

令和元年6月9日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10899

研究課題名(和文) Pax1による椎間板の形成・恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms underlying the intervertebral disc formation and homeostasis regulated by Pax1

研究代表者

滝本 晶 (Takimoto, Aki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：00378902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アグリカン遺伝子の上流の転写調節領域(UE)に転写因子である Pax1/Pax9が結合し、Sox9による転写活性の上昇を抑制することを見出した。また、Pax1欠失マウスを解析し、Pax1が正常な椎間板線維輪の形成と維持に必要であることを明らかにした。更に、UE欠失マウスの解析から、UEが線維輪におけるアグリカンの主要な転写促進領域であることが示唆された。従って、UEを介したPax1/Pax9と Sox9による転写調節は、線維輪において緻密に制御されたアグリカンの発現勾配の形成に寄与していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pax1とPax9は正常な脊柱形成に必要であることが報告されているものの、これらの転写因子が直接的に制御する遺伝子を特定した研究はごく少数にとどまっていた。本研究では、Pax1/Pax9がアグリカンの転写調節に直接的に関わることを明らかにし、Sox5/Sox6/Sox9を含めた転写因子によるアグリカンの転写調節機構を提唱した。アグリカンは椎間板に存在する重要な細胞外基質成分の一つであり、線維輪ではその発現量が厳密に調整されることで様々な力学負荷に対応できる構造が維持されている。本研究で解明されたアグリカンの転写調節機構は、椎間板変性疾患の原因究明や新規治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified a Pax1/Pax9-binding site in a previously identified enhancer 10 kb upstream of the Aggrecan (Acan) gene (UE). Through a Pax1/Pax9-binding site that partially overlaps with a Sox9-binding site in the UE, Pax1/Pax9 competes with Sox9 for occupancy of the binding site that results in a reduction in Acan transactivation, but in the absence of Sox9, Pax1/Pax9 weakly transactivates the UE. Analysis of Pax1 knockout mice revealed the essential role of Pax1 in the formation and maintenance of the annulus fibrosus (AF) of the intervertebral disc. Deletion of the genome region containing the UE resulted in decreased endogenous Acan expression in the AF, suggesting that the UE is a major enhancer that regulates Acan expression in the AF. These results suggest that transcriptional regulation by Pax1/Pax9 and Sox9 via the UE contribute to the establishment of the graded expression and accumulation of Acan in the AF.

研究分野：発生学

キーワード：転写因子 椎間板 細胞外基質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Paired box gene 1 (*Pax1*)は、体節形成期において硬節で発現する転写因子である。椎骨の軟骨形成が開始すると、*Pax1* の発現は軟骨組織では低下して椎間板原基と軟骨膜に局限する。その後、成熟な椎間板の形成に伴って、*Pax1* は外線維輪で発現する。硬節においては、*Pax1* と高いホモロジーを持つ転写因子 *Pax9* も発現する。*Pax1* と *Pax9* のダブルノックアウト (*Pax1*<sup>-/-</sup>;*Pax9*<sup>-/-</sup>)マウスの解析から、*Pax1* 又は *Pax9* が、硬節における *Nkx3.2* の発現に必要であることが明らかになっており、*Pax1*<sup>-/-</sup>;*Pax9*<sup>-/-</sup> マウスでは、椎骨の軟骨性骨原基と椎間板原基が欠失する (Development 126:5399-5408, 1999; Development 130:473-482, 2003)。その一方で、過去に報告されている *Pax1*<sup>-/-</sup> マウスの解析においては、椎間板の詳細な解析が欠如しており、椎間板形成における *Pax1* の役割はほとんど解明されていなかった (Proc Natl Acad Sci 95:8692-8697, 1998)。我々は、これまでに *Pax1* が軟骨細胞の成熟過程に対して抑制的に作用することを見出した (Exp Cell Res, 319:3128-3139, 2013)。更に、平成 27 年度までの若手研究 (B)採択課題において、*Pax1* がマウス *Acan* 遺伝子の約 10 kb 上流に存在するエンハンサー領域 (*upstream enhancer, UE*) (Mol Cell Biol 28:4099-5013, 2008)に直接的に結合し、軟骨細胞分化に必須の転写因子である *Sox9* による *Acan* の発現上昇を阻害することを明らかにした。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術によって作出した *Pax1* 欠失マウスにおいて、椎間板の形成と組織状態の変化を詳細に解析し、椎間板形成と恒常性維持における *Pax1* の役割を明らかにすることを目的とした。また、*Pax1* と *Sox9* が結合する *UE* 領域を欠失したマウスを作出し、*UE* の欠失が生体内における *Acan* の発現レベルにどのように影響するのかを検討した。更に、先行研究で明らかにした *Pax1* と *Sox9* による *Acan* の発現制御機構に関連して、*Pax9* が *UE* においてどのように作用するか、及び *Pax1* と *Sox9* の間に蛋白質間相互作用が存在するかについて検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Pax1* 欠失マウスの作出

*Pax1* 遺伝子のイントロン 1 からエキソン 2 の領域の一部を標的として、*mPax1-TALEN-R* と *mPax1-TALEN-L* を決定し、Platinum TALEN プラスミドを構築した。各プラスミドを線状化し、mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Kit (Ambion)を用いて mRNA を合成した。精製した *mPax1-TALEN-R* と *mPax1-TALEN-L* の mRNA を、C57BL/6 系統マウスの受精卵の細胞質に注入し、ファウンダーマウスを得た。得られたマウスの中から、フレームシフト変異により *Pax1* 蛋白質の大部分を欠失する個体を選び、マウス系統を確立した。

#### (2) *UE* 欠失マウスの作出

*UE* 領域を標的とした *crisprRNA* (*crRNA*)の配列の決定には、CRISPRdirect website (Bioinformatics 31:1120-1123, 2015)を利用した。化学合成した *crRNA*、*trans-activating crRNA*、及び *Cas9* 蛋白質を C57BL/6 系統マウスの受精卵の細胞質に注入し、ファウンダーマウスを得た。得られたマウスの中から *UE* 全体を含む領域を欠失した個体を選び、マウス系統を確立した。

#### (3) 組織染色と免疫染色

マウス胚を 4%PFA/PBS で 3 時間固定後、18% sucrose/PBS で置換し、OCT コンパウンドに凍結包埋した。凍結組織は、クライオスタットを用いて 8 μm に薄切した。出生後のマウスの組織は、灌流固定後、川本法を利用して非脱灰凍結切片を作製した (Arch Histol Cytol 66:123-143, 2003)。トルイジンブルー染色 (pH4) 又はアルシアンブルー染色 (pH1) により、切片上の軟骨性プロテオグリカンを検出した。免疫染色には、*Pax1*、*Pax9*、*Sox5*、*Sox6*、*Sox9*、*Col1*、*Col2*、及び *Acan* に対する一次抗体と蛍光標識した二次抗体を使用した。

#### (4) ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは、Gelshift Chemiluminescent EMSA kit (Active Motif)を用いて行った。先行研究において同定した *Pax1* の結合部位を含むマウス *UE* のオリゴ DNA をビオチンラベルし、*Pax1* 及び *Pax9* 蛋白質の結合活性を確認した。また、ヒト及びラットの *UE* 配列を用いて、*Pax* 蛋白質の結合活性を確認した。

#### (5) デュアルルシフェラーゼアッセイ

マウス *UE* を用いて、ホタルルシフェラーゼレポータープラスミド (pGL4.23[luc2/minP]) を構築した。HEK293T 細胞又は軟骨細胞に、ホタルルシフェラーゼレポーター、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]、及び *Pax1*、*Pax9*、*Sox5*、*Sox6*、又は *Sox9* を発現する pcDNA3 プラスミド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。ルシフェラーゼの活性は、ルミノメーター (Centro XS3 LB960, Berthold Technologies)を用いて測定した。

(6) 共免疫沈降

Sox9 蛋白質と FLAG ラベルした Pax1 蛋白質、及び抗 FLAG M2 抗体(Sigma)を混合して 4 時間インキュベートした後、Protein G magnetic beads (Active motif)を加えて更に 1 時間インキュベートした。洗浄後、Protein G magnetic beads から蛋白質を溶出し、western blotting によって Sox9 及び Pax1 を検出した。ポジティブコントロールとして、Sox9 蛋白質と FLAG ラベルした Runx2 蛋白質を使用して同様の実験を行った。

4. 研究成果

(1) Pax1 欠失マウスにおける椎間板線維輪の解析

Pax1 欠失マウスの椎間板線維輪の形成を詳細に解析するため、Pax1 欠失マウスと ScxGFP トランスジェニックマウス(Genesis 51:275-283, 2013)を交配し、マウス胚及び生体マウスの椎間板の組織切片を作製して解析した。椎間板外線維輪で発現する Scx を GFP によって検出した結果、Pax1 欠失マウスでは、椎間板形成直後から外線維輪が低形成になっていることが明らかになった。Pax1 欠失マウスにおける外線維輪の低形成は、成熟マウスにおいても持続していた。また、一定の月齢を過ぎた成熟マウスでは、椎間板線維輪に Acan を含む軟骨性プロテオグリカンの蓄積の増加と組織変性が認められた。

(2) UE 欠失マウスの椎間板線維輪における Acan 発現レベルの解析

3 週齢の UE 欠失マウス系統の野生型(UE<sup>+/+</sup>)、ヘテロ(UE<sup>d/+</sup>)、及び欠失(UE<sup>d/d</sup>)マウスの尾の椎間板線維輪及び肋軟骨から RNA を抽出し、逆転写反応によって得られた cDNA を定量的 PCR 法によって解析した(図 1)。その結果、UE 欠失マウスでは、野生型マウスと比較して Acan の発現レベルが線維輪で約 40%、軟骨組織で約 30%低下していた。従って、Pax1/Pax9 と Sox9 が結合する Acan の転写調節領域は、椎間板線維輪及び軟骨組織における Acan の遺伝子発現に重要な役割を担っていることが明らかになった。

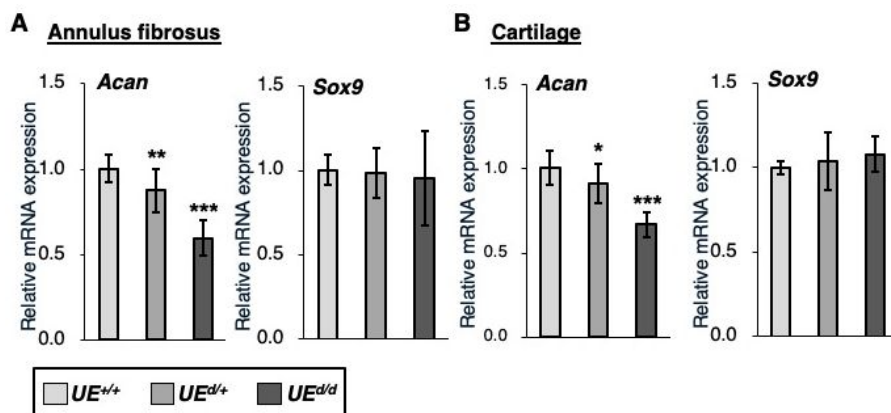


図 1. UE 欠失マウス系統の線維輪(A)及び軟骨組織(B)における Acan と Sox9 の発現レベル。

\* $P < 0.05$  versus UE<sup>+/+</sup>, \*\* $P < 0.01$  versus UE<sup>+/+</sup>, \*\*\* $P < 0.001$  versus UE<sup>+/+</sup>

(3) 脊柱の形成過程における Pax1/Pax9 と Sox5/Sox6/Sox9 の局在

椎間板形成前の E13.5 と形成後の E16.5 のマウス胚において、Pax1、Pax9、Sox5、Sox6、Sox9、及び Acan の免疫染色を行った。E13.5 において、Pax1 と Pax9 は主に椎間板線維輪の原基に発現していたが、Sox5、Sox6、及び Sox9 の発現は椎骨の軟骨性骨原基と椎間板線維輪の原基の両方に認められた。軟骨性プロテオグリカンの蓄積を示すトルイジンブルーの異染性と Acan の染色性も、椎骨と椎間板線維輪の原基の両方に認められたが、椎間板線維輪の原基における蓄積量は椎骨部分よりも少なかった。E16.5 では、椎間板の外線維輪において Pax1、Pax9、及び Sox9 の共局在が認められた。Sox5 と Sox6 は、Sox9 と共に内線維輪と軟骨組織に発現していた。トルイジンブルーの異染性と Acan は主に内線維輪と軟骨組織に認められたが、外線維輪においても少量の染色性が確認された。

以上の結果から、椎間板形成過程では、Sox5/Sox6/Sox9-positive かつ Pax1/Pax9-negative の組織では軟骨性プロテオグリカンが多く蓄積しているが、Sox9 又は Sox5/Sox6/Sox9-positive かつ Pax1/Pax9-positive の組織では軟骨性プロテオグリカンの量が少ない状態で維持されている傾向が認められた。

(4) Pax1/Pax9 の UE への結合と転写活性に対する影響

我々は、先行研究において Pax1 がマウス UE の一部に直接的に結合し、Sox5/Sox6/Sox9 による UE の転写活性の上昇を抑制することを明らかにした。本研究で、Pax9 を用いてルシフェラーゼアッセイ(図 2)及びゲルシフトアッセイを行った結果、Pax9 も UE に対して Pax1 と同様の作用を有することが明らかになった。また、ヒト及びラットの UE の配列に対しても、Pax1 及び Pax9 が直接的に結合することを確認した。

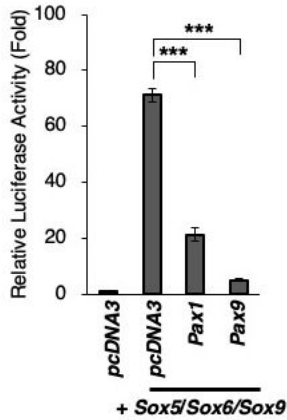


図 2. Pax1 と Pax9 は Sox5/Sox6/Sox9 による *UE* の転写活性の上昇を抑制する . HEK293T 細胞に *pGL4.23[luc2/minP]-4xUE-Luc* 及び Pax1、Pax9、Sox5、Sox6、又は Sox9 の発現ベクターをトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した。\*\*\* $P < 0.001$  versus *pcDNA3*

- (5) Pax1 と Sox9 の蛋白質間相互作用  
Pax1 と Sox9 の蛋白質間相互作用を、共免疫沈降法により確認した結果、Pax1 は Sox9 に直接的に結合することが明らかになった。従って、Sox9 による *UE* の転写活性の上昇に対する Pax1 の抑制作用には、*UE* における両蛋白質の競合的な結合の他に、Pax1 と Sox9 の間の蛋白質間相互作用も影響している可能性が示唆された。
- (6) 椎間板線維輪における *Acan* の発現制御機構  
本研究の結果を総括して、Pax1/Pax9 と Sox5/Sox6/Sox9 による *Acan* の発現制御機構を提唱した(図 3)。 *UE* において、Pax1/Pax9 は Sox9 の結合を阻害することにより、*Acan* の著しい発現上昇を抑制していると考えられる。

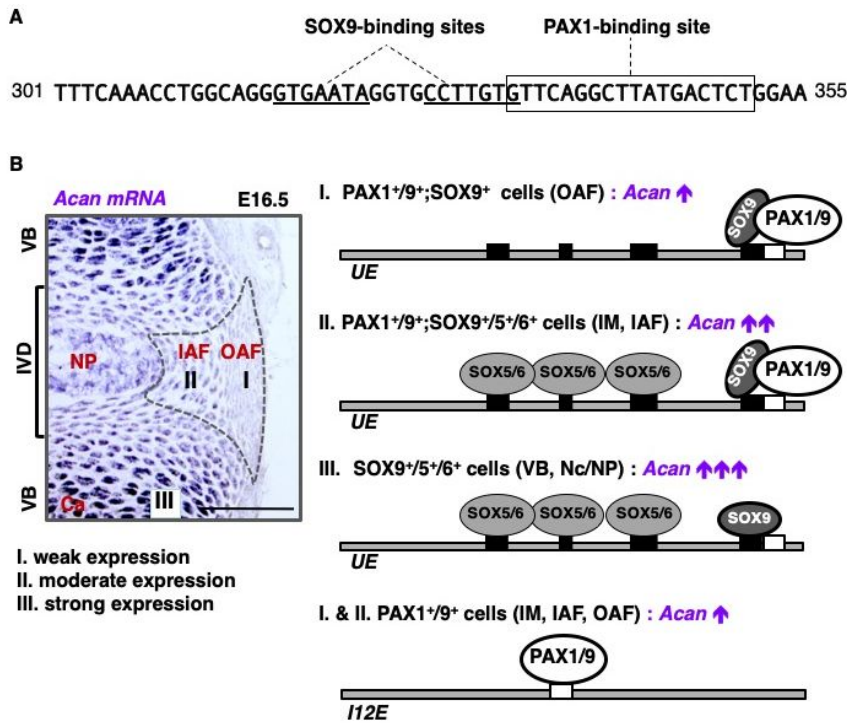


図 3. Pax1/Pax9 と Sox5/Sox6/Sox9 による *Acan* の発現制御 . (A) *UE* における Pax1 と Sox9 の結合部位。(B) E16.5 のマウス胚の椎間板における *Acan* の発現(左)と *UE* における Pax1/Pax9 と Sox5/Sox6/Sox9 の結合(右)。Sox9 あるいは Sox5/Sox6/Sox9 と Pax1/Pax9 が共発現している組織(I, II)では *Acan* の発現レベルが低～中程度に維持されているが、Pax1/Pax9 が発現せず Sox5/Sox6/Sox9 が発現している組織(III)では、高いレベルの *Acan* の発現が認められる。Ca, 軟骨; IAF, 内線維輪; IM, 椎間板原基; IVD, 椎間板; Nc, 脊索; NP, 髄核; OAF, 外線維輪; VB, 椎体 .

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Aki Takimoto, Chikara Kokubu, Hitomi Watanabe, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Gen Kondoh, Yuji Hiraki, Chisa Shukunami: Differential transactivation of the upstream aggrecan enhancer regulated by PAX1/9 depends on SOX9-driven

transactivation. *Scientific Reports* 9, Article number: 4605 (2019) 査読有.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40810-4>

〔学会発表〕(計 3 件)

宿南知佐: Regulation of intervertebral disc development by Scx, Sox9, and Pax1. Cartilage Biology & Pathology, Gordon Research Conference. 2017. イタリア

滝本晶: Pax1/9 による椎間板 ECM の発現制御と恒常性維持. 第 18 回運動器科学研究会. 2017. 広島

滝本晶、宿南知佐: 転写因子 Pax1/9 による Aggrecan の発現制御と椎間板組織における役割. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018. 神奈川

宿南知佐: 椎間板の形成と恒常性維持における Pax1/9 の役割. 第 33 回日本臨床リウマチ学会. 2018. 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/50282>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 宿南 知佐

ローマ字氏名: (SHUKUNAMI, chisa)

所属研究機関名: 広島大学

部局名: 医歯薬保健学研究科 (歯)

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 60303905

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。