

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18946

研究課題名(和文) 骨芽細胞特異的ノックアウトマウスを用いた破骨細胞分化におけるSp7の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of Sp7 in osteoclastogenesis using osteoblast-specific Sp7 knockout mice

研究代表者

小守 寿人 (KOMORI, Hisato)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・特任研究員

研究者番号：80770411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞へ分化後のSp7の機能を明らかにするために、2.3kb Col1a1プロモーター下で骨芽細胞特異的にGFP-Creを高発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを用い、骨芽細胞特異的Sp7ノックアウトマウスを作成した。マイクロCT解析では、海綿骨が増加、皮質骨は減少し、組織解析では、皮質骨の多孔化が認められ、皮質骨内部に多数のTRAP陽性破骨細胞が認められた。また、皮質骨の骨細胞にはTUNEL陽性のアポトーシスが増加していた。骨細胞のアポトーシスにより皮質骨内に破骨細胞が増加、皮質骨の多孔化が起こったと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sp7は前骨芽細胞から骨芽細胞への分化に必須な転写因子である。しかし、骨芽細胞分化後の機能は、まだ明確になっていない。それは、これまで使われてきた骨芽細胞特異的に発現する2.3 kb Col1a1 Creトランスジェニックマウスの発現レベルが低く、明確な表現型を得にくかったことが原因と考えられる。我々は、新たに2.3 kb Col1a1 GFP-Creトランスジェニックマウスを作製し、Sp7を骨芽細胞特異的に欠失させ、骨細胞の生存におけるその重要性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the function of Sp7 after the differentiation into osteoblasts, we generated 2.3 kb Col1a1 promoter-GFP-Cre transgenic mice. Using these mice, we further generated osteoblast-specific Sp7-deficient mice. The trabecular bone was increased and cortical bone was reduced in micro-CT analysis, and the cortical bone was porous and many TRAP-positive osteoclasts were observed in the cortical bone in histological analysis. TUNEL-positive apoptotic osteocytes were increased in the cortical bone. Porous cortical bone was considered to be caused by the increase of osteocyte apoptosis, which enhances osteoclastogenesis.

研究分野：骨代謝学

キーワード：Sp7 破骨細胞 骨吸収

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

*Sp7*は、3つの Zn フィンガーを持ち、SP ファミリーに相同性を持つ転写因子である。*Sp7* ノックアウト (ko) マウスでは、骨芽細胞の形質を獲得する以前に分化がブロックされて、骨形成が全く起こらない<sup>1)</sup>。*Sp7* ko マウスには *Runx2* の発現が見られるが、*Runx2* ko マウスには *Sp7* の発現は認められず、*Sp7* は *Runx2* の下流にあると考えられる。実際、*Sp7* は *Runx2* によって発現誘導される<sup>2)</sup>。すなわち、*Sp7* は *Runx2* の下流にあり、*Runx2* とともに骨芽細胞分化に必須な転写因子である。骨芽細胞へ分化後の *Sp7* の機能を明らかにするために、骨芽細胞特異的発現を誘導する 2.3 kb *Coll1a1* プロモーターを用いて *Sp7* を過剰発現させたマウスを作製した。このマウスでは、骨芽細胞の成熟が抑制され、海綿骨、皮質骨ともに減少した。さらに、骨細胞突起が減少し、骨細胞数も減少、骨細胞は皮質骨に不均一に分布していた<sup>2)</sup>。一方、骨芽細胞特異的 *Sp7* ko マウスが報告されたが、一方の染色体では germline で *Sp7* を欠失させていること及び使われている Cre の欠失効率が不十分であることから、骨芽細胞での *Sp7* の機能解明に至っていない<sup>3)</sup>。

## 2. 研究の目的

骨芽細胞特異的かつ効率的に *Sp7* を欠失するために、Cre 発現細胞を EGFP (enhanced green fluorescent protein) で特定できるようにした EGFP-Cre の融合蛋白質を高発現するトランスジェニック (tg) マウスを作製する。このマウスを *Sp7* flox マウスと交配し、骨芽細胞分化後に *Sp7* を高頻度に欠失するマウスを作製し、骨芽細胞分化後の *Sp7* の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

1) 2.3 kb *Coll1a1* プロモーターカセットに EGFP と Cre の融合 DNA を挿入した。2.3 kb *Coll1a1* プロモーター-EGFP-Cre DNA を切り出し、B6C3H F1 マウスの受精卵の前核に注入、tg マウスを作製した。生まれた F0 マウスの尾椎を実体顕微鏡で観察し、EGFP 陽性のマウスを選択した。F1 tg マウスの凍結切片を作製、EGFP の発現パターンをキーエンス蛍光顕微鏡で観察した。また、F1 tg マウスを CAG-loxP-LacZ マウスと交配、 $\beta$  ガラクトシダーゼ染色で Cre 発現細胞およびそれらから分化した細胞を特定した。2.3 kb *Coll1a1* プロモーター-EGFP-Cre tg マウスは、5 回以上 B57BL/6 マウスとの交配を行なった。

2) B57BL/6 マウスと戻し交配を行なった 2.3 kb *Coll1a1* プロモーター-EGFP-Cre tg マウスと *Sp7* flox マウスを交配、*Sp7*<sup>f1/f1Cre</sup> マウスを作製した。

3) 10 週齢の *Sp7*<sup>f1/f1</sup> マウスと *Sp7*<sup>f1/f1Cre</sup> マウスをマイクロ CT で大腿骨の海綿骨骨量、海綿骨厚、海綿骨数、海綿骨骨密度、皮質骨骨幹部の皮質骨厚、皮質骨骨密度、内骨膜周囲長、外骨膜周囲長を測定した。

4) 3 週齢の *Sp7*<sup>f1/f1</sup> マウスと *Sp7*<sup>f1/f1Cre</sup> マウスの大腿骨の組織切片を作製、H-E 染色を行うとともに、抗 *Sp7* 抗体、抗 *Runx2* 抗体を用いた免疫組織染色を行なった。また、BrdU 投与を行った 3 週齢の *Sp7*<sup>f1/f1</sup> マウスと *Sp7*<sup>f1/f1Cre</sup> マウスの大腿骨の組織切片を用いて、BrdU 染色を行い、骨芽細胞の増殖を評価した。さらに、10 週齢の *Sp7*<sup>f1/f1</sup> マウスと *Sp7*<sup>f1/f1Cre</sup> マウスの脛骨のパラフィン切片を用いて、TUNEL 染色を行なった。TRAP 染色で、破骨細胞の数および形態を調べた。

#### 4. 研究成果

1) 2.3 kb *Coll1a1* プロモーター-EGFP-Cre tg マウスの凍結切片を用いた EGFP 発現解析では、骨芽細胞、象牙芽細胞および一部の歯髄細胞に EGFP 発現を認めた (図 1)。CAG-loxP-LacZ マウスと交配したマウスの  $\beta$  ガラクトシダーゼ染色では、骨芽細胞、骨細胞、象牙芽細胞および一部の歯髄細胞に発現を認めた。

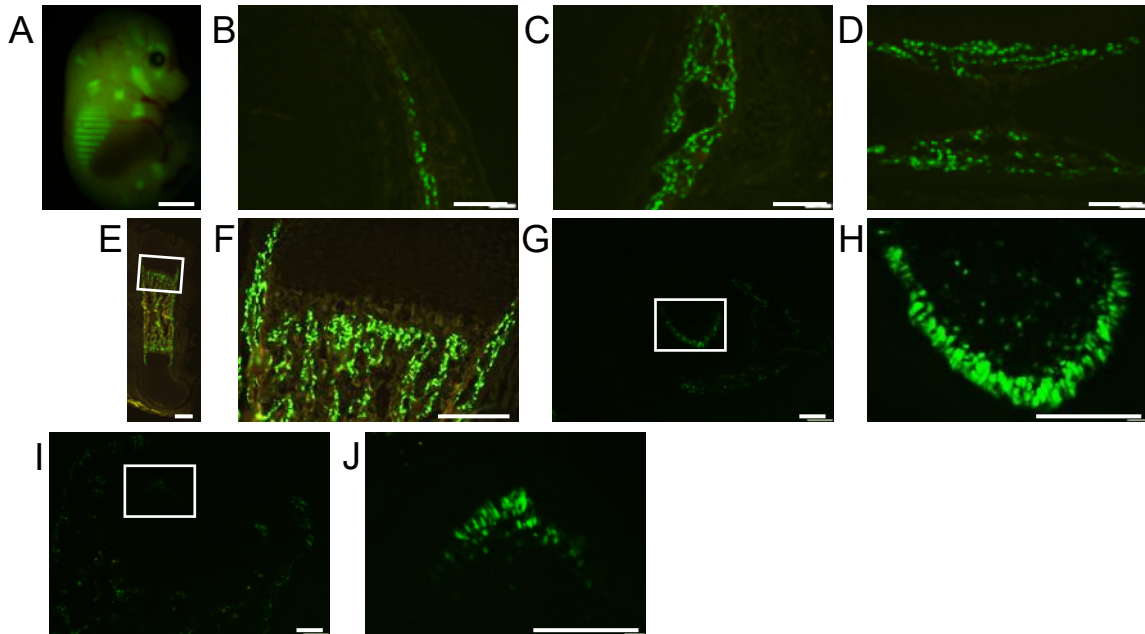


図 1

2.3 kb *Coll1a1* プロモーター-EGFP-Cre tg マウスの EGFP-Cre 発現

2.3 kb *Coll1a1* プロモーター-EGFP-Cre tg マウスの胎生 14.5 日の全体像 (A)、頭蓋骨 (B)、下顎骨 (C) および大腿骨 (D)。胎生 18.5 日の大腿骨 (E, F)。新生児の切歯 (G, H) と臼歯 (I, J)。

F, H, J は、E, G, I の四角の拡大。Scale bars: 0.2 cm (A), 0.1 mm (B-J)。

2) 10 週齢の  $Sp7^{fl/fl}$  マウスと  $Sp7^{fl/flCre}$  マウスの大腿骨のマイクロ CT 解析では、海綿骨骨量、海綿骨数が  $Sp7^{fl/flCre}$  マウスで増加していた。一方、海綿骨骨密度、皮質骨骨幹部の皮質骨厚、皮質骨骨密度は、 $Sp7^{fl/flCre}$  マウスで低下していた。内骨膜周囲長、外骨膜周囲長はともに  $Sp7^{fl/flCre}$  マウスで増加していた (図 2)。

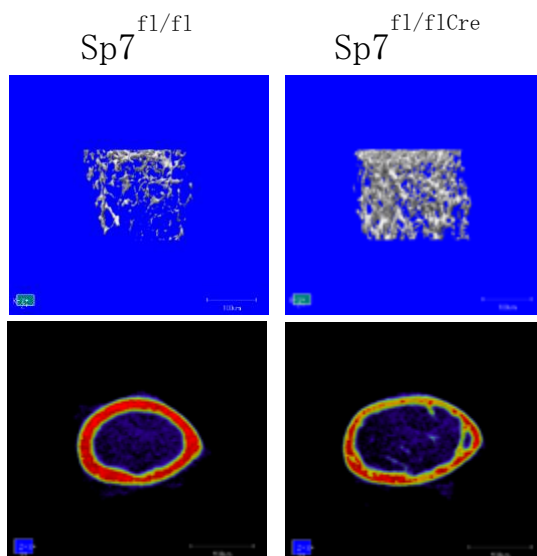


図 2

10 週齢の  $Sp7^{fl/fl}$  マウスと  $Sp7^{fl/flCre}$  マウスの大腿骨のマイクロ CT 解析

$Sp7^{fl/flCre}$  マウスで海綿骨骨量と海綿骨数の増加、皮質骨骨幹部の皮質骨厚と皮質骨骨密度の低下がみられた。また、 $Sp7^{fl/flCre}$  マウスでは、内骨膜周囲長、外骨膜周囲長ともに増加していた。

3) 3 週齢の大腿骨切片を用いた *Sp7*、*Runx2* の免疫組織染色では、*Runx2* 発現細胞は  $Sp7^{fl/flCre}$  マウスの海綿骨領域で増加していた。 $Sp7^{fl/flCre}$  マウスでは、前骨芽細胞での *Sp7* 発現を認めたが、骨芽細胞での発現はほとんど認めなかった。BrdU 染色では、

Sp7<sup>f1/f1Cre</sup> マウスで BrdU 陽性細胞の増加を認めた。TUNEL 染色では、Sp7<sup>f1/f1Cre</sup> マウスの脛骨皮質骨で、TUNEL 陽性骨細胞の増加を認めた。また、皮質骨の多孔化が認められ、TRAP 染色では、皮質骨内に TRAP 陽性破骨細胞が多数観察された。

これらの結果より、Sp7<sup>f1/f1Cre</sup> マウスの海綿骨領域では、未熟な骨芽細胞が増えており、これにより海綿骨が増加したと考えられた。また、皮質骨の骨細胞のアポトーシスにより破骨細胞形成が促進され、皮質骨の多孔化が起きたと考えられた。

#### 引用文献

- 1) Cell 108:17-29, 2002.
- 2) PLoS One 7: e32364, 2012.
- 3) J Bone Miner Res. 24: 1055-65, 2009.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Matsuura Viviane K. S. Kawata, Yoshida Carolina Andrea, Komori Hisato, Sakane Chiharu, Yamana Kei, Jiang Qing, Komori Toshihisa	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression of a Constitutively Active Form of Hck in Chondrocytes Activates Wnt and Hedgehog Signaling Pathways, and Induces Chondrocyte Proliferation in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2682 ~ 2682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21082682	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 -

1. 著者名 Jiang Qing, Qin Xin, Yoshida Carolina Andrea, Komori Hisato, Yamana Kei, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori, Croix Brad St., Kawata-Matsuura Viviane K. S., Komori Toshihisa	4. 巻 21
2. 論文標題 Antxr1, Which is a Target of Runx2, Regulates Chondrocyte Proliferation and Apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2425 ~ 2425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21072425	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 -

1. 著者名 Moriishi Takeshi, Ozasa Ryosuke, Ishimoto Takuya, Nakano Takayoshi, Hasegawa Tomoka, Miyazaki Toshihiro, Liu Wenguang, Fukuyama Ryo, Wang Yuying, Komori Hisato, Qin Xin, Amizuka Norio, Komori Toshihisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008586	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 -

1. 著者名 Qin Xin, Jiang Qing, Nagano Kenichi, Moriishi Takeshi, Miyazaki Toshihiro, Komori Hisato, Ito Kosei, Klaus von der Mark, Sakane Chiharu, Kaneko Hitomi, Komori Toshihisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Runx2 is essential for the transdifferentiation of chondrocytes into osteoblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------