

平成21年5月8日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592145

研究課題名（和文）

BACトランスジェニックマウスを用いた内軟骨性骨形成特異的遺伝子の解析

研究課題名（英文）

Analysis of the role of cartilage-specific gene in endochondral bone formation using BAC (bacterial artificial chromosome)-transgenic mice

研究代表者

服部 高子 (HATTORI TAKAKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00228488

研究成果の概要：

全長10型コラーゲン遺伝子を含む bacterial artificial chromosome (BAC) DNA の10型コラーゲンプロモーター領域下流に Sox9 cDNA を挿入し、Sox9 を肥大化軟骨層に異所性に過剰発現する BAC トランスジェニックマウスを作製し、① 骨髄の消失、肥大化軟骨層への血管侵入の遅延、肥大化軟骨細胞層の延長に起因する骨の短縮、②延長した肥大化軟骨細胞層での Sox9 の強い発現に加え、肥大化軟骨マーカー遺伝子の発現の低下、③Sox9 は直接的に *vegf* プロモーター活性を低下させる事、を明らかにし、これらの事から Sox9 の肥大軟骨細胞層における消失は、血管の侵入、骨髄の形成を可能にし、正常な内軟骨性骨形成に必須である事を *in vivo* および *in vitro* で明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：口腔生化学、分子歯科学、分子生物学、発生生物学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：Sox9, Bacterial artificial chromosome (BAC) DNA, トランスジェニックマウス、X型コラーゲンプロモーター、肥大化軟骨細胞層、VEGF, 血管侵入, 内軟骨性骨形成

1. 研究開始当初の背景

内軟骨性骨形成における軟骨から骨への移行過程は、長管骨、肋骨、脊椎での骨伸長においてのみ見られるのではなく、骨折時においても治癒過程、骨棘形成過程などでも観察され、高度に複雑な機構で制御されている。

軟骨再生から骨への速やかな移行による骨折治癒、また、変形性関節症や関節リウマチなど様々な理由で失われた軟骨の再生など、組織再生工学の観点からもその過程の全容解明は切望され続けているが、未だその過程で

次々と発現が変遷していく遺伝子の、内軟骨性骨形成における役割も未だ未解明な部分が多い。

内軟骨性骨形成は、軟骨細胞の観点から見ると、細胞の成長→成熟→肥大化→石灰化→アポトーシスと肥大化軟骨の吸収→骨系細胞の侵入といった連続した現象の流れによって起こる。これらそれぞれの現象は、さまざまなシグナル伝達によって制御されており、転写制御因子による成長因子、ホルモン、細胞内外基質の発現制御が誘導されている。これらの過程に内包されている特異的な遺伝子の機能を解明するために、代表者らのグループは肥大化軟骨層特異的なType X collagen (Col10a1) の全長遺伝子を含むBAC (Bacterial Artificial Chromosome) DNAを用いた相同組換えシステムにより β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (LacZ) をCol10a1 promoterの制御下で発現するトランスジェニックマウスを作製する技術を世界に先駆けて確立し、報告した。この方法では、導入遺伝子の染色体上の挿入部位によるサイレンシングの影響など、導入環境の影響を考慮する必要が無く、外来遺伝子の強力な発現が期待できた。

2. 研究の目的

本研究は、全体構想としては、このBAC-Col10a1-組換えシステムを用いて軟骨特異的に発現している遺伝子を肥大化軟骨細胞で強制発現したマウスを作製し、その過剰発現による影響から、内軟骨性骨形成に及ぼす役割を知る事を目的とする。このうち、申請期間の2年で、内軟骨性骨形成の決定遺伝子であり、前肥大化軟骨細胞でその発現が極大に達した後、肥大化軟骨細胞層で消失するSox9をCol10a1プロモーター制御下で過剰に発現させたトランスジェニックマウスを作製し、その表現系を解析する事から、Sox9の内軟骨性骨形成、特に軟骨から骨への移行過程における役割を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

①BACトランスジェニックマウスの作製
BAC DNAへの相同組換えのために約100bpの相同領域をSox9 cDNAの両端に接続したpLacH-Col10-Sox9-hGHPolyA-FRTneoFRT vectorを作製した。次に大腸菌内相同組換えによってBAC RPCI23-192-A7 DNAへCol10-Sox9-hGHPolyA-FRTneoFRT断片を挿入した。この組換えBAC/Col10a1-Sox9-hGHPolyA-FRTneoFRT DNAをマウス胚へ遺伝子導入のため大量調製し、マウス胚へ導入を行った。

②作製したトランスジェニックマウスの表現型解析

表現型の解析のために、骨格標品を作製し、また組織学的解析を行った。さらに成長板軟骨組織を分取し、初代培養細胞からRNAを回収し、定量的解析を行った。

③Sox9のvegfプロモーター活性におよぼす影響を調べるために、vegfプロモーターを用いたレポータージーンアッセイ、DNA結合実験、siRNAを用いたノックダウン実験を行った。

④骨化組織の解析を行うためにマイクロCT解析を行った。

4. 研究成果

①BACトランスジェニックマウスの作製

肥大化軟骨細胞層におけるSox9の異所性の過剰発現のために、まず約100 bpのX型コラーゲン相同組換え領域をSox9 cDNA-frt-neo-frtの両端に接続したターゲティングベクター (pLacH-Col10-Sox9-hGHPolyA-FRTneoFRT) を構築した。次に、大腸菌内相同組換えによって10型コラーゲン遺伝子全長を含むBAC RPCI23-192-A7にCol10-Sox9-hGHPolyA-FRTneoFRT断片 (図1A) を挿入し、マウス胚に注入した。外来遺伝子の有無はPCRによって確認した (図1B)。得られたトランスジェニックマウスの生後2日の四肢では、著しい骨髄形成の遅延が観察され (図1C)，また、生後21日齢の長管骨長は約21%短縮していた (図1D, E)。

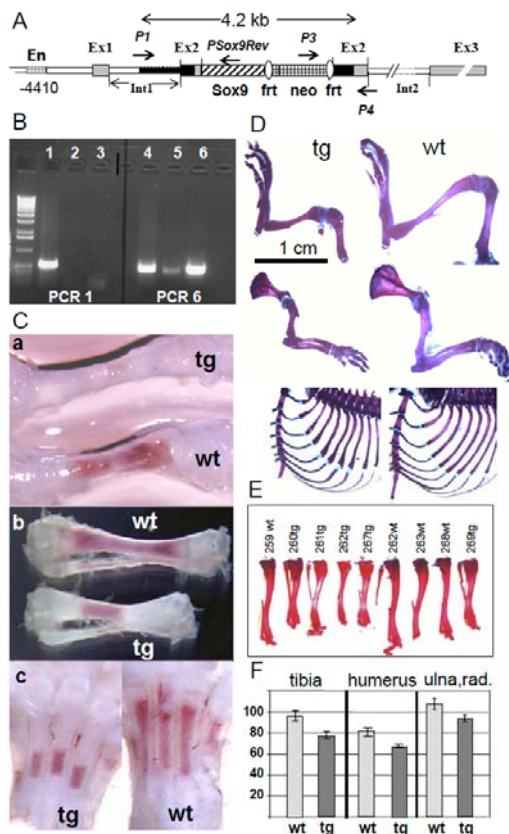


図1 BAC-Col10-Sox9 トランスジェニックマウスにおける骨髄形成の遅延と骨成長抑制

② Sox9の肥大化軟骨細胞層における過剰発現は肥大化軟骨細胞層を延長し、血管侵入を著しく抑制する

長管骨のアルシアンブルーを用いた軟骨基質の染色結果から、トランスジェニックマウスでは胎生15.5日齢から骨髄形成の遅延が観察され(図2Aa, b), 生後1および8日齢では顕著な肥大化軟骨細胞層の延長と骨髄形成の遅延も観察される(図2Ac, dおよびe, f)。生後18日齢の長管骨では、野生型およびトランスジェニックマウスとも2次骨化中心が形成されるが、その形成速度はトランスジェニックマウスの方が野生型よりも遅かった(図2Ag, h)。

血管侵入の有無を調べるため、血管内皮細胞のマーカーであるCD31/PECAMを染色した結果、15.5日齢の野生型に見られる肥大化軟骨細胞層への血管侵入がトランスジェニックマウスでは見られない(図2B) ことから、肥大

化軟骨細胞層におけるSox9の過剰発現は骨髄形成の抑制、肥大化軟骨細胞層の延長、血管侵入の抑制を誘導することが明らかとなった。

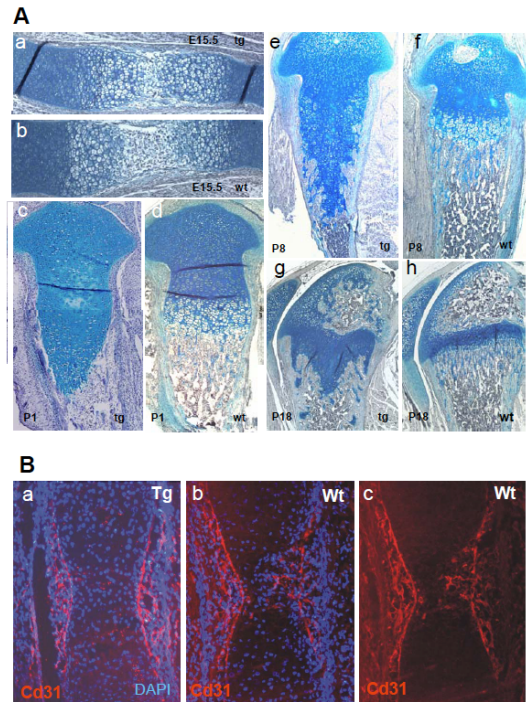


図2 A 異なる発生段階のBAC-Col10-Sox9 トランスジェニックマウスにおけるアルシアンブルー染色像。B 胎生15.5日齢におけるCD31染色像。

③ BAC-Col1X-Sox9 トランスジェニックマウスにおける軟骨-骨マーカー遺伝子の発現変動

BAC-Col1X-Sox9 トランスジェニックマウスにおける形態変化に伴った遺伝子発現の変動を調べるために、骨および軟骨のマーカー遺伝子の発現変動を in situ hybridizationによって確認した。その結果、

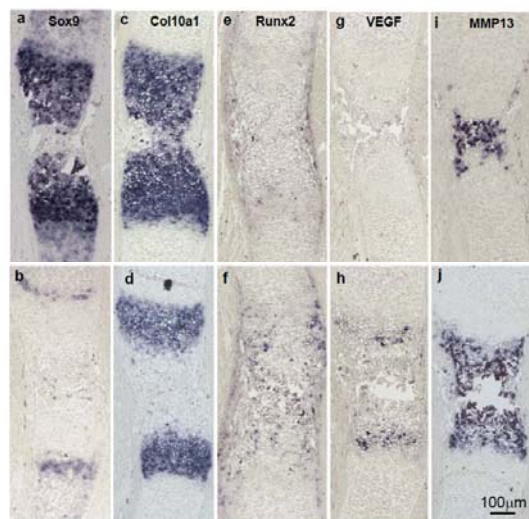


図3 胎生15.5日齢のBAC-Col10-Sox9 トランスジェニックマウス長管骨における骨-軟骨マーカー遺伝子の発現

トランスジェニックマウスにおいて延長した肥大化軟骨細胞層近片におけるrunx2, vegf, mmp13, mmp9の発現抑制が観察された(図3、4)。

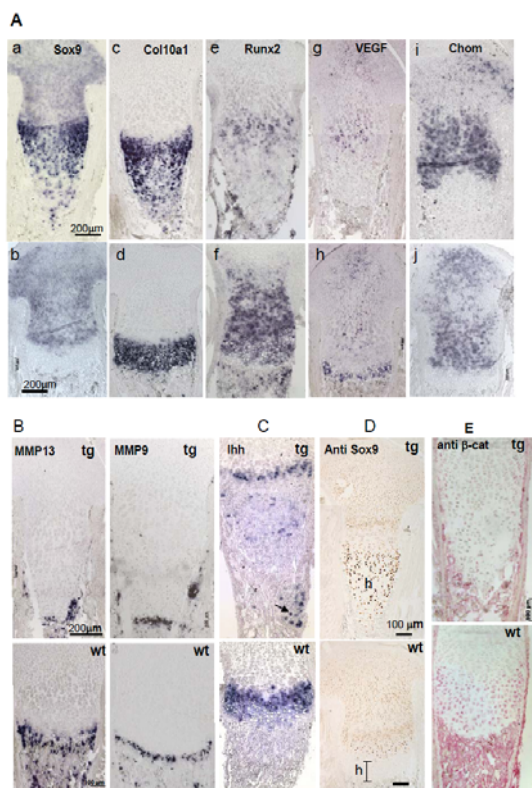


図4 生後1日齢のBAC-Col10-Sox9トランスジェニックマウス長骨における骨-軟骨マーカー遺伝子の発現

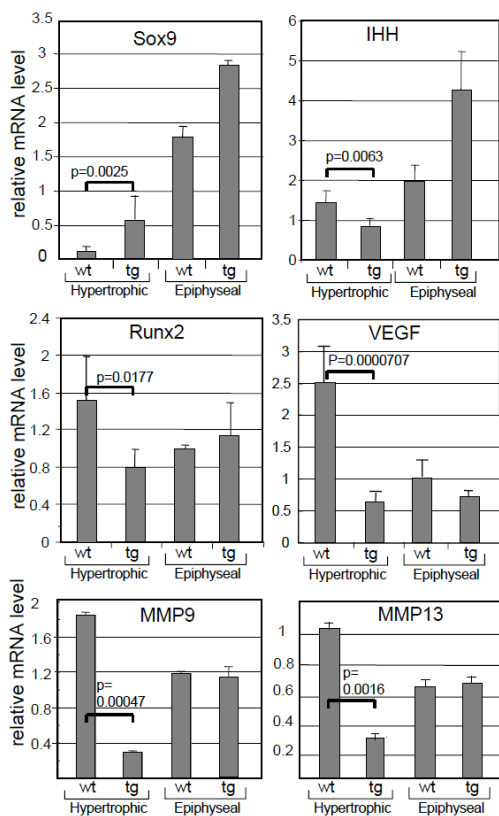


図5 成長版軟骨細胞より分取したRNAのreal-time PCRによる骨-軟骨マーカー遺伝子発現の解析

in situ hybridizationで得られた遺伝子発現の変化を確認するため、BAC-Col1X-Sox9トランスジェニックマウスの成長板軟骨より肥大軟骨領域、静止軟骨細胞層を含む骨端軟骨細胞領域を分取し、抽出したtotal RNAを用いてreal time-PCRにより遺伝子発現の変化を調べた。その結果、トランスジェニックマウス肥大化軟骨細胞層におけるSox9の過剰発現とともにIHH, Runx2, vegf, MMP9, MMP13の発現抑制が観察された(図5)。

④Sox9のvegfプロモーター活性におよぼす影響

これまで、vegf mRNAの発現調節に関わる因子として、Runx2の関与が報告されており、今回我々が作製したBAC-Col1X-Sox9トランスジェニックマウスの延長した肥大化軟骨細胞層でもrunx2 mRNAの発現が抑制されていることを確認したが、Sox9によるvegfの直接的な制御が軟骨への血管侵入を制御し、軟骨最終分化を決定している可能性を証明するために、vegfプロモーター領域の解析を行った。データベースからのcis-エレメント解析の結果、vegf mRNA転写開始点近傍に2カ所のSRY-family因子結合領域が存在していた。SRY領域を含むレポータージーンアッセイから、Sox9の共発現によりvegfプロモーター活性が低下すること、ゲルシフトアッセイから、SRY領域にSox9が結合すること、Sox9 siRNAによる軟骨細胞でのSox9の発現低下は、vegf mRNAレベルを上昇させること、また、軟骨細胞においてSox9はvegfプロモーター領域にin vivoで結合していることがクロマチン免疫沈降により明らかとなった。これらの結果から、Sox9はvegfプロモーター領域に結合することにより、vegf mRNA発現を直接に抑制しているこ

とが明らかとなった (図6)。

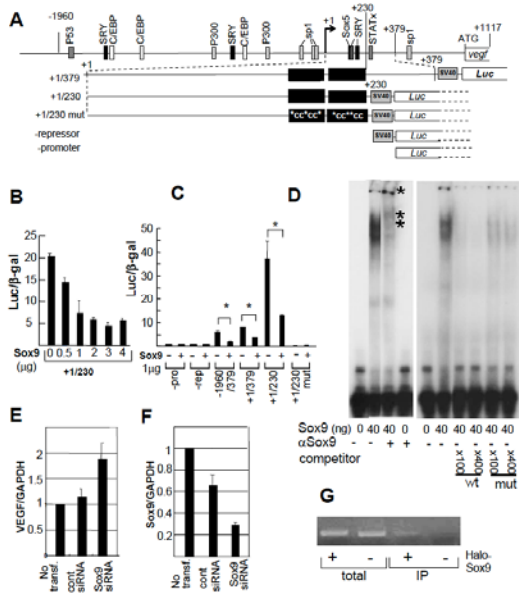


図6 Sox9による vegf プロモーター活性の直接制御

⑤ マイクロCTによる解析

トランスジェニックマウス長管骨の組

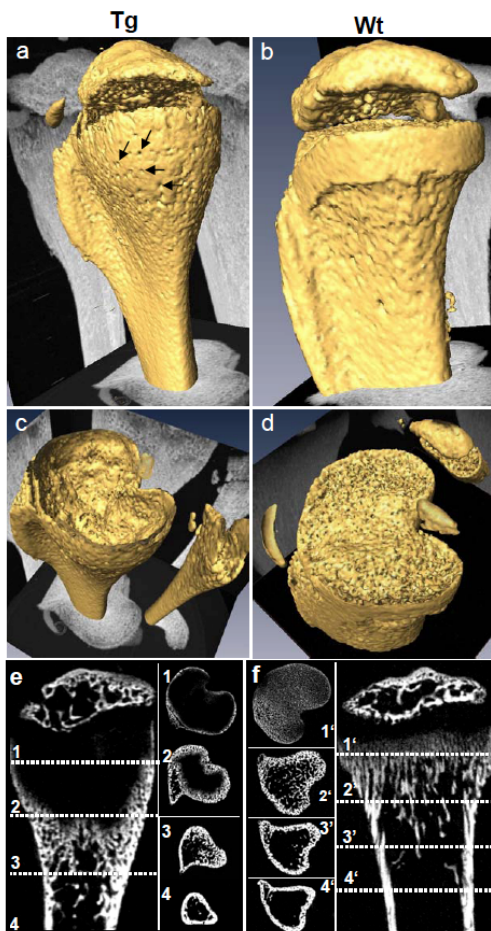


図7 BAC-Col10-Sox9 トランスジェニックマウス長管骨のマイクロCT画像

織学的解析の結果、骨髄の形成は著しく遅延している一方、骨膜由来の皮質骨形成は正常であった。さらには、正常時には海面骨側から生じる肥大化軟骨細胞の吸収は、トランスジェニックマウスではむしろ皮質骨側から生じている事が観察された (図2A,B)。生体トランスジェニックマウス骨のマイクロCT解析の結果、トランスジェニックマウス長管骨の成長板軟骨周囲付近の皮質骨に血管侵入口と思われる小腔が多数観察された。また、水平断から海面骨の著しい欠如と骨塩量の低下が観察された (図7)。

本研究では我々はBAC-Col10a1-Sox9トランスジェニックマウスを作製し、以下の点を明らかにした。

① 出生直後からトランスジェニックマウスでは骨の短縮が見られ、組織形態学的観察からはほぼ完全な骨髄の消失、肥大化軟骨層への血管侵入の遅延、肥大化軟骨細胞層の延長がみられた。

② Sox9 mRNA の全肥大化軟骨細胞層および延長した肥大化軟骨細胞層での強い発現が観察され、同じ部位での vegf, mmp13 mRNA の発現は著しく低下していた。これらの結果は肥大軟骨細胞層から単離した初代培養細胞の mRNA を用いた real-time PCR でも確かめられた。

③ vegf プロモーター解析の結果、転写開始点近傍に存在する2つのSRY boxにSox9が結合し vegf プロモーター活性を低下させる事、また、細胞内でSox9は vegf のプロモーター領域に結合している事、Sox9の発現量を siRNA で特異的に低下させると vegf mRNA は増加した事から、Sox9は直接的に vegf mRNA の発現を調節した。

これらの事から Sox9 の肥大軟骨細胞層における消失は、血管の侵入、骨髄の形成を可能にし、正常な内軟骨性骨形成に必須

である事を *in vivo* および *in vitro* で明らかにした。

本研究は、内軟骨性骨形成の軟骨最終分化段階を決定する因子が Sox9 の消失であることを始めて示すもので、骨の発生機構を明らかにしただけでなく、BAC DNA を用いたトランスジェニックマウスの手法は、これまで目的遺伝子の発現に使われるマーカー遺伝子プロモーターの特性から、*in vivo* での十分な組織特異性や発現量が得られず、解析の困難であった遺伝子の *in vivo* での機能解析を可能にする強力なツールとなると期待される。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計5件)

1. Aoyama E, Hattori T, 他5名. N-terminal domains of CCN protein 2/connective tissue growth factor bind to aggrecan. *Biochem J.* 2009, in press. 査読あり.
2. Fujisawa T., Hattori T., 他5名. CCN family 2 / Connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) stimulates proliferation and differentiation of auricular chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, 787-795, 2008. 査読あり.
3. Gebhard S., Hattori T., 他5名. Specific expression of Cre recombinase in hypertrophic cartilage under the control of a BAC-Coll10a1 promoter. *Matrix Biol.* 2008, 27(8):693-699. 査読あり.
4. Hattori T., 他6名. Transcriptional regulation of chondrogenesis by coactivator Tip60 via chromatin association with Sox9 and Sox5. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36: 3011-3024. 査読あり
5. Gebhard S., Hattori T., 他6名. BAC constructs in transgenic reporter mouse lines control efficient and specific LacZ

expression in hypertrophic chondrocytes under the complete Coll10a1 promoter. *Histochem. Cell Biol.* 127(2),183-94. 2007. 査読あり.

〔学会発表〕(計 1件)

1. T. Hattori, 他6名. CCN2/CTGF is transactivated through its enhancer element by Sox9 in fibroblasts: possible roles in fibrosis, 5TH INTERNATIONAL WORKSHOP ON THE FAMILY OF GENES, Toronto, Canada, October 18-21, 2008.

〔図書〕(計1件)

1. 服部高子、久保田聡、滝川正春：結合組織成長因子 CTGF/CCN2 (Connective tissue growth factor (CTGF)/CCN2), *The Lung perspectives*, メディカルレビュー社、大阪、2007、15(3)、331-335.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 高子 (HATTORI TAKAKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：00228488

(2) 研究分担者

滝川 正春 (TAKIGAWA MASAHARU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：20112063

久保田 聡 (KUBOTA SATOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90211936

西田 崇 (NISHIDA TAKASHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30322233

青山 絵理子 (AOYAMA ERIKO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：10432650

(3) 連携研究者

該当者無し