

平成 28 年 5 月 18 日

平成 27 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：Pax1 による椎間板形成機構の解明
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 27 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日
4. 研究経過及び研究成果：Paired box gene 1 (Pax1)は、脊柱の組織構築に重要な役割を担う転写因子である。本共同研究では、椎間板細胞における Pax1 の役割について解析し、Pax1 による Aggrecan (Agc1)の発現と椎間板形成の制御について以下の成果を得た。

① Pax1 のノックダウンによる Agc1 の発現上昇

Pax1 が発現する椎間板線維輪は、Agc1 などの酸性ムコ多糖が局在する線維軟骨性の組織である。ラットの椎間板から分離培養した椎間板線維輪細胞は、pellet culture により軟骨細胞分化が誘導される(図 1)。研究代表者らはこれまでに、Pax1 の過剰発現が軟骨細胞の成熟を抑制することを報告してきたが(Exp Cell Res 319:

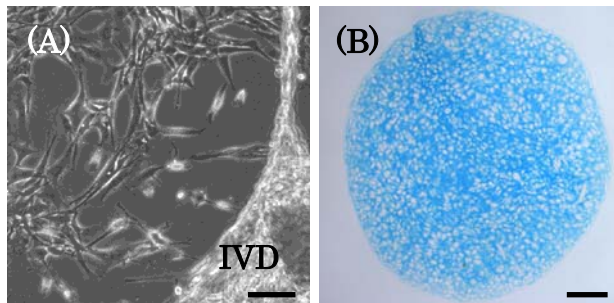


図 1. ラット椎間板線維輪細胞

(A) 椎間板組織(IVD)から outgrowth させた椎間板線維輪細胞. (B) 軟骨細胞分化を誘導した pellet の凍結切片. 軟骨性基質をアルシアンブルーで染色している. Scale bars, 100 µm.

3128-3139, 2013)、*Pax1* の発現低下が軟骨細胞分化や軟骨関連遺伝子の発現にどのような影響を与えるのかは不明であった。そこで、ラットの尾椎から分離した椎間板線維輪細胞において *Pax1* をノックダウンし、軟骨細胞分化誘導過程における *Pax1* の役割を検討した。shRNA を発現するレンチウイルスを感染させた椎間板線維輪細胞から pellet を作製し、誘導培地中で 3 週間維持することにより軟骨細胞分化を誘導した。その結果、*Pax1* をノックダウンした pellet では、コントロールと比較して有意な *Agc1* の発現上昇が認められ、アルシアンブルーの染色性も顕著に上昇していた。一方で、軟骨細胞分化に必須の転写因子である *Sox9* 及び軟骨性基質である II 型コラーゲン(*Col2a1*)については、*Pax1* のノックダウンによる発現上昇は認められなかった。以上の結果から、*Pax1* は椎間板線維輪細胞において *Agc1* を含む特定の軟骨性基質分子の発現制御に関わっていることが示唆された。

② *Agc1* エンハンサー(*enAgc1*)における *Pax1* の結合と結合部位の同定

開始コドンから約 10 kb 上流に存在する 359 bp の *enAgc1* は、軟骨細胞分化に重要な転写因子である L-*Sox5*、*Sox6*、及び *Sox9* の結合部位を有している(Mol Cell Biol 28: 4099-5013, 2008)。研究代表者らは、*Pax1* が *enAgc1* の 55 bp の DNA 配列に結合することを明らかにしていたので、椎間板線維輪細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により *enAgc1* における *Pax1* の結合について解析し、ゲルシフトアッセイにより *Pax1* の結合部位を同定した。

ラット椎間板線維輪細胞から抽出したクロマチンと抗 *Pax1* 抗体による免疫沈降物において、過去に報告されている *Agc1* (Mol Cell Biol 28: 4099-5013, 2008)、*Col2a1* (Mol Cell Biol 17: 2336-2346, 1997)、及び *Nkx3.2* (Development 130: 473-482, 2003)の発現制御領域を PCR により解析した。その結果、椎間板線維輪細胞内では *enAgc1* に *Pax1* が直接的に結合していることが明らかになった。更に、*Pax1* の結合が報告されている *Nkx3.2* の発現制御領域では、椎間板線維輪細胞においても *Pax1* の結合が確認された。一方、*Col2a1* の発現制御領域においては *Sox9* の結合は確認されたが、*Pax1* の結合は検出されなかった。

enAgc1 における *Pax1* の結合部位を同定するため、*Pax1* が結合する 55 bp の DNA 配列に変異を導入したオリゴ DNA を作成し、ゲルシフトアッセイにより結合活性を解析した。14 種類の変異型オリゴ DNA を用いて解析した結果、*enAgc1* の 3' 側に存在する 18 bp の DNA 配列が *Pax1* の結合に必要であることが明らかになった。本共同研究により同定された *Pax1* の結合部位は、*Sox9* の結合部位と一部重複しており、*enAgc1* における *Pax1* の結合が *Sox9* の結合を競合的に阻害する可能性が示唆された。

③ Platinum TALEN によるゲノム編集を用いた *Pax1* 及び *Pax9* 遺伝子欠失マウスの作出と椎間板組織形成における *Pax1* の役割の解明
椎間板の形成・維持における *Pax1* 陽性細胞の特性を *in vivo* で検証していくためには、

Loss of function 実験が必須となる。体節における硬節及び椎間板の線維輪には Pax1 とそのパラログである Pax9 が発現し、Pax9 は Pax1 の機能を補完することが知られている(Development 126: 5399-5408, 1999)。本共同研究では、椎間板における Pax1 の *in vivo* での役割を解析するために、Platinum TALEN を用いて Pax1 と Pax9 遺伝子の上流に欠失を作製し、frameshift によってこれらの遺伝子が欠失するマウスを作出した。その結果、これまでに 4 種類の Pax1 欠失マウス及び 3 種類の Pax9 欠失マウスの系統を確立した(図 2)。

(A) Pax1-TALEN

Wild type	GCGATGGAGCAGACGTACGGCGAAGTGAACCAACTTGGTGGCGTGTTTCGTCAACGGCCGTCCC CTGCCCAATGCCATCCGCCTACGAATCGTGGAGCTAGCACAGCTGGGTATCCGACCCTGTG...
Deletion-1	GCGATGGAGC***** *****TGGGTATCCGACCCTGTG...
Deletion-2	GCGATGGAGCAGACGTACGGCGAAGTAAAC****TTGGTGGCGTGTTTCGTCAACGGCCGTCCC CTGCCCAATGCCATCCGCCTACGAATCGTGGAGCTAG
Deletion-3	GCGATGGAGCAGACGTACGGCGAAGTGAAC*AACTTGGTGGCGTGTTTCGTCAACGGCCGTCCC CTGCCCAATGCCATCCGCCTACGAATCGTGGAGCTAG
Deletion-4	GCGATGGAGCATAC*****CAACTTGGTGGCGTGTTTCGTCAACGGCCGTCCC CTGCCCAATGCCATCCGCCTACGAATCGTGGAGCTAG

(B) Pax9-TALEN

Wild type	GCAATGGAGCCAGCCTTCGGGGAGGTGAACCAGCTGGGAGGAGTGTTTCGTGAACGGAAGGCCG CTGCCCAACGCCATTCGGCTTCGCATCGTGAATTAGCCCAACTGGGCATCCGACCTTGTG...
Deletion-1	GCAATGGAGCCAGC****GGGAGGTGA
Deletion-2	GCAATGGAGCCAGC*****TGGGAGGAGTGTTTCGTGAACGGAAGGCCG CTGCCCAACGCCATTCGGCTTCGCATCGTGAATTAGCCCAACTGGGCATCCGACCTTGTGA
Deletion-3	GCAATGGAGCCAGC*TCGGGGAGGTGA

図 2. Platinum TALEN を用いて作出した Pax1 及び Pax9 欠失マウスの DNA 配列
開始コドン付近 124 塩基の Pax1 (A)及び Pax9 (B)の DNA 配列. 開始コドンを赤、終止コドンを橙、変異した塩基を青、欠失した塩基をアスタリスクで示した. frameshift によりアミノ酸が変異する DNA 配列を緑で示した. DNA 結合部位である Paired domain をコードする塩基に下線を付した. Pax1-TALEN の Deletion-1 は、frameshift を伴わない 96 bp の欠失であるが、Pax1 ノックアウトマウスと同様のフェノタイプが観察されている。

Pax1 欠失マウスを胎生期から出生後において解析した結果、胎生期では椎間板外線維輪のわずかな低形成が観察されたが、出生後の成長に伴って外線維輪の低形成は顕著となる傾向が認められた。また、Pax1 欠失マウスの椎間板では、I 型コラーゲン等の腱・靭帯に発現する遺伝子発現レベルの低下傾向が認められ、現在、様々な遺伝子の発現変化について詳細な解析を進めている。過去の報告において、Pax1/Pax9 ダブルノックアウトマウスでは中軸骨格の形成が異常となり、出生時に

死亡することが報告されているが、胎生期における椎間板の形成については報告されていない。今後、*Pax1* 及び *Pax9* 両方の遺伝子を欠失するマウス胚においても、椎間板の形成過程を解析する予定である。

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）、学会発表等

Shukunami C*, Yoshimoto Y, Takimoto A, Yamashita H, Hiraki Y. Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendons and ligaments that integrate musculoskeletal components. *Jap. Dent. Sci. Rev. in press.* (Invited review).

腱・靭帯形成の制御：滝本晶、吉本由紀、山下寛、宿南知佐
整形・災害外科 58 巻 10 号 p1373-1379

学会発表

Pax1 と *Sox9* による軟骨細胞の分化制御と脊柱の組織構築：滝本 晶、開祐司，宿南知佐：
第 33 回日本骨代謝学会学術集会（東京）平成 27 年 7 月 23-25 日