

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390289
 研究課題名（和文）腱・靭帯形成を制御する転写因子の同定
 研究課題名（英文）Identification of transcription factors that regulate tendon/ligament formation
 研究代表者
 宿南 知佐（SHUKUNAMI CHISA）
 京都大学・再生医科学研究所・准教授
 研究者番号：60303905

研究成果の概要（和文）：

強靭結合組織である腱・靭帯特異的に発現するマウステノモジュリン遺伝子のプロモーターの上流約 1 kb の領域とイントロン 2 内にある組織特異的転写制御を担うエンハンサー領域を同定し、それらの転写活性を上昇させる転写因子を検索した。その結果、塩基性ヘリックスループヘリックス型転写因子、Ets 転写因子、HMG ボックス DNA 結合領域を持つ Sox 転写因子などが、同定したエンハンサー領域の転写活性を上昇させることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Mouse *Tenomodulin (Tnmd)* is predominantly expressed in dense connective tissues such as tendons and ligaments. We identified the enhancer regions near the promoter and within the intron 2 of the mouse *Tnmd* gene. We found that these enhancer regions are transactivated by the transcription factors of basic helix-loop-helix, Ets, or Sox family.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・骨・軟骨代謝学

キーワード：転写因子、Tenomodulin、腱、靭帯、運動器

1. 研究開始当初の背景

骨・軟骨などの硬組織は、支持組織として生体の内部構造を保持し、運動器の重要な構成要素としての役割を担っている。硬組織同士は靭帯を介して結合し、骨や軟骨などの骨格は、腱によって筋肉に連結されることによって、力学的伝達機能を果たすことが可能になる。腱や靭帯は、組織学的には、I 型コラーゲンの線維が規則正しく平行に走行する白色不透明の強靭結合組織に分類され、独自の

強靭さを保持している。この運動器の連結に不可欠な腱や靭帯は、血管網に乏しいので、一旦損傷すると機能的修復が困難で、運動器の再生医療では、主要な標的器官になっている。しかしながら、これまで、指標とする分化マーカーが報告されていなかったため、再生はおろか運動器の連結システム形成のメカニズムすら解明されていない。

研究代表者は、軟骨由来血管新生抑制因子 Chondromodulin-1 (Chm1) の C 端側にある

血管新生抑制ドメインに高い相同性を有する II 型膜貫通型糖蛋白質 *Tenomodulin* (*Tnmd*) をクローニングした。*Tnmd* は腱・靭帯を含む強靭結合組織に特異的に発現し、*Tnmd* の C 末端側の Chm1 様ドメインには血管新生抑制活性があることが明らかになっている。

一方、Harvard 大学の Dr. Tabin らの研究グループは、basic helix-loop-helix (b-HLH) 型の転写因子である *Scleraxis* (*Scx*) が腱・靭帯の初期の分化マーカーとして有用であることを報告し、硬節内に前駆腱細胞を含むシンデトームという体節の 4 番目のコンポーネントが存在することを報告した。*Scx* は前駆腱細胞や腱細胞で発現しているが、単独では未分化細胞から腱細胞への分化を誘導することが出来ない。また、*Scx* 欠失マウスでは、長い四肢腱、尾部の腱、筋内腱に異常は認められるものの、初期の形成過程は正常であることから、腱細胞の分化誘導には別の転写因子が関与していることが強く示唆されている。

研究代表者のグループは、ニワトリ胚を用いて *Tnmd* の発現パターンを詳細に解析し、腱形成過程では、*Scx* が前駆腱細胞と腱細胞に発現しているのに対して、*Tnmd* は分化した腱細胞にのみ発現していることを明らかにした。また、*Tnmd* は分化した腱細胞で *Scx* によってその発現が正に制御されるが、*Myogenin* のように筋分化を誘導する転写因子によって負に制御されることを報告した。*in vitro* においては、*Scx* は腱細胞だけでなく軟骨や骨芽細胞などの骨格系の細胞にも発現が検出されるが、*Tnmd* は成熟した腱・靭帯細胞においてのみ発現が検出されるので、培養系においても有効な腱・靭帯特異的分子マーカーになる。また、*Tnmd* 遺伝子欠損マウスの解析では、*Tnmd* は成熟した腱組織の細胞増殖とコラーゲン線維の成熟に関与することが明らかになっている。

これらの一連の報告によって、腱・靭帯の形成機構の研究が注目されるようになり、*Scx* と並んで、*Tnmd* は腱・靭帯細胞を特徴づける分子マーカーとして世界中で用いられつつある。*Tnmd* の腱・靭帯特異的転写制御メカニズムを明らかにすることによって、腱・靭帯細胞の分化成熟に関与する転写因子が同定されることが期待される。

2. 研究の目的

腱・靭帯の形成過程で発現する II 型膜貫通型糖蛋白質であるマウス *Tnmd* の組織特異的転写制御メカニズムを解析することによって、腱・靭帯細胞の分化・成熟に関与する転写因子群を同定する。まず、*LacZ* レポーターを用いたトランスジェニックマウス胚による解析や *Tnmd* を発

現する培養ラット腱細胞を用いたデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイによって、マウス *Tnmd* 遺伝子上流やイントロン内に存在する組織特異的な転写制御を担うエンハンサー領域を同定する。次に、同定された特異的転写制御領域を用いて、酵母 One-hybrid 法や発現ベクターライブラリーを用いて転写活性化能を有する転写因子を検索する。また、同定されたエンハンサー内に存在する既知のコンセンサス配列の情報に基づいて、候補となる転写因子の結合特性や転写活性化能を解析する。

3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼレポーターと発現ベクターの構築

マウス *Tnmd* 遺伝子のプロモーターを含む上流約 1 kb の領域で、長さの異なる種々の断片を *pGL4.10[luc2]* に挿入し、ホタルルシフェラーゼレポーターを構築した。また、ミニマルプロモーターを有する *pGL4.23[luc2/minP]* にこの領域を分割した 4~8 回の繰り返し配列の断片を挿入し、ホタルルシフェラーゼレポーターを構築した。N 端側に FLAG タグを付加した b-HLH、Ets、Sox ファミリーの転写因子のコーディング領域を *pcDNA3* に挿入し、発現ベクターを構築した。

(2) 細胞培養

生後 14 日齢の Wistar ラットの四肢腱を分離し、細かくした組織片を EDTA 処理後、トリプシンとコラーゲナーゼを用いて消化し、腱細胞を分離した。また、15 日目の孵化卵から分離したニワトリ胚の四肢腱からも同様にして、腱細胞を分離した。これらの腱細胞は、5% ウシ胎仔血清を含む α MEM 培地を用いて、5% CO₂ 存在下で培養した。HEK293T は、5% ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地を用いて、5% CO₂ 存在下で培養した。

(3) デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

ラット腱細胞あるいは HEK293T 細胞に、ホタルルシフェラーゼレポーターと内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼレポーターである *pGL4.74[hRluc/TK]* をトランスフェクションし、24~48 時間後にサンプルを回収した。転写因子の転写活性化能の解析では、これらのレポーターベクターと発現ベクターを共発現させてサンプルを回収した。ルシフェラーゼの活性は、ルミノメーターを用いて測定した。

(4) トランスジェニックマウスマウスを用いたエンハンサー領域の検索

hsp68 のミニマルプロモーターと *LacZ* レポーターの上流に候補となるエンハンサー領域

を連結しベクターを構築した。次に、ベクターから制限酵素消化によって切り出したトランスジーンをマウス受精卵前核に注入した。胎生 13.5 日～16.5 日のトランスジェニックマウス胚の X-gal 染色によって、エンハンサー活性を解析した。

(5) 酵母 One-hybrid 法

候補となる bait 領域の 4 回繰り返し配列を *pAbAi* レポーターベクターにクローニングし、これを酵母 Y1HGOLD 株に組み込みレポーターとなる酵母株を作製した。スクリーニングに用いる cDNA プールは、胎生 14.5 日のマウス胚の四肢から抽出した RNA を鋳型にして SMART 法を用いて構築した。prey ベクターである *pGADT7-Rec* ベクターと cDNA プールを bait 配列が組み込まれた Y1HGOLD 株にコトランスフォームし、Aureobasidin A に対する耐性を指標にしてスクリーニングを行なった。このようにして得られた陽性クローンのシーケンスを行なった。

(6) 発現ベクターライブラリーを用いた転写因子の検索

HEK293T 細胞にエンハンサー領域の 4 回繰り返し配列を組み込んだルシフェラーゼレポーターと約 6,000 遺伝子の発現ベクターを共発現させて、転写活性化能のある遺伝子を検索する一次スクリーニングを行なった。その結果得られた～100 遺伝子の発現ベクターを用いて、HEK293 と臍細胞で二次スクリーニングを行なった。この中で、有意に転写活性を上昇させることが明らかになった転写因子のファミリーに属する他の遺伝子についても、新たに発現ベクターを構築して転写活性化能を検討した。

(7) 遺伝子・蛋白発現解析

ノーザンブロット法、*in situ* hybridization、免疫染色によって、遺伝子と蛋白質の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) エンハンサー領域の同定

マウス *Tnmd* 遺伝子のプロモーターを含む上流約 1kb の領域内には、*Tnmd* の遺伝子発現を正に制御する Scx のような b-HLH 型転写因子が結合しうる E-box (CANNTG) が 5 つ存在する。また、これらの E-box 以外にもエンハンサー活性を持つ可能性のあるコンセンサス配列が存在していた。そこで、転写開始点の上流約 1kb を 10 の断片に分割しそれらの断片の 4 回繰り返し配列を、ミニマルプロモーターを有する *pGL4.23[luc2/minP]* に挿入し、ルシフェラーゼレポーターを構築した。生後 14 日齢の雄ラットの四肢臍から分離した培養臍細胞にこれらのルシフェラーゼレポーターを発現させてデュアルルシフェラーゼレポーターアッセ

イによってエンハンサー活性が検出される領域を検索した。その結果、TATA box の上流 700 bp 付近に存在する 4 番目と 5 番目の E-box を含む 158 bp の LUTLE2 に強いエンハンサー活性が認められることを見出した。この領域をさらに分割して解析したところ、培養臍細胞においては、5 番目の E-box と隣接する Ets 結合部位を含む領域に高い活性が検出された。候補となる領域の繰り返し配列をミニマルプロモーターと LacZ レポーターの上流に連結したトランスジーンを発現するマウスでは、4 番目と 5 番目の E-box と Ets 結合部位を含む 40 bp の領域 (UTLE) に四肢臍でのエンハンサー活性が認められた。一方、イントロン 2 内に存在する 685 bp の領域には、トランスジェニックマウス胚を用いた解析で、靱帯での特異性を示すエンハンサー活性が存在していた。

(2) 酵母 One-hybrid 法による転写因子の検索

プロモーターの上流に存在し、臍でのエンハンサー活性の認められる UTLE を、酵母 One-hybrid 法による転写因子の bait として用いた。UTLE の 4 回繰り返し配列を挿入した *pAbAi* レポーターベクターを酵母 Y1HGOLD 株に組み込みレポーターとなる酵母株を作製した。*pGADT7-Rec* ベクターと胎生 14.5 日の Mouse 胚の四肢の cDNA プールを bait 配列が組み込まれた Y1HGOLD 株にコトランスフォームし、Aureobasidin A に対する耐性を指標にしてスクリーニングを行った。しかしながら、酵母 One-hybrid 法によるスクリーニングによって同定された因子には多数の偽陽性が含まれており、組織特異性を制御する候補となる転写因子を得ることが出来なかった。

(3) 発現ベクターライブラリーを用いたスクリーニング

UTLE を含む LUTLE2 の 4 回繰り返し配列を挿入したルシフェラーゼレポーターと約 6,000 遺伝子の発現ベクターを HEK293T 細胞に共発現させて、転写活性化能のある遺伝子の検索を行った。その結果、b-HLH、Ets、Sox ファミリーの中に、転写活性を上昇させる転写因子を複数同定することに成功した。スクリーニングに用いた発現ベクターライブラリーには含まれていない Ets ファミリーの因子についても、新たに発現ベクターを構築して、更に別の複数の Ets ファミリーに属する転写因子が転写活性を上昇させることを明らかにした。Sox ファミリーに関しても、同様に発現ベクターを構築して転写活性化能を持つ転写因子を新たに同定した。イントロン 2 の中に見出されたエンハンサー領域に関しても、b-HLH、Ets、Sox ファミリーの中に、転写を活性化させる転写因子があることを

見出している。今後、靱帯細胞分化の分子メカニズムを明らかにする糸口になると考えられる。

(4) b-HLH 型転写因子と *Sox9* の過剰発現が *Tnmd* の mRNA 発現に及ぼす影響

b-HLH 型転写因子である *Scx*, *Paraxis*, *Twist1*, *Twist2* をニワトリ胚から分離した腱細胞にレトロウイルスによって過剰発現させると、*Tnmd* mRNA の発現が著明に上昇していた (図1)。一方、HLH モチーフを持ち、b-HLH 型転写因子と二量体を形成するが DNA への結合能のない Id3 を同様にして過剰発現させると、*Tnmd* の mRNA レベルが低下していた。軟骨分化を制御する転写因子である *Sox9* はマウス *Tnmd* のプロモーターを含む上流約 1kb の領域の転写を活性化するが、ニワトリ腱細胞で異所性に *Sox9* が持続して発現すると、軟骨細胞への分化転換が誘導されるので、*Tnmd* や *Col1a2* などの発現は抑制されて、*Col2a1*, *Aggrecan*, *Chm1* などの軟骨分化マーカーの遺伝子発現が著明に上昇した (図1)。また、レンチウイルスによって *Scx* が導入されたヒトの骨髄由来の間葉系幹細胞では、*Tnmd* の発現が誘導され、軟骨細胞や骨芽細胞への分化誘導は抑制されていた。このような細胞では、*Tnmd* プロモーターとその上流の配列を含む領域を挿入したルシフェラーゼレポーターを導入すると、コントロールの細胞と比較して、転写活性が上昇していた。従って、*Scx* は間葉系幹細胞においても *Tnmd* の転写を正に制御することが明らかになった。今後、間葉系幹細胞を用いた再生治療への足がかりとなると期待される。

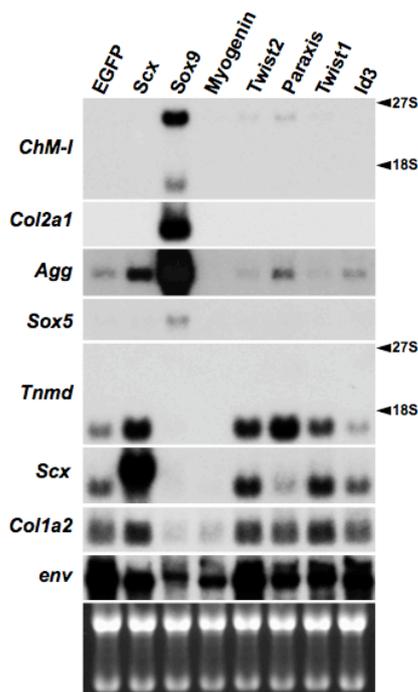


図1: 転写因子の過剰発現による *Tnmd* 遺伝子の発現変化

(5) 転写因子の結合特性

ゲルシフトアッセイを行なって、*Scx* と *Twist1* が TATA box の上流にある 5 番目の E-box に結合することを明らかにした。また、Ets ファミリーの転写因子である ETV4 や ETV5 がこの E-box の近傍にある配列に結合することも明らかになった。*Scx* は、TATA box 近傍の 2 番目の E-box にも結合することも確認している。

(6) *Scx* 発現領域における *Tnmd* の発現局在

Scx の組織特異的転写制御領域を用いて作成した *ScxGFP* トランスジェニックマウスと *Sox9* の遺伝子座に *Cre-recombinase* を knock-in したマウスを用いて、腱細胞への分化過程で、*Scx*⁺/*Sox9*⁺ 前駆細胞と *Scx*⁺/*Sox9*⁻ 前駆細胞が存在することを明らかにした。*Scx*⁺/*Sox9*⁺ 前駆細胞では、腱細胞への分化に先立って、*Sox9* の発現が低下していた。*Scx*⁺/*Sox9*⁻ 前駆細胞に由来する分化細胞は、腱では骨格との付着部である Enthesis に集積していた。Enthesis では、I 型コラーゲンは発現しているが、*Tnmd* も *Chm1* も発現していない未分化な領域が存在していた。将来、線維軟骨細胞を生み出す細胞集団である可能性が示唆された (図2)。

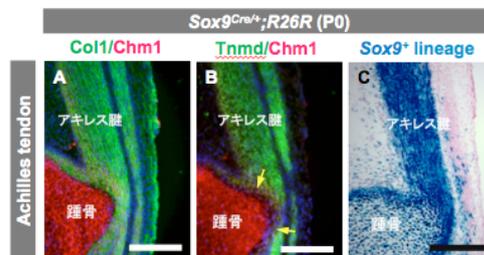


図2: Sox9陽性細胞に由来するアキレス腱付着部における *Tnmd* 陰性領域

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Y. Sugimoto, A. Takimoto, H. Akiyama, R. Kist, G. Scherer, T. Nakamura, Y. Hiraki, and C. Shukunami. *Scx*⁺/*Sox9*⁺ progenitors contribute to the establishment of the junction between tendon/ligament. *Development*. 140: 2280-2288, 2013 (DOI: 10.1242/dev.096354) 査読有り

② Y. Komiyama, S. Ohba, N. Shimohata, K. Nakajima, H. Hojo, F. Yano, T. Takato, D.

Docheva, C. Shukunami, Y. Hiraki, and U.I. Chung. Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion. PLoS One. 8: e60203, 2013 (DOI: 10.1371/journal.pone.0060203) 査読有り

③ 宿南知佐: 腱・靭帯形成の制御メカニズム、Pharma Medica, 31:43-46, 2013 総説 査読無し

④ Y. Sugimoto, A. Takimoto, Y. Hiraki, C. Shukunami. Generation and characterization of ScxCre transgenic mice. Genesis. 51: 275-283, 2013 (DOI:10.1002/dvg.22372) 査読有り

⑤ A. Takimoto, M. Oro, Y. Hiraki, and C. Shukunami. Direct conversion of tenocytes into chondrocytes by Sox9. Exp Cell Res. 318: 1492-1507, 2012 (DOI: 10.1016/j.yexcr.2012/04/002) 査読有り

⑥ 宿南知佐: 腱の形成と再生-Tenomodulin、臨床整形外科. 46:528-532, 2011 総説、査読無し

⑦ P. Alberton, C. Popov, M. Prägert, J. Kohler, C. Shukunami, M. Schieker, and D. Docheva. Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. Stem Cells Dev, 21, 846-858, 2011 (DOI: 10.1089/scd.2011.0150) 査読有り

⑧ K. Yukata, Y Matsui, C. Shukunami, A Takimoto, N, Hirohashi, O. Ohtani, T. Kimura, Y. Hiraki, and N. Yasui. Differential expression of tenomodulin and chondromodulin-1 at the insertion site of the tendon reflects a phenotypic transition of the resident cells. Tissue Cells, 48, 116-120, 2010 (DOI 10.1016/j.tice.2010.02.002), 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

① 杉本由紀、滝本晶、秋山治彦、中村孝志、開祐司、宿南知佐: 腱・靭帯付着部形成における Scx/Sox9 陽性細胞の役割、第 15 回骨・再生研究会 (招待講演)、2012. 11. 10、東京

② 川津正慶、宿南知佐、滝本晶、岩崎将也、清流正弘、池田悦子、山本照子: 矯正歯の移動モデルを用いた歯根膜における Scleraxis の機能解析、第 17 回日本矯正歯科学会、2012. 09. 27、盛岡

③ 宿南知佐: 腱・靭帯形成とその制御第、30 回日本骨代謝学会学術集会 (招待講演)、2012. 7. 21、東京

④ 滝本晶、宿南知佐、川津正慶、清流正弘、山本照子、開祐司: Scleraxis の発現とその制御 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 (招待講演)、2012. 7. 19、東京

⑤ 宿南知佐: 腱・靭帯の形成と再生、第 26 回日本整形外科学基礎学術集会 (招待講演)、2011. 10. 21. 群馬県民会館、群馬

⑥ 宿南知佐: 腱・靭帯形成の制御、第 18 回プロテオグリカンフォーラム (招待講演)、2011. 2. 9. 東京医科歯科大学、東京

[その他]

研究室のホームページ

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te01/index-j.htm>

発表論文⑧に関連して、Stem Cells & Regeneration from Development の Image Gallery に取り上げられた画像が納められているホームページ

<http://stemcells.dev.biologists.org/page/image-gallery>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宿南 知佐 (Shukunami Chisa)
京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号: 60303905

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

(4) 研究協力者

杉本 由紀 (Sugimoto Yuki)
京都大学・再生医科学研究所・研究生

島村 仁子 (Shimamura Satoko)
京都大学・再生医科学研究所・大学院生