

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07245

研究課題名(和文) 遺伝子改変両生類を用いた新たな骨リモデリング機序の解析方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new method for analyzing bone remodeling mechanisms using genetically modified amphibians

研究代表者

雪田 聡 (Yukita, Akira)

静岡大学・教育学部・准教授

研究者番号：80401214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、哺乳類で骨代謝に重要な遺伝子であるOsteoprotegerin(Opg)を欠損したネッタイツメガエルおよびイペリアトゲイモリを世界で初めて作出し、骨組織への影響を検討した。組織学的な検討により、両種ともにOpg欠損個体の大腿骨において破骨細胞数の増加が観察された。さらに、イペリアトゲイモリでは、 $\mu$ CT撮影により骨量の減少も認められた。このことから、Opg遺伝子破骨細胞分化抑制能は両生類においても保存されていることが示唆され、骨代謝機能の進化的な変遷に重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、哺乳類で破骨細胞分化を抑制しているOsteoprotegerin(Opg)の両生類での役割を明らかにするため、Opg遺伝子が破壊されたネッタイツメガエルとイペリアトゲイモリを作成し、哺乳類と同様に骨が減少する結果を得ました。両生類は哺乳類と比べて、骨の作り変え(骨代謝)が活発ではなく、原始的な骨であると考えています。本研究の結果から、その原始的な両生類の骨においても、Opgが我々の骨と同じような役割を担っていることが明らかになり、骨代謝の基本的な仕組みは、脊椎動物で広く保存されていることが分かりました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated *Xenopus tropicalis* and the *Pleurodeles waltl* deficient in Osteoprotegerin (Opg), a gene important for bone metabolism in mammals, and examined its effects on bone tissue. Histological examination revealed an increase in the number of osteoclasts in the femur of Opg-deficient individuals of both species. In addition,  $\mu$ CT imaging showed a decrease in bone mass in *Pleurodeles waltl*. This suggests that the osteoclast differentiation inhibitory activity of the Opg gene is conserved between amphibians and mammals, providing important insights into the evolutionary evolution of bone metabolism.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨代謝 Osteoprotegerin 両生類 CRISPR/Cas9

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、脊椎動物間の骨組織や骨形成機構の類似点と相違点に着目して観察し、有尾両生類と無尾両生類とで長管骨における破骨細胞の有無が異なる可能性を見出し、両生類が有用なモデル動物となることを示唆していたが、遺伝子改変技術等の限界から、哺乳類で明らかになった骨代謝機構の分子機序が両生類でどこまで保存されているかはほとんど研究されていなかった。研究開始当初、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集がイベリアトゲイモリやネットイツメガエルでも確立されはじめ、哺乳類で骨代謝に中心的な役割を担う遺伝子を欠損した有尾類と無尾類を作成し、骨組織に対する影響を哺乳類と比較することが可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究は骨代謝の制御機構の起源を解明することを目的としている。既知の骨代謝研究のほとんどは哺乳類が用いられている一方で、研究代表者らは、残された問題を解決するためには、他の脊椎動物の骨組織形成についてもその分子機序を明らかにして、哺乳類との比較研究を行うことが必須であると考えた。その比較対象として、両生類には極めて有利な特性がある。特性の1つが四肢の長管骨形成過程の相違である。哺乳類と両生類とで長管骨形成過程を比較すると、哺乳類では、軟骨原基の吸収と海綿骨の形成が観察され、さらに、形成された海綿骨の吸収が近接した場所で活発に行われ、数多くの骨芽細胞と破骨細胞が観察される一方で、両生類では、軟骨原基の吸収は認められるが海綿骨の発達は悪く、関与する骨芽細胞および破骨細胞の数も非常に少ない。これは、哺乳類の骨代謝が複雑に制御され、骨がミネラルの貯蔵庫として働いている一方で、両生類の骨代謝はシンプルであり体内のミネラル維持に骨が哺乳類程には重要な役割を担っていないことを示唆していると考えられる。すなわち、両生類の長管骨形成過程は、骨代謝の分子機構の起源を明らかにする上で最良のモデルである。そこで、本研究課題では、無尾両生類の代表としてネットイツメガエルを、有尾両生類のモデルとしてイベリアトゲイモリを選び、哺乳類において骨代謝制御の中心的な役割を担う RANK/RANKL/OPG シグナルが両生類の長管骨形成に与える影響を明らかにすることとした。

### 3. 研究の方法

本研究課題はネットイツメガエルとイベリアトゲイモリをモデル生物として用い、CRISPR/Cas9により *Rank*(*Tnfrsf11a*), *Rankl*(*Tnfsf11*), *Opg*(*Tnfrsf11b*)の3遺伝子を欠損した個体を作成して四肢の長管骨を組織学的および分子生物学的な手法を用いて野生型個体と比較することを計画した。

#### (1) 遺伝子欠損ネットイツメガエルとイベリアトゲイモリの作出

骨リモデリングに中心的な役割を果たす *Rank*, *Rankl*, *Opg* 遺伝子の機能を破壊した個体を作成するため、Cas9 タンパク質と各遺伝子を特異的に認識する gRNA を受精卵に顕微注入した。顕微注入した胚 (以下、クリスパント) を表現型に異常が生じないか観察しつつ飼育した。

#### (2) アンプリコンシーケンスおよび PCR 法によるジェノタイピング

全胚または変態後の個体の一部を採取してゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンス解析を行い、クリスパントの遺伝子変異率を求めた。イベリアトゲイモリにおいてはさらに性成熟したクリスパント同士を掛け合わせて作出した F1, F2 世代については PCR 法によりジェノタイピングを行って遺伝子変異が認められた個体を選出した。

#### (3) 骨組織評価

得られた変異個体について、以下の方法により遺伝破壊が骨組織に与える影響を検討した。

- 3-1. 薄切切片を作製し、ヘマトキシリンエオシン染色により骨構造を細胞レベルで観察した。
- 3-2. 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) およびアルカリホスファターゼ (ALP) の活性を指標に破骨細胞の数および局在を明らかにした。
- 3-3. マイクロ CT により骨構造を三次元的に解析した。

#### (4) 骨組織における遺伝子発現検討

得られた変異個体および野生型個体から骨組織を採取して mRNA を抽出し、骨芽細胞マーカーおよび骨形成マーカー (*Runx2*, *Osterix*, *Osteocalcin*)、破骨細胞マーカーおよび骨吸収マーカー (*Nfatc1*, *Cathepsin K*, *Mmp9*) の遺伝子発現を半定量的逆転写 (RT) -PCR によって検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 遺伝子欠損ネットイツメガエルとイベリアトゲイモリの作出

##### a. 遺伝子欠損ネットイツメガエルの作成

*Rank*, *Rankl*, *Opg* 遺伝子を標的とする gRNA を作製してネットイツメガエル受精卵に顕微注入した結果、*Rank*, *Rankl* については生存率が低く、四肢の長管骨が形成される変態期まで生存する個体は得られなかった。死んだ個体は一定の表現型を示さず、初期形態形成の異常や衰弱などによるものであり、*Rank*, *Rankl* 遺伝子欠損による特定の影響によって生存率が低かったのではな

いと判断した。また、アンプリコンシーケンスによるジェノタイピングを行っていないため、変異率は不明ではあるものの、PCRによるジェノタイピングの結果から、ゲノム編集はできていることが示唆されている。一方で、*Opg* 欠損個体については、PCRによるジェノタイピングの結果からゲノム編集が行われていると期待できるクリスパントが幼弱なカエルにまで生存した。アンプリコンシーケンスの結果から、最大で60%程度の細胞で変異が起こっていると推測できる個体が得られた。さらに変異効率を上げるため、*Opg* 遺伝子を標的とする2種類のgRNAを同時に顕微注入したクリスパントを作製し、PCRによるジェノタイピングを行った。その結果、2種類のgRNAによって*Opg* 遺伝子の2か所が同時に切断されたことを示すバンドが観察された(図1)。アンプリコンシーケンスによるジェノタイピングは未実施であるが、この個体の一部の細胞は*Opg* 遺伝子が広範囲(約300bp)に渡って欠損していることが期待できたため、四肢の骨を採取して組織学的および分子生物学的な検討を加えることとした。なお、このクリスパントは現在までに10匹以上得られている。

#### b. 遺伝子欠損イベリアトゲイモリの作製

ネッタイツメガエルで欠損個体の作出が期待できた*Opg* 遺伝子に絞って欠損個体を作出した。ネッタイツメガエルと同様に、1か所の変異では期待された変異率を示す個体を得られなかったため、2種類のgRNAを同時に顕微注入し、*Opg* 遺伝子の2か所で切断が生じていることを示す個体を得られた(図2)。このクリスパントは20匹以上得られ、一部は成熟個体まで生存し、次世代を得ることができた。この個体をF1世代とし、さらにF1世代同士を掛け合わせたF2世代まで現在得られている。

#### (2) *Opg* 欠損個体の表現型

##### a. *Opg* 欠損ネッタイツメガエル

*Opg* 欠損個体は初期発生から変態完了まで観察した結果、外見上は明確な形態異常は示さなかった。幼弱な子ガエルの大腿骨を採取し、固定脱灰後パラフィン包埋して厚さおよそ6μmに薄切しHE染色およびTRAP染色を行った。TRAP活性は陰性であったが、多核で大型の破骨細胞と思われる細胞が、*Opg* 欠損個体の大腿骨で明確に発達していることが明らかになった(図3)。ネッタイツメガエルの破骨細胞は、当研究室においてはALP染色によって安定して染色される。野生型の大腿骨においてALP染色陽性の細胞は小型で細長い細胞であり、*Opg* 欠損個体では球形で大型であった。また、陽性細胞の数は現在までのところ有意な差は認められなかった。このことから、ネッタイツメガエルにおいては、*Opg* は破骨細胞の分化よりもむしろ成熟に関与している可能性が考えられた。

欠損個体は大きな外見異常を示さなかったが、大変興味深いことに、受精後2週間、体長1cm程度のオタマジャクシにおいて欠損個体においてのみ四肢の形成が観察された(図4)。その後の変態は早まることはなく、野生型とほぼ同時期に変態を完了した。なお、この表現型はイベリアトゲイモリでは現在までのところ認められず、無尾目またはネッタイツメガエルに特有の機能である可能性も考えられるが、今後、さらに研究を進めることにより、Rank/Rank1/*Opg* シグナルの肢芽形成への関与が新たに明らかになるかもしれない。

b. *Opg* 欠損イベリアトゲイモリ  
*Opg* 欠損イベリアトゲイモリは野生型と外見上明確な異常を示さず、変態期においてネッタイツメガエルで見られたような四肢の早期形成も観察されなかった。生後6か月が経過した成熟個体の大腿骨をネッタイツメガエルと同様にパラフィ

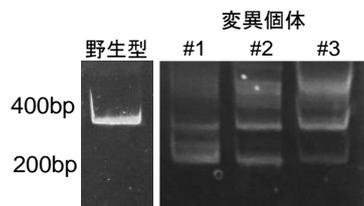


図1 ネッタイツメガエルのPCRジェノタイピング結果

200bp付近のバンドは2か所の切断で切り出されたために短くなったPCR産物(野生型では390bp)。CRISPR/Cas9による切断はランダムのため、#1から#3で断片長が異なる。

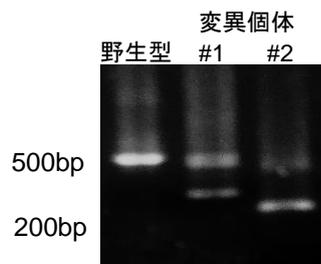


図2 イベリアトゲイモリのPCRジェノタイピング結果

200bp付近のバンドは2か所の切断で切り出されたために短くなったPCR産物。CRISPR/Cas9による切断はランダムのため、#1と#2とで断片長が異なる。

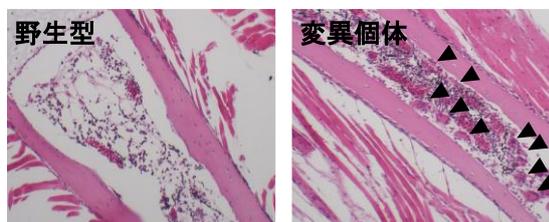


図3 *Opg* 欠損ネッタイツメガエルの骨組織像  
幼弱なカエル(生後3か月)の大腿骨組織像(エオシン-ヘマトキシリン染色)。矢頭は多核で巨大な発達した破骨細胞。

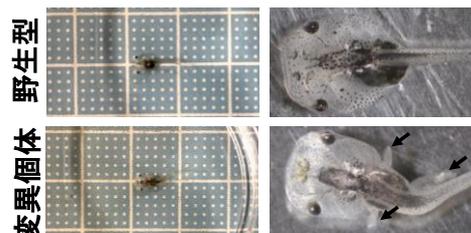
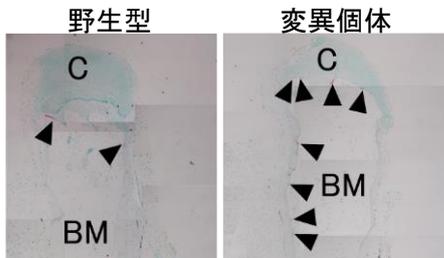


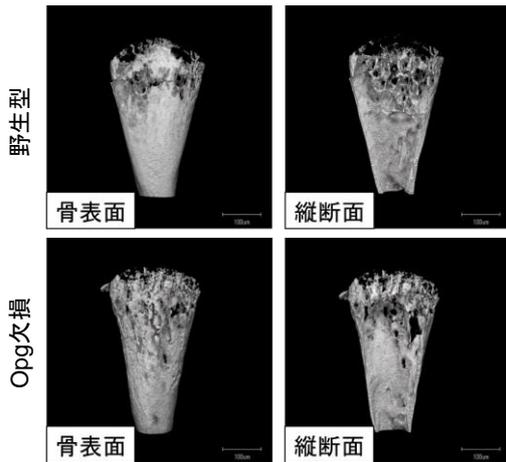
図4 *Opg* 欠損ネッタイツメガエルのオタマジャクシ

右側は左の強拡大。*Opg* 欠損個体でのみ、体長1cm程度に生育した時点で、四肢の形成が観察される(矢印)。



**図5 イベリアトゲイモリの骨組織像**  
 生後6か月の大腿骨のTRAP染色像。  
 TRAP陽性の破骨細胞(矢頭)が*Opg*欠損  
 個体で増加している。

酵素および PCR に用いる DNA ポリメラーゼなど、条件を詳細に検討して安定した発現検討の実現を目指す。



**図6 イベリアトゲイモリ大腿骨のμCT像**  
 生後6か月の大腿骨のμCT像。*Opg*欠損に  
 より骨表面の皮質骨および骨髓中の海綿骨  
 が減少している。

*Opg* 欠損ガエルで変化した四肢形成時期が *Rank*, *Rank1* 欠損でどのように変化するかも興味深い。今後、さらに研究を深めることで、両生類における骨代謝機構を明らかにし、骨代謝の起源に迫りたいと考えている。

ン包埋後に薄切した結果、TRAP 陽性の破骨細胞が野生型に比較して大きく増加していた (図5)。なお、イベリアトゲイモリはアカハライモリや哺乳類と同様に破骨細胞は TRAP 陽性を示す。

イベリアトゲイモリの大腿骨を  $\mu$ CT 撮影して立体的に骨組織を観察した結果、野生型に比べて *Opg* 欠損イベリアトゲイモリの骨では骨量が減少していた (図6)。

### (3) 骨組織における遺伝子発現の変化

イベリアトゲイモリおよびネッタイツメガエルの骨組織から mRNA を抽出して半定量的 RT-PCR を行って遺伝子発現の変化を試みた。しかし、両種ともに安定した結果は得られなかった。RNA の抽出や精製の条件を検討したが改善に至らず、現在、採取に用いる骨の量や逆転写

以上の結果から、両生類において *Opg* 遺伝子を欠損すると、破骨細胞による吸収が活性化し、骨量が減少することが示唆された。これは哺乳類における *Opg* の破骨細胞分化抑制と矛盾せず、*Opg* の機能が四足動物で広く保存されていることを示していると考えられる。一方で、ネッタイツメガエルにおいては、*Opg* 欠損により四肢の形成開始が早まり、長管骨で見られる破骨細胞についても分化よりもむしろ成熟に強く関わっている可能性が示された。イベリアトゲイモリでは、破骨細胞数が増加し骨量が減少するという、哺乳類で見られる表現型により近いことが分かった。このことから、有尾類では哺乳類の祖先型の骨代謝をより色濃く保存しており、無尾類は独特の進化が骨代謝または破骨細胞の性状についても起こっているのではないかと考えられる。本実験では *Opg* の欠損のみに限定して検討しているが、将来的にはさらに *Rank* および *Rank1* 遺伝子が担う役割についても同様に明らかにすることも重要である。また、

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwamoto Rina, Takahashi Takumi, Yoshimi Kazuto, Imai Yuji, Koide Tsuyoshi, Hara Miroku, Ninomiya Tadashi, Nakamura Hiroaki, Sayama Kazutoshi, Yukita Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemokine ligand 28 (CCL28) negatively regulates trabecular bone mass by suppressing osteoblast and osteoclast activities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-021-01210-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 雪田聡、中村浩彰
2. 発表標題 両生類の長管骨形成に出現する破骨細胞様細胞の性状
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雪田聡、近藤恵昭、塚原文典、高橋祐貴
2. 発表標題 両生類無尾目における皮質骨形成過程の比較
3. 学会等名 第92回日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雪田聡、近藤恵昭、望月雄斗
2. 発表標題 両生類長管骨形成時における軟骨内骨化機構の比較
3. 学会等名 第91回日本動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋拓実、岩本莉奈、二宮禎、細谷明宏、中村浩彰、雪田聡
2. 発表標題 ケモカインCCL25が骨代謝に与える影響の解明
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤恵昭、加藤英明、雪田聡
2. 発表標題 両生類ユビナガガエル科における骨組織の共通点と相違点
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中村 浩彰 (Nakamura Hiroaki) (50227930)	松本歯科大学・歯学部・教授  (33602)	
研究分担者	林 利憲 (Hayashi Toshinori) (60580925)	広島大学・両生類研究センター・教授  (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------