

論文審査の結果の要旨

Combinatorial CRISPR/Cas9 Approach to Elucidate a Far-Upstream Enhancer Complex for Tissue-Specific Sox9 Expression

CRISPR/Cas9 を用いた軟骨発生に必須の転写因子 Sox9 の組織特異的エンハンサーを含んだ転写複合体の解明

日本医科大学大学院医学研究科 整形外科学分野
大学院生 田畑祐輔
(旧姓：望月祐輔)

Developmental Cell (2018, 46: 794-806)掲載

軟骨細胞の発生に必須の役割を持つ転写因子 SOX9 (SRY-box9)もしくはその周辺の突然変異により先天性骨軟骨形成異常症を引き起こすことが知られており、患者の遺伝子解析から SOX9 上流約 2Mb 内の遺伝子間領域においていくつかのエンハンサー領域が報告されている。しかしながら体系的にエンハンサー領域を同定する手法に関しては困難な点が多く、現在でも完全には解明されていない。そこで、本研究の目的は未知の軟骨特異的エンハンサー領域や SOX9 を制御する転写因子を同定することで軟骨における SOX9 の転写制御システムを解明することであった。

近年報告された遺伝子改変を可能とする CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) /Cas system を用いて、Sox9 のプロモーター領域近傍に設計した guide RNA (gRNA) と deactivated Cas9 (dCas9) をマウスの初代肋軟骨細胞に対し遺伝子導入後、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を施行した。その結果、Sox9 上流約 1Mb の領域 (RCSE) に強いピークを認めることを突き止めた。

この RCSE 領域を評価するため、転写抑制複合体である SIN3A を含んだ dCas9 を RCSE 領域に結合させたところ、肋軟骨細胞において Sox9 の発現が有意に低下し、C3H10T1/2 細胞を用いた軟骨分化では、Sox9 発現が低下し軟骨分化が抑制された。そして RCSE と Sox9 プロモーターを発現させた LacZ-トランスジェニックマウスを作成・解析した結果、肋軟骨特異的な染色パターンを認めた。さらには RCSE 領域を欠失させたノックアウトマウスでは肋軟骨を含んだ胸郭のみの低形成・狭小化を認めた他、ノックアウトマウスの肋軟骨のみで増殖軟骨細胞層の減少、肥大軟骨細胞層の増大を認め、今回の RCSE 領域が肋軟骨特異的エンハンサーであることが強く示唆された。

最後にこの RCSE 領域近傍に gRNA を設計し、同様の手法で dCas9 を結合させ ChIP-MS を施行した結果、Sox9 自体の発現を制御する転写因子として Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) を同定し得た。ルシフェラーゼアッセイでは Sox9 プロモーターと RCSE 領域の存在下で Stat3 を導入すると活性が上昇した。さらには Stat3 抗体を用いた ChIP では Sox9 プロモーター、RCSE 共に有意なピークを認め、免疫染色では核の濃染を確認し得た。そして C3H10T1/2 細胞を用いた軟骨分化で shRNA を用い Stat3 を抑制した結果、分化に伴い Sox9 の発現が低下し、

軟骨細胞分化が抑制された。最後に Stat3 のコンディショナルノックアウトマウスを作成し解析したところ、全身の骨格低形成、また明らかな骨化の遅延を認め、Stat3 が RCSE 領域を介して Sox9 の発現を制御していることを突き止めた。

今後、この結果が先天性骨軟骨形成異常症の診断につながり、さらには関節軟骨で同様の手法を用いることで関節軟骨特異的エンハンサー領域を同定し変形性関節症の診断、治療へとつながる可能性がある。

第二次審査では、エンハンサーが部位特異的であることの生物学的意義について質問がなされた。これに対し、巨大な遺伝子間領域には無数のエンハンサーが存在しており、全体の軟骨を規定するエンハンサーの他に各部位のみの特異的エンハンサーが存在することで、エンハンサー同士が補いサポート出来るような生体メカニズムになっているのではないかとの回答がなされた。本研究は先天性骨軟骨形成異常症の診断ばかりでなく変形性関節症の診断、治療へとつながる可能性があることを初めて報告したものであり、学位論文として価値あるものと認定した。