

平成27年5月15日

平成26年度共同研究報告書

京都大学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院

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。

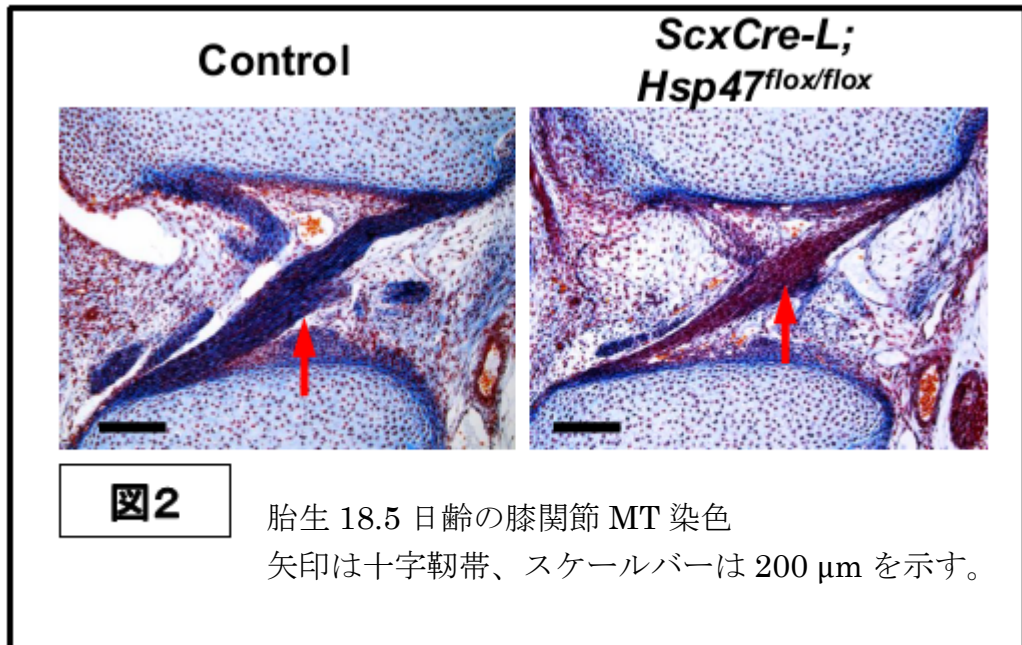
記

1. 研究課題：コラーゲン特異的分子シャペロン Hsp47 の腱・靭帯形成過程における役割
2. 再生医科学研究所共同研究者： 開 祐司 教授
3. 研究期間：平成26年4月1日～平成27年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

Scleraxis (Scx)は、腱・靭帯形成領域で発現する basic helix-loop-helix 型の転写因子である。本共同研究に先立って、マウス *Scx* 遺伝子の promoter と2つの exon を含む 10.8 kb の腱・靭帯特異的転写制御領域を用いて、内在性の *Scx* の発現領域で Cre-recombinase (Cre)を発現するトランスジェニックマウス (*ScxCre*)を樹立した。*Cre* の発現レベルの高い *ScxCre-H* と *Hsp47* の flox マウスを交配した *ScxCre-H;Hsp47^{flox/flox}* では、腱・靭帯だけでなく骨格や筋の一部でも形成不全が認められ、呼吸不全により出生時に死亡した。本共同研究では、これまでに樹立した *ScxCre-L Tg*、*ScxCre KI*、*ScxCreERT2 Tg*、*TnmdCre KI* マウスを用いて、*Hsp47* conditional knockout mice (CKO)の作成を進めた。

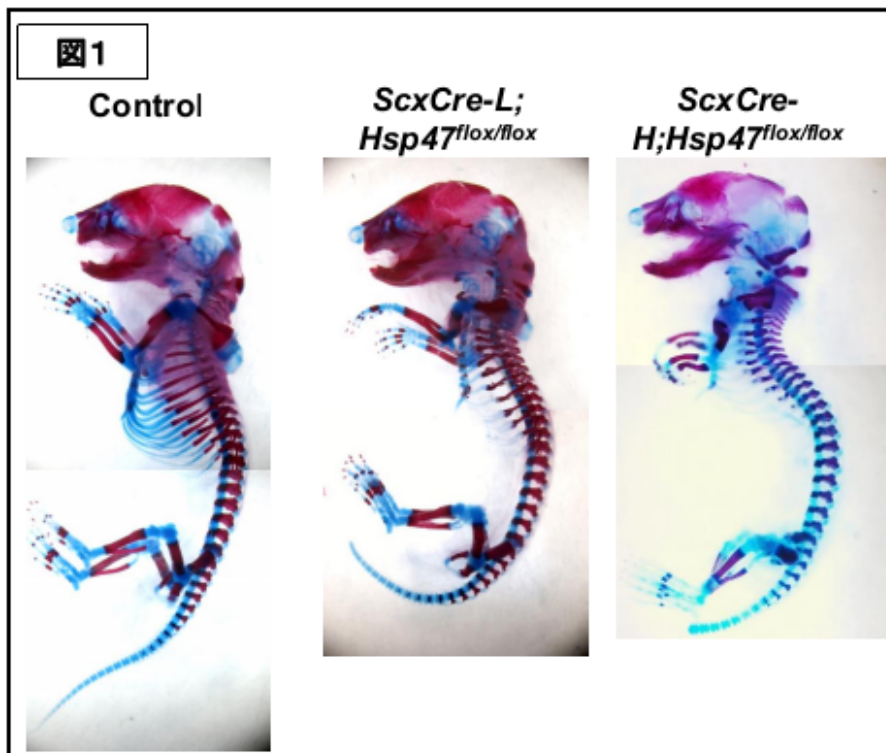
まず、*ScxCre-L;Hsp47^{flox/flox}*、*ScxCre^{+/+};Hsp47^{flox/flox}* の骨格標本を作成し、解析を行った。*ScxCre-L;Hsp47^{flox/flox}* マウスでは、*ScxCre-H;Hsp47^{flox/flox}* において認められた骨格異常は軽減していたが、胸郭の低形性、四肢の近位部の長管骨における骨幹部の湾曲、関節周囲の低形性などの表現型は *ScxCre-H;Hsp47^{flox/flox}* と同様に認められ (図1)、出生時に死亡した。一方で *ScxCre^{+/+};Hsp47^{flox/flox}* マウスの骨格には大きな異常が認められず、

生後も異常なく生存していた。腱・靭帯の組織形成はパラフィン切片を作成し Masson's trichrome (MT) 染色を行い解析した。*ScxCre-L;Hsp47^{lox/lox}*マウスの腱・靭帯においては、*ScxCre-H;Hsp47^{lox/lox}*と同様に濃青色に染色されるコラーゲン線維が欠損してい



たが (図 2)、*ScxCre/+;Hsp47^{lox/lox}*マウスの腱・靭帯においては、コラーゲン線維の染色性が僅かに低かったものの、顕著な低形性は認められなかった。

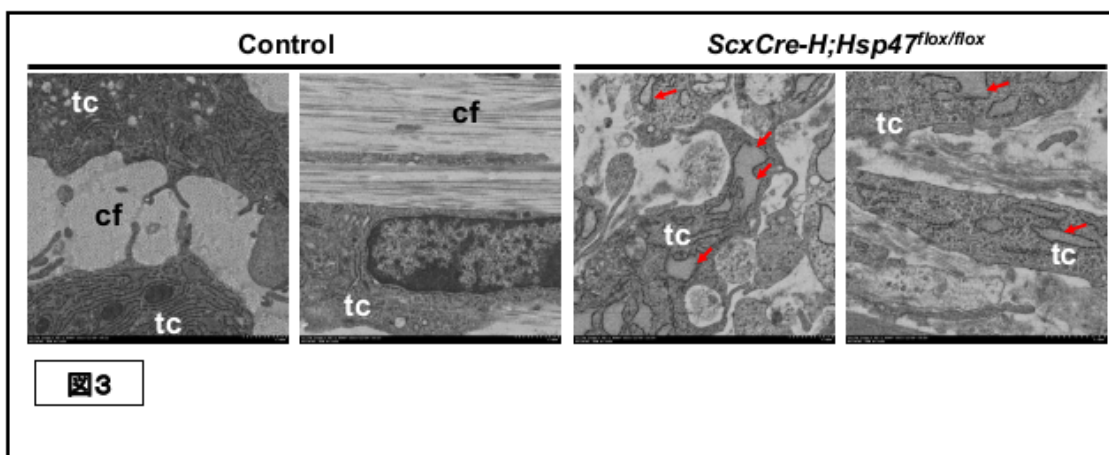
Hsp47 を欠失した腱・靭帯組織におけるコラーゲン線維の大きさや配列、腱・靭帯細胞の微細構造を明らかにするために、*ScxCre-H;Hsp47^{lox/lox}*マウスの組織を透過電子顕微鏡によって解析した。コントロールマウスと比較して *ScxCre-H;Hsp47^{lox/lox}*の組織中には、コラーゲン線維の蓄積が殆んど認められず、直径が小さくなった線維が僅かに存



在するのみであった。

また *ScxCre-H;Hsp47^{lox/lox}*マウスの腱細胞には、拡張した小胞体が多数認められた(図3)。これらの結果から、小胞体ストレスやそれに続くアポトーシスが引き起こされている可能性が示唆されたので、小胞体ストレスマーカーである BiP の免疫染色と TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)染色を行った。CKO マウスにおいては、形成中の腱・靭帯において、やや BiP のシグナルの増強が認められ、低形性が認められた腱組織において TUNEL 陽性細胞が増加していた。腱細胞のアポトーシスと小胞体ストレスの関連をさらに検証するため、BiP に加え CHOP、OASIS など他の小胞体ストレスマーカーの発現レベルを *in situ* hybridization 法にて解析している。

腱・靭帯と骨格および筋の連結部の形成は、MT 染色または免疫染色を行った組織切片の立体構築にて解析した。*ScxCre-H/L;Hsp47^{lox/lox}*いずれのマウスにおいても、MT 染色においてコラーゲン線維の減少を伴うような腱と骨格の連結部の低形性が認められた。また筋と腱の連結部においては、I 型コラーゲン陽性である筋内部の線維性の境界部



が *ScxCre-H;Hsp47^{lox/lox}* マウスにおいて不明瞭となっていた。コントロールマウスの組織を三次元的に立体構築した結果、一部の腱が筋内部に入り込み、境界部を形成していた。CKO マウスからも組織切片を作成して三次元的に構築して解析を進めている。

これまでに樹立した *ScxCreERT2* を *Rosa-CAG-LSL-tdTomato* と交配したマウスにタモキシフェンを投与すると、胎生期には十分な *Cre* の発現が誘導された。E12.5 以降にタモキシフェンを投与すると、骨格系での *Cre* の発現は抑制することが出来る。今後、*ScxCreERT2;Hsp47^{lox/lox}* マウスの解析を進めて行く予定である。

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)、学会発表等主に平成 22 年度～平成 25 年度の長期課題共同研究に関連する論文ですが、本研究課題とも一部関連があります。

Scleraxis and *Osterix* antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone: Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C: **Development**, 124 (4), 787-796, 2015.

学会発表

運動器コンポーネントの連結におけるコラーゲン線維形成の機能的役割：杉本由紀、滝本晶，西田圭一郎，開祐司，宿南知佐：第32回日本骨代謝学会学術集会（大阪）平成26年7月24-26日