

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659718

研究課題名（和文） 運動器コンポーネントの連結を解析するインビボシステムの構築

研究課題名（英文） Establishment of genetically modified mice for the analysis of tendon/ligament formation and regeneration

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）：発生過程において、転写因子であるスクレラキシスは、骨格への腱・靭帯付着部近傍の前駆軟骨細胞で一過性に発現し、腱・靭帯では前駆細胞と分化細胞の両方で発現する。一方、II型膜貫通型糖蛋白質であるテノモジュリンは、分化成熟した腱・靭帯細胞で特異的に発現する。本研究では、これらの遺伝子の発現領域でクレリコンビネースや蛍光レポーターを特異的に発現する遺伝子改変動物を作成し、運動器コンポーネントの連結を解析するインビボシステムを構築した。

研究成果の概要（英文）：During mouse development, *Scleraxis* (*Scx*), a basic-helix-loop-helix transcription factor, is continuously expressed in the tendon/ligament cell lineage, but transiently expressed in chondroprogenitors near the prospective attachment sites of tendons/ligaments into the skeletal elements. *Tenomodlin* (*Tnmd*), a type II transmembrane glycoprotein, is expressed in mature tenocytes and ligamentocytes. In this study, we have successfully generated genetically modified mice expressing *Cre-recombinase* or fluorescent reporter genes in the expression domains of *Scx* or *Tnmd* as valuable tools for the analysis of tendon/ligament formation and regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：Scleraxis、Tenomodulin、腱、靭帯、運動器

1. 研究開始当初の背景

運動器の連結システムの要となる腱・靭帯は、栄養血管が極めて乏しいので、外傷などで生じる瞬間的な外力によって、一旦、損傷されると、癒痕修復に移行し、機能的、生体力学的に十分に再生させることは極めて困難である。とりわけ、靭帯の機能障害は、変形性関節症の発症に密接に関連しており、運動器の中でも、組織再生の重要な標的であると認識されている。しかしながら、長い間、腱・靭帯の特異的分子マーカーが知られていな

かったため、再生はおろか形成に関する研究も立ち後れているのが現状である。

近年、研究代表者は、軟骨由来血管新生抑制因子 *Chondromodulin-1* の関連遺伝子として、腱・靭帯などを含む強靭結合組織で特異的に発現する血管新生抑制因子 *Tenomodulin* (*Tnmd*) をクローニングした。一方、Harvard大学のDr. Tabinらのグループは、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であることを報告し、前駆

腱細胞を含む Syndetome という体節の4番目のコンポーネントの存在を提唱した。

*Tnmd*や*Scx*のような特異的分化マーカーの報告によって、腱・靭帯形成や再生機構の解析に参入する研究者の数は確実に増加している。世界に先駆けた腱・靭帯のインビボの解析システムの構築と整備は、運動器の連結システムの形成機構だけでなく再生の解析に寄与することが期待されている。

2. 研究の目的

運動器コンポーネントを連結する腱・靭帯の形成や再生過程の解析に必要な新しいインビボシステムの構築を目指す。まず、腱・靭帯形成の初期から発現するb-HLH型転写因子*Scx*の組織特異的な転写制御領域に存在すると想定される軟骨と腱・靭帯での特異的発現を担う enhancer 領域を同定する。次に、同定された転写制御領域を用いて、腱・靭帯形成の過程で特異的に *Cre-recombinase* (*Cre*) を発現する transgenic (Tg) マウスの系統を樹立する。これらの Tg マウスや *Scx* の遺伝子座に *Cre* を knock-in (KI) した *Scx^{Cre}* KI マウスと蛍光レポーターマウスを交配して、運動器形成過程における *Scx* 陽性細胞の発現局在の詳細を明らかにする。また、腱・靭帯の成熟に伴って発現する II 型膜貫通型蛋白質 *Tnmd* の遺伝子座に *Cre* を knock-in した *Tnmd^{Cre}* KI マウスを作成する。

3. 研究の方法

(1) 組織特異的転写制御領域の検索

腱・靭帯、軟骨での特異的転写制御を担うマウス *Scx* 遺伝子の下流 10.8 kb の領域を分割し、*hsp68 minimal promoter* と *LacZ* レポーターの上流に挿入し、制限酵素によってトランスジーンを切り出した。精製したトランスジーンをマウス受精卵の前核へ微量注入し、Tg マウスを作成した。X-gal 染色によって Tg マウスにおける *LacZ* レポーターの発現を解析し、組織特異的 enhancer 活性の評価を行った。ゼブラフィッシュでは、*GATA2 minimal promoter*、*GFP*、*insulator*、*tol2 elements* を有する Zebrafish enhancer detector (*ZED*) *Vector* に挿入した DNA とトランスポゼース mRNA を 1 細胞期のゼブラフィッシュ胚に注入して、enhancer 活性の評価を行った。

(2) *Scx^{Cre}* KI マウスと *Tnmd^{Cre}* KI マウスの作成

Scx^{Cre} KI マウスと *Tnmd^{Cre}* KI マウスのターゲットベクターを構築し、Embryonic stem (ES) 細胞に導入後、相同組換えした ES 細胞を胚盤胞へ注入してキメラマウスを得た。次

に、キメラマウスと *flippase* を発現する *FLPe* マウスと交配し、*FRT-flanked PGK-neo-pA* を targeted allele から欠失させた。更に、得られたマウスと野生型マウスを交配し遺伝子組換えマウスを得た。

(3) *Scx* 陽性細胞の局在分布の解析

ScxCre KI、*ScxCre-L Tg*、*ScxCre-H Tg* マウスをそれぞれ *Rosa-CAG-LSL-tdTomato (Ai14)* や *ROSA26* のようなレポーターマウスと交配し、X-gal 染色あるいは蛍光の発現を観察することによって、発生過程における *Scx* 陽性細胞の局在分布を解析した。

(4) 発現局在の解析

免疫染色、*in situ* hybridization による解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Scx* の組織特異的転写制御領域の検索と Tg マウスの作成

腱・靭帯の前駆細胞で発現が検出されるマウス *Scx* 遺伝子は2つのエクソンで構成され、*block of proliferation 1 (BOPI)* の3番目のイントロン内に、逆向きに存在している。遺伝子の上流-4kb から下流+5 kb を含む 10.8 kb 領域は、*Scx* の組織特異的な転写制御を担っている (図1)。この領域内にあるエクソン1に存在する翻訳開始点に *EGFP* を挿入した領域を用いて作成した *ScxGFP Tg* では、腱・靭帯や一部の軟骨の前駆細胞、腱・靭帯細胞で特異的に *GFP* を発現する (図2)。また、Tg マウスを使った *LacZ* レポーター解析によって、*Scx* 遺伝子の下流 5.3 kb の領域に、腱・靭帯、軟骨での特異的転写制御を担う enhancer 活性が存在することが明らかになった。

ゼブラフィッシュ胚にマウス *Scx* の組織特異的転写制御領域を挿入した *ZED Vector* とトランスポゼース mRNA を注入して *GFP* の発現を解析した実験では、特異的な enhancer 活性が検出できなかった。一方、ゼブラフィッシュ *Scx* 遺伝子に *EGFP* を挿入した BAC clone をトランスポゼース mRNA と共に、ゼブラフィッシュ胚に注入すると、enhancer 活性が検出された。

マウス *Scx* 遺伝子の下流 5.3 kb の領域を分割して Tg マウスにおける *LacZ* レポーターの発現を解析すると、複数の領域に組織特異的制御領域があることが明らかになったが、前駆腱・靭帯細胞のみで発現する領域の同定には至っていない。これは、腱・靭帯細胞と一部の軟骨細胞の集団が共通の前駆細胞から分化しているからではないかと考えている。しかしながら、マウスの発生過程において、前駆軟骨細胞での *Scx* の発現は一過性で

あることが判明している。従って、タモキシフェン誘導性 Cre を用いてマウスを作成することによって、前駆軟骨細胞での Cre の発現を回避出来ると考えられる。そこで、マウス *Scx* の 10.8 kb の組織特異的発現制御下で *CreERT2* を発現する Tg マウスを作成し、系統を樹立し解析中である。発生過程において、*Scx* の軟骨での内在性の発現が検出されなくなる時期にタモキシフェンを作用させることにより、腱・靭帯特異的に Cre の発現が誘導される有用なインビボシステムになると考えられる。

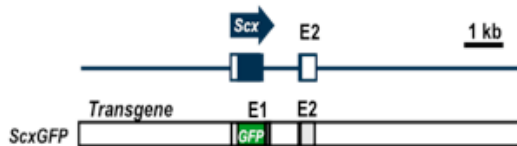


図1: *Scx* 遺伝子と *ScxGFP* transgene

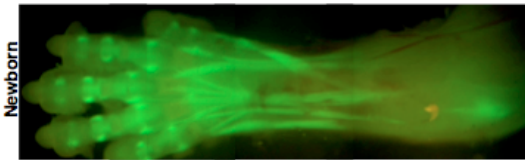


図2: *ScxGFP Tg* における GFP の腱・靭帯特異的発現

(2) *Scx^{Cre}* KI マウスと *Tnmd^{Cre}* KI マウスの作成

Scx と *Tnmd* 遺伝子のエクソン1の翻訳開始点に in-frame で Cre を挿入し、positive selection marker として *FRT-flanked PGK-neo-pA*、negative selection marker として Diphtheria toxin (*DTA*) を挿入したターゲティングベクターを構築した。これらのターゲティングベクターをエレクトロポレーションによって ES 細胞に導入後、薬剤耐性スクリーニングによって陽性クローンを得た。PCR とサザンブロットによって相同組換えによる遺伝子座への Cre の knock-in を確認後、陽性クローンの ES 細胞を胚盤胞へ注入し、キメラマウスを作成した。得られたキメラマウスは、flippase を発現する *FLPe* マウスと交配し、*FRT-flanked PGK-neo-pA* を targeted allele から欠失させ、標的遺伝子組換え体マウスを作成した。これらのマウスは、腱・靭帯形成領域で Cre を発現するマウスとして有用な解析システムになることが期待される。

(3) 腱・靭帯における Cre の発現

ScxGFP Tg マウスあるいは *ScxCre* Tg マウス (*ScxCre-L* Tg マウスと *ScxCre-H* Tg マウス) と *ROSA26* レポーターマウスを交配し、X-gal 染色により Cre を発現する細胞集団を解析し

た(図3)。*in situ* hybridization を行って、内在性の *Scx* 遺伝子の発現と比較すると、*Scx* は、腱・靭帯付着部近傍の前駆軟骨細胞で一過性に発現し、腱・靭帯では前駆細胞と分化細胞の両方で発現していることが明らかになった。樹立した2系統のうち、*ScxCre-L* Tg マウスの軟骨での Cre の発現は *ScxCre-H* Tg マウスよりも限局していた(図3)。また、*Scx^{Cre}* KI マウスを *Ai14* レポーターマウスと交配した *Scx^{Cre/+}; Ai14* マウスでは、腱・靭帯において tdTomato の発現を検出することが出来るが(図4)、内在性の *Scx* の遺伝子発現が一過性の腱・靭帯付着部近傍の前駆軟骨細胞由来の軟骨細胞においては、Cre の発現が一部の分化細胞でのみ検出された。その一方で、長管骨において、これまでに知られていない *Scx* 陽性細胞が存在することが判明している。また、*Scx^{Cre/Cre}* を用いて、*Scx* 遺伝子の発現が欠失したマウスの表現型を解析し、まだ報告されていない新たな表現型を見出している。このように、複数の遺伝子改変マウスの系統を樹立することに成功し、今後、運動器コンポーネントを連結する分子メカニズムを明らかにする研究に寄与することが、大いに期待される。

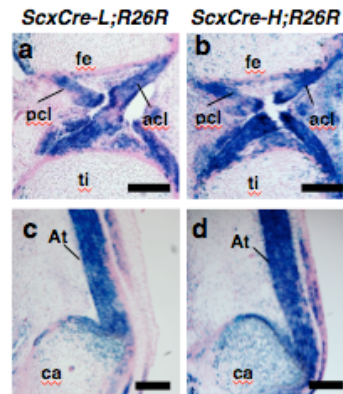


図3: *ScxCre-L;R26R* と *ScxCre-H;R26R* の X-gal 染色
膝関節の十字靭帯 (a, b) とアキレス腱とその付着部 (c, d) を示す。At, Achilles tendon; ca, calcaneus; fe, femur; fi, fibura; pcl, posterior cruciate ligament; ti, tibia. Scal bar, 200 μ m.

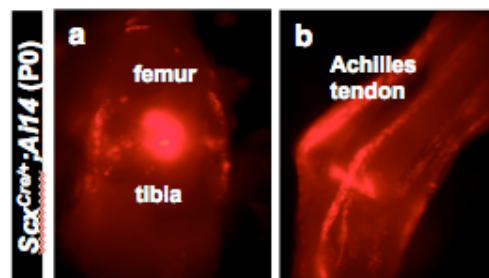


図4: *Scx^{Cre/+}; Ai14* における tdTomato の発現
膝関節 (a) とアキレス腱とその付着部 (c) を示す。

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 7 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 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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: 矯正的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