

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861186

研究課題名(和文) Pax1による転写制御を介した脊柱組織構築の分子メカニズム

研究課題名(英文) Regulation of vertebral column development by Pax1

研究代表者

滝本 晶 (Takimoto, Aki)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・助教

研究者番号：00378902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：硬節で発現する転写因子Pax1は、椎骨の軟骨形成が開始すると非軟骨性の椎間板領域に局在する。本研究では、椎間板細胞においてPax1が制御する遺伝子ターゲットの解析を行い、椎骨と椎間板の繰り返し構造の形成におけるPax1の役割について検討した。その結果、Pax1は特定の軟骨性基質分子の発現制御領域に結合し、軟骨細胞分化に必須の転写因子であるSox9による転写活性化を阻害することが明らかになった。本研究の成果から、Pax1により発現が制御される遺伝子が新たに明らかとなり、Pax1は軟骨性基質分子の発現を調節することで脊柱の組織構築に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pax1 is a paired-box-containing transcription factor that is expressed in the sclerotome of developing axial skeleton. As cartilage formation proceeds, Pax1 expression is downregulated in the cartilage and its transcripts become localized to the annulus fibrosus of intervertebral discs (IVDs). This study aims to investigate target genes of Pax1 in IVDs and the potential role of Pax1 during vertebral column development. In the annulus fibrosus cells, knockdown of Pax1 using siRNA resulted in the upregulation of certain cartilage matrix genes. Chromatin-immunoprecipitation and gel shift assays revealed a novel Pax1-binding site present in the enhancer element of cartilage matrix gene. These results suggest that Pax1 negatively regulates the expression of cartilage matrix gene via a competitive binding to its enhancer element in IVD cells, which may contribute to the establishment of cartilaginous and non-cartilaginous tissue boundaries during vertebral column formation.

研究分野：発生学

キーワード：転写制御 組織形成 椎間板 軟骨

1. 研究開始当初の背景

脊柱は椎骨と椎間板の規則正しい繰り返し構造により構築されている。脊柱を構成する組織の由来は硬節であることが知られているが、軟骨形成期以降における脊柱の組織構築のメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。硬節で発現する *Paired box gene 1 (Pax1)* は、脊柱形成に重要な役割を担う転写因子である。硬節における *Pax1* の発現は、軟骨形成の開始に伴って、軟骨組織では低下し椎間板の線維輪に局在する。申請者は本研究の開始までに、*Pax1* が軟骨細胞の成熟過程を抑制することを明らかにし、形成過程の椎骨間に発現する *Pax1* が、脊柱の繰り返し構造の形成と維持に関わっていることを報告していた。一方で、*Pax1* が軟骨細胞の成熟を抑制する作用に関しては、どのような遺伝子の発現制御が関与しているのかを含めてそのメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、*Pax1* により直接制御される遺伝子とその制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、軟骨性の細胞外基質の主要なプロテオグリカンである *Aggrecan (Acan)* の発現制御における *Pax1* の役割解明を目指した。また、*Pax1* による転写制御が椎間板形成を含めた脊柱の組織構築にどのように作用しているのかを検討するため、椎間板線維輪細胞を用いた *in vitro* 解析と共に、*in vivo* での *Pax1* の発現パターン解析及び *Pax1* の過剰発現についても検討した。*Pax1* により転写制御される遺伝子とその制御機構を明らかにすることにより、椎間板線維輪における *Pax1* の役割を明らかにするための重要な知見が得られると期待された。

3. 研究の方法

(1) *Pax1* の発現パターン解析

生体内における *Pax1* の発現局在を調べるため、マウス胚及び成体マウスの脊柱組織から凍結切片を作製し、免疫染色法及び *in situ* hybridization により解析した。軟骨細胞マーカーとして、*Sry-box containing gene 9 (Sox9)*、*type II collagen (Col2a1)*、*Acan*、及び線維性結合組織のマーカーとして *type I collagen (Col1a1)*、及び *Scleraxis (Scx)* の発現についても検討した。

(2) 軟骨組織における *Pax1* の過剰発現

硬節で発現する *Pax1* は、軟骨組織形成が開始すると軟骨での発現は低下して椎間板に局在する。軟骨細胞の分化過程における *Pax1* の作用を検討するため、*Col2a1* のプロモーター/エンハンサーの制御下で *Pax1* を発現するトランスジェニックマウス (*Col2a1-Pax1 Tg*) を作製し、脊柱の骨格形成及び遺伝子発現を、アルシアンブルー/アリザリンレッド染色及び *in situ*

hybridization により解析した。

(3) 椎間板線維輪細胞の分離培養

椎間板線維輪細胞を組織から分離し、安定して培養維持するための方法を検討した。マウス又はラットの尾椎から採取した椎間板を使用し、酵素消化法と outgrowth 法(這出し法)による細胞の分離、培養ディッシュのコーティング剤、及び培地の種類について最適な条件を探索した。培養細胞の維持は、37℃、5% CO₂ の条件下で行った。また、分離培養した椎間板線維輪細胞の遺伝子発現を、RT-PCR 法により評価した。

(4) 椎間板線維輪細胞における *Pax1* のノックダウン

椎間板における *Pax1* の役割を検討するため、分離培養した椎間板線維輪細胞において、RNA 干渉法による *Pax1* 遺伝子のノックダウンを検討した。*Pax1* を標的とした siRNA は、Dharmacon (GE healthcare) より購入した。更に、*Pax1* をノックダウンした椎間板線維輪細胞を用いて pellet culture による軟骨分化誘導を行い、軟骨細胞分化における *Pax1* の役割を検討した。軟骨分化誘導には、20 日間の培養期間を要するため、レンチウイルスを用いた shRNA 発現系を利用した。椎間板線維輪細胞における *Pax1* 遺伝子のノックダウン効率及び各種遺伝子の発現レベルの変化は、リアルタイム定量的 PCR 法により解析した。

(5) 椎間板線維輪細胞を用いたクロマチン免疫沈降解析

椎間板線維輪細胞に発現する *Pax1* がどのような遺伝子の発現制御に関与しているのかを検討するため、ChIP-IT Express kit (Active Motif) を用いてクロマチン免疫沈降解析を行った。椎間板線維輪細胞をホルムアルデヒドで固定して回収し、超音波処理により破碎した後、得られたクロマチンを抗体及び Protein G magnetic beads と共にインキュベートした。免疫沈降物を適切な条件で洗浄後、DNA を溶出し、PCR 法により解析した。

(6) ゲルシフトアッセイ

Acan のエンハンサーにおける *Pax1* の結合部位を同定するため、Gelshift Chemiluminescent EMSA kit (Active Motif) を用いてゲルシフトアッセイを行った。申請者は本研究の開始までに、既に報告されている 359 bp の *Acan* エンハンサー (Mol Cell Biol 28:4099-5013, 2008) における *Sox9* の転写活性化作用を、*Pax1* が抑制することを見出していた。そこで、この *Acan* エンハンサーに *Pax1* が直接結合するかどうかを検討するため、359 bp の DNA 配列を分割して *Pax1* 蛋白質との結合活性を解析し、*Pax1* の結合部位を同定した。

4. 研究成果

(1) 椎間板における Pax1 と Sox9 の共局在

マウス胚において Pax1 の免疫染色を行った結果、E13.5 の脊柱組織では、Pax1 の発現は非軟骨性の椎間板領域に局在していた。軟骨形成に必須の転写因子である Sox9 の発現は、椎骨の軟骨性骨原基と Pax1 陽性の椎間板領域の両方に認められた。E13.5 以降の椎間板領域には、アルシアンブルーで染色される酸性ムコ多糖の蓄積はほとんど検出されなかったが、Sox9 及び Col2a1 の遺伝子発現は認められた。椎間板の構造が形成される E14.5 以降の発生過程では、Pax1 は外線維輪において高いレベルで発現していた。外線維輪では、Pax1 及び Col1a1 が発現すると共に、Sox9 及び Col2a1 の遺伝子発現も軟骨組織と同等の高いレベルで維持されていたが、Acan の発現レベルは軟骨組織と比較して著しく低下していた。

成体マウスの椎間板における Pax1 の発現は、免疫染色では検出することができなかった。一方で RT-PCR 法では、椎間板線維輪において Sox9 と共に Pax1 の遺伝子発現が検出されている。成体組織では胎生期と比較して椎間板における Pax1 の発現レベルが低下していることが示唆されるが、細胞外基質の蓄積により免疫染色における抗体の反応条件が変化している可能性もあり、抗原の賦活化に関して更なる条件検討が必要と考えられる。

(2) Pax1 の過剰発現による脊柱の骨格形成異常

E12.5 から 16.5 の Col2a1-Pax1 Tg のマウス胚を詳細に解析した。その結果、Pax1 を過剰発現した軟骨組織では、アルシアンブルー染色性が著しく低下していた。E14.5 以降では、椎骨の軟骨性組織と椎骨間の非軟骨性組織の繰り返し構造の形成が異常となり、髄核を中心とする椎間板の形成は欠如していた。また、Pax1 を過剰発現した軟骨組織では、Sox9 及び Col2a1 の遺伝子発現はコントロールと同等のレベルで検出されたものの、Acan の発現は著しく低下していた。E16.5 の正常マウス胚では内軟骨性骨化による石灰化が検出されたが、Col2a1-Pax1 Tg のマウス胚では膜性骨化以外の石灰化は認められず、軟骨細胞の成熟に伴って発現する Indian hedgehog や type X collagen の発現も欠如していた。

(3) 椎間板線維輪細胞の分離培養法の確立

マウス及びラットを使用して、尾椎の椎間板の線維輪細胞を分離培養する方法を検討した。その結果、ラットの尾椎から採取した椎間板を用いて、以下の方法により安定的に線維輪細胞を分離して培養を維持する手法を確立した：3 週齢の Wistar Rat の尾から、クリーンベンチ内で椎間板を採取し、ミンズ及び酵素消化後、I 型コラーゲンでコーティ

ングした組織培養ディッシュに椎間板組織を接着させ、outgrowth 法で培養することにより椎間板線維輪細胞を得た。Outgrowth 法による培養には MF-start 初代細胞スターティング培地 (TOYOBO) を使用し、継代後は 10% FBS-DMEM で維持した。

得られた椎間板線維輪細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により、Pax1、Pax9、Col1a2、Scx、Nkx3.2、Col2a1、Acan、Sox5、Sox6、及び Sox9 等の遺伝子の発現を確認した。

(4) Pax1 のノックダウンによる軟骨細胞分化の促進

椎間板線維輪は線維軟骨性の組織であり、その細胞は pellet culture による軟骨分化誘導にตอบสนองして軟骨様細胞へと分化することが知られている。ラット椎間板線維輪細胞における Pax1 の役割を検討するため、Pax1 をノックダウンし、軟骨分化誘導に対する応答性と遺伝子発現の変化を解析した。2 種類の標的配列を用いてノックダウンを検討した結果、両配列共に、Pax1 の遺伝子発現レベルが 75% 以上抑制されることが確認された。20 日間の pellet culture により軟骨分化誘導を行った細胞から凍結切片を作製し、アルシアンブルー染色を行った結果、Pax1 をノックダウンした pellet では、コントロールと比較してアルシアンブルー染色性が顕著に上昇していた。また、遺伝子発現レベルを解析した結果、Pax1 をノックダウンした細胞では、Acan の発現レベルが有意に上昇していた。Pax1 のノックダウンによる Sox9 の発現レベルの上昇は認められなかったことから、Pax1 が Acan の発現制御に直接的に関わっていることが示唆された。

(5) Acan エンハンサーにおける Pax1 の結合活性

Acan エンハンサーにおける Pax1 の結合を確認するため、Pax1 を発現している椎間板線維輪細胞を用いて、クロマチン免疫沈降解析を行った。過去に報告されている Acan (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 法により解析した結果、椎間板線維輪細胞では Acan のエンハンサーに 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。

(6) Acan エンハンサーにおける Pax1 の結合部位の同定

Acan のエンハンサーにおける Pax1 の結合部位を同定するため、まず、359 bp の DNA 配

列を分割して Pax1 蛋白質との結合活性をゲルシフトアッセイにより解析した。その結果、*Acan* エンハンサー中の 55 bp の DNA 配列に Pax1 が結合することが判明した。更に、55 bp の DNA 配列に変異を導入した 14 種類の変異型オリゴ DNA を用いて解析した結果、*Acan* エンハンサーの 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。また、Pax1 と高いホモロジーを有する転写因子 Pax9 も、Pax1 が結合する *Acan* エンハンサーの領域に結合することが確認された。

本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、*Acan* エンハンサーにおける 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。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 滝本晶, 開祐司, 宿南知佐: 椎間板形成における Pax1 の役割. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 2014 年 7 月 26 日. 大阪国際会議場 (大阪)

(2) 滝本晶, 開祐司, 宿南知佐: Pax1 と Sox9 による軟骨細胞の分化制御と脊柱の組織構築. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年 7 月 23 日. 京王プラザホテル (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

京都大学再生医科学研究所ホームページ
<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝本 晶 (TAKIMOTO, Aki)

京都大学・健康長寿社会の総合医療開発ユニット・特定助教

研究者番号: 00378902

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし