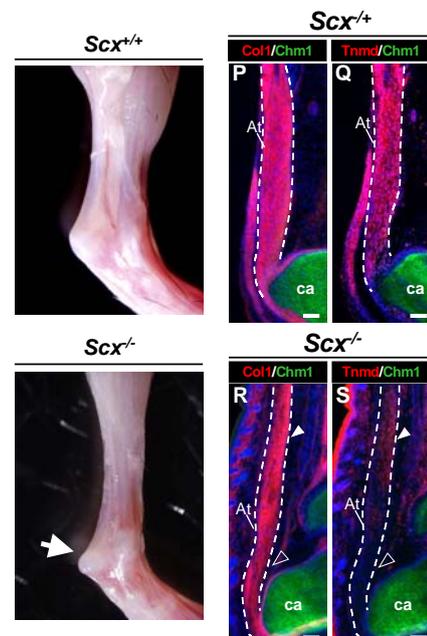


図1. *Scx*欠失マウスのアキレス腱におけるTnmd発現の消失 (Shukunami et al., Sci Rep, 2018)

*Asshsp68lacZpA* ベクターに挿入し、**transgene** を構築した。**transgene** を受精卵にマイクロインジェクションし、胎生 13.5 日の Tg マウス胚において X-gal 染色によって LacZ の活性を解析して、**Scx** の腱・靭帯特異的な発現制御領域の絞り込みを行った。これまでに、5.3 kb のゲノム領域内の 1.9 kb の断片に **enhancer** 活性があることを見出している。一方、**Scx** の promoter 領域を含む 4.3 kb のゲノム断片や promoter よりも上流の 3.6 kb のゲノム断片では、腱・靭帯特異的な **enhancer** 活性は検出出来なかった。5.3 kb のゲノム領域内の 1.9 kb の断片は、4.3 kb のゲノム断片と 5'側で一部重複しているが、4.3 kb のゲノム断片には、特異的な **enhancer** 活性は検出されていないので、4.3 kb のゲノム断片とは重複しない領域に腱・靭帯特異的な発現制御を担う **enhancer** が存在するのではないかと考えている。

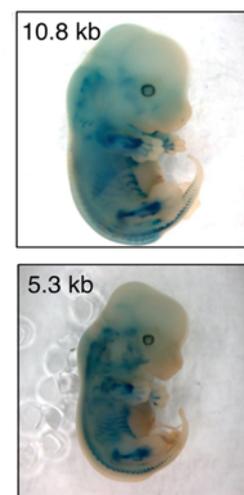


図2. *ScxLacZ* Tg 胚 (E13.5)

*in vitro* では、TATA box を含む **Scx promoter** 領域を promoter-less の luciferase ベクターである *pGL4.1[luc2]* に正方向と逆方向に組み込み、**Scx** を発現するラットの四肢腱から分離した腱細胞にトランスフェクションし、Dual luciferase assay によって promoter 活性を確認した。また、minimal promoter を有する *pGL4.23[luc2/minP]* に 10.8 kb のゲノム領域を細分化した 3.6 kb, 5.3 kb, 1.9 kb, 4.3 kb の DNA 断片を挿入し、ラット腱細胞を用いて、Dual luciferase assay を行った。その結果、1.9 kb の領域に、転写活性が見出されている。現在、**Scx promoter** と相互作用するゲノム領域を同定するために、enChIP による解析を進めている。

## 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

### 招待講演

1. 筋骨格システムを統合する腱の形成と成熟プロセス：宿南知佐：日本筋学会 第 5 回学術集会 (東京), 2019.

### 総説

1. **Scx** を中心とした腱・靭帯・歯周靭帯の機能制御：吉本 由紀、宿南 知佐：The Bone, 33 巻、99-104, 2019
2. 腱・靭帯研究のフロンティア「腱・靭帯研究のあゆみ」：宿南 知佐：整形・災害外科, 63 巻、83-88, 2020