

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21580344

研究課題名（和文） 動物のサイズ制御機構の分子メカニズム—マウスを用いた分子遺伝学的解析

研究課題名（英文） Regulation Mechanisms of the body size in mice

研究代表者

加納 聖 (KANO KIYOSHI)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：40312516

研究成果の概要（和文）： DDR2 がボディサイズをどのように制御しているかなど、生体内における詳細な機能はあまり知られていない。そこで DDR2 トランスジェニックマウスの作出ならびに培養細胞実験を行った。軟骨特異的に *Ddr2* cDNA を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し、軟骨組織の解析を行ったが、その表現型については特に目立った特徴は見られなかった。次に、軟骨前駆細胞株（ATDC5）を用いた *Ddr2* の発現抑制実験を行った結果、軟骨前駆細胞において DDR2 が細胞増殖、分化に抑制的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed phenotypes of DDR2 transgenic mice and ATDC5 cell lines with a focus on growth and size control. In previous study, cartilage cell proliferation decreased in DDR2 KO mice, and we analyzed also the function of DDR2 in cartilage tissue. We produced *Ddr2* cDNA transgenic mice, which were specifically overexpressed only in the cartilage cells, but there were no prominent phenotypes in cartilage tissue of the transgenic mice.

To understand the role of *Ddr2* in chondrocyte proliferation and differentiation, we next performed knockdown experiments using *Ddr2* miRNA in ATDC5 cells. We found that DDR2 might repress cell proliferation and differentiation in cartilage cells.

DDR2 is suggested to have important function especially in the reproductive organs by the expression in various tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：発生工学

1. 研究開始当初の背景

動物の体あるいは器官サイズはどのような仕組みで恒常的に維持されているのだろうか？

生物のボディサイズや器官サイズ制御機構の解明は、基礎生物学的に生物の形態形成を理解する上で非常に重要な課題である。また医学研究などの応用生物学領域においてもがんなど細胞増殖異常の様々な疾患、遺伝病の解明にとって、きわめて重要なテーマとなっている。

動植物共通の研究成果として、器官のサイズ制御は、細胞レベルの制御の単純な集積ではないことが明らかになってきた。例えば、ある器官の細胞1個のサイズは、どの動物種をとってもそれほど変わらない。この点から、動物の体や器官のサイズは構成する総細胞数によって決定されるように考えられるが、5倍体イモリでは、細胞1個のサイズは1倍体細胞の約5倍のサイズであるが、全体の総細胞数は約5分の1になり、結果的に体全体のサイズや各器官のサイズは変わらない。同様に、ショウジョウバエの羽において細胞周期異常を誘起しても、羽根の形態やサイズは、野生型のものと同様変わらない。さらに植物の葉においても、細胞周期制御が異常になり細胞増殖能が低下しても、葉のサイズは細胞数の減少から計算されるほどには減少しない。これまで申請者らは、4倍体/2倍体キメラマウス胚を用いた研究において、4倍体細胞における細胞周期延長と増殖能低下の可能性を示唆した。

また最近マウスにおいて、器官サイズは内的要因と外的要因のバランスによって制御されることがわかってきた。マウス肝臓において、内的要因である肝幹細胞数を胎子期のある期間のみ人為的に減少させても、何らかの外的要因により肝臓のサイズは最終的に維持される。

これらのことから、哺乳類においても単に細胞レベルで細胞分裂回数のみを数えているのではなく、体全体や器官全体のサイズを制御するための、全身的ならびに局所的な生物共通の細胞分裂調節機構があり、何らかの方法で実際に体や器官全体のサイズを制御する因子や遺伝的な機構、ボディサイズ恒常性維持機構が存在すると考えられる。

申請者はこれまでに、主にボディサイズが通常と異なる変異マウスの解析を行っているが、ポジショナルクローニング法によって自然発生の矮小マウス *Smallie* の原因遺伝子がコラーゲンレセプター *Discoidin domain receptor 2 (DDR2)* であることを同定し、*DDR2* と矮小性ならびに妊性との関連について明らかにした。*DDR2* は軟骨細胞の増殖を調節する機能を持つため、骨の前駆細胞である軟骨細胞に対して特異的に *DDR2* の発

現調節を行うことにより、軟骨細胞数を増減させることが出来ると考えられる。今回はこの *DDR2* の発現制御を行い、ボディサイズを内的要因と外的要因の観点から解析することにした。

2. 研究の目的

生体内における詳細な機能が明らかにされていない *DDR2* の、特にボディサイズ制御に関わる機能解析を目的とした。

まず Labrador ら (2001) による *DDR2 KO* マウスにおける軟骨細胞増殖能の低下が見られるという報告を受け、軟骨内骨化による骨格形成がボディサイズ決定に大きく寄与するものであるという考えのもと、二種類のトランスジェニックマウスおよび培養細胞系を利用して軟骨組織における *DDR2* の機能解析を行った。次に、最初の実験結果および *DDR2* が多様な組織で発現しているというこれまでの報告を受け、*DDR2* が生殖器官で重要な機能を担っていたように軟骨組織以外の様々な組織でボディサイズ制御に関与しているのではないかと考えた下、全身で *DDR2* を過剰発現するマウスを作出することで *DDR2* の全身的な機能解析を行い、*DDR2* の未知の機能を探索した。

3. 研究の方法

(1) 軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスを用いて、軟骨組織における *DDR2* の機能解析を試みた。まず、以前作出した軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスが、本当に軟骨組織において *Ddr2* を過剰発現しているかを確認した。次に、ボディサイズの変化を解析するために、軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスの体重を測定した。さらに、軟骨特異的に *Ddr2* を過剰発現することで成長板の軟骨組織の細胞構成にどのような変化が起きているかを調べた。最後に、全身の骨格形成にどのような影響を与えたかを調べた。

(2) 軟骨組織における *DDR2* の機能解析を行うために、軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いて miRNA による *Ddr2* の発現抑制実験を行った。まず細胞増殖における変化、分化誘導に対する応答性の変化を調べた。また *Ddr2* 安定抑制株を用いて、*DDR2* の下流シグナルの探索を試みた。

(3) 生体内での軟骨組織における *DDR2* の機能解析を行うために、軟骨特異的に Kinase-dead *DDR2 (KD-DDR2)* を過剰発現するマウスを作出し、解析を行った。ボディサイズの変化を調べるために、軟骨特異的 *KD-DDR2* 過剰発現マウスの体重を経時的に測定し、さらに軟骨内骨化、全身の骨格形成の影響を調べた。

(4) 全身的に *DDR2* を過剰発現するトランス

ジェニックマウスを作出し解析することで DDR2 の未知の機能を探索し、ボディサイズ制御との関連を検討することにした。ボディサイズの変化を調べるために、全身性 DDR2 過剰発現マウスの体重を経時的に測定した。さらに、軟骨内骨化および骨格形成への影響、骨、軟骨組織以外の影響を検討し、DDR2 の未知の機能探索を試みた。

4. 研究成果

(1)

① 軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスにおける *Ddr2* 発現量

導入遺伝子がゲノムに組み込まれたと判定されたマウスおよびその同腹子について、*Ddr2* 発現量の定量を行った結果、Tg マウスにおいて同腹子と比較して約 8 倍の *Ddr2* が発現していた。

② 軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスの表現型解析

軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスが示す表現型について、特に骨、軟骨組織に着目して解析を行った。

A. 軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスの体重推移

軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスおよびその同腹子について、2 週齢から 6 週齢にかけて体重測定を行った結果、雌雄共に同腹子とほとんど変わらないことが示された。

B. 軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスの大腿骨端組織

4 週齢における軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスおよびその同腹子の雄マウスについて、大腿骨端組織切片を作成しアルシアンブルー、HE 染色を行った結果、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層、また周囲の骨組織について、いずれも同腹子と比較して変化が認められなかった。

C. 軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスの全身骨格

12 週齢の軟骨特異的 *Ddr2* 過剰発現マウスおよびその同腹子の雄マウスについて、全身骨格標本の外観からは、同腹子の間に変化は認められなかった。

次に、全長として鼻端から尾端部の長さを、頭蓋骨長として鼻端から後頭部までの長さを、さらに、尺骨と脛骨の長さを測定した。骨長測定の結果、同腹子との間に有意差が無いことが確認された。

(2)

① 軟骨前駆細胞株 ATDC5 の培養

本節では、*Ddr2* 抑制実験のための *in vitro* 実験系として、軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いた。

② miRNA による *Ddr2* 抑制効果の確認

リアルタイム PCR により *Ddr2* 発現量を定量した結果、mi*Ddr2* をトランスフェクション

した実験区において、トランスフェクションを行わなかった対照区と比較して約 60 % の *Ddr2* 発現量低下が確認された。

③ *Ddr2* 安定抑制株の作出

Ddr2 抑制による ATDC5 の表現型の変化を観察するために、まず *Ddr2* 安定抑制株の作出を行った。

Ddr2 安定抑制株における *Ddr2* 発現量

Blasticidin 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培養液中で選択培養を行うことにより、16 系統の *Ddr2* 安定抑制株を作出した。トランスフェクション、選択培養することにより得られた mock と比較して有意に *Ddr2* 発現量が低下している *Ddr2* 安定抑制株として、mi*Ddr2*Line1、mi*Ddr2*Line2、mi*Ddr2*Line3 の 3 つの株が得られ、それぞれ約 40 %、30 %、70 % の *Ddr2* の発現が抑制されていた。

④ *Ddr2* 安定抑制株の表現型解析

前項で作出した *Ddr2* 安定抑制株について、*Ddr2* を抑制することにより ATDC5 の表現型を解析した。

A. *Ddr2* 安定抑制株の増殖

前項にて作出した 3 系統の安定抑制株および mock を培養初日に 2×10^4 個播種し、その後 4 日間連続的に細胞数の計数を行った結果、mock と比較して細胞増殖が活発になっていた。また、特に細胞数の増加が mi*Ddr2* Line3 (約 70 % の *Ddr2* 抑制率)、mi*Ddr2* Line1 (約 40 % の *Ddr2* 抑制率)、mi*Ddr2* Line2 (約 30 % の *Ddr2* 抑制率) の順に活発であったことから、*Ddr2* の抑制率が高ければ高いほど細胞増殖が活発になっていることがわかった。

B. *Ddr2* 安定抑制株の分化

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bovine insulin を添加し *Ddr2* 安定抑制株において分化誘導培養を行い、*Ddr2* 抑制による細胞分化の変化を調べた。その結果、培養 15 日目において、mi*Ddr2* Line3 では mock と比較してアルシアンブルー陽性細胞群がより多く現れた。

C. *Ddr2* 関連因子の発現

Ddr2 の発現抑制によってどのように細胞の表現型の変化がもたらされたのかを調べるために、骨芽細胞において DDR2 シグナルによる制御を受けることが示唆されている *Runx2* mRNA の発現量の定量を行った。測定の結果、mock と比較して有意な差ではなかったものの、*Runx2* の発現は *Ddr2* の抑制率に相関して低下している傾向が観察された。

(3)

① 軟骨特異的 Kinase-dead DDR2 過剰発現マウスの作出

A. コンストラクトの構築

肋軟骨由来マウス cDNA より得られた KD-DDR2 配列を軟骨特異的発現ベクターである p742lacZInt へと組み込み、さらに Insulator 配列を *Col11a2* プロモーターの上流に組み込むことで、軟骨特異的に

Kinase-dead DDR2 を高率に発現することが予測されるコンストラクトを構築した。

B. Tgマウスの作出

Insulator-*Col11a2*-KD-*Ddr2* を顕微注入し、生存胚を ICR 偽妊娠マウスの卵管に移植することで産子を得た。得られた産子のゲノム DNA を用いて PCR により遺伝子導入の有無を調べた。その結果、5 系統の Tg マウスの作出に成功した。

C. Tgマウスの継代

得られた 5 系統の Tg マウスについて、7 週齢より C57BL/6J マウスとの戻し交配を行い、得られた産子について前項と同様に遺伝子導入の有無を調べた。その結果、安定的に産子を得ることの出来た 3 系統の Tg マウスについて解析を行った。この 3 系統の Tg マウスをそれぞれ Line1、Line2、Line4 と呼称する。

D. Kinase-dead *Ddr2* 発現量

作出した軟骨特異的 KD-DDR2 過剰発現マウスについて、発現量の測定を行った。その結果、Line1 においては Kinase-dead *Ddr2* の発現が確認されず、Line2 においては野生型 *Ddr2* と同程度の発現、Line4 においては野生型 *Ddr2* の約 17 倍の KD-DDR2 の発現が確認された。以降の解析では、Line4 を解析した。

E. TgマウスにおけるKD-DDR2 の発現確認

肋軟骨を採取、抽出したタンパク質に対して DDR2、 α -Tubulin に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。ウエスタンブロッティングの結果、KD-DDR2 のバンドが強く検出された。

② 軟骨特異的 KD-DDR2 過剰発現マウスの表現型解析

① より、KD-DDR2 の過剰発現が確認された。そこで、軟骨特異的 KD-DDR2 過剰発現マウスが示す表現型について、特に骨、軟骨組織に着目して解析を行った。

A. 体重推移

軟骨特異的 KD-DDR2 過剰発現マウスおよびその同腹子の雌マウスについて、2 週齢から 6 週齢にかけて体重測定を行った結果、同腹子とほとんど変わらないことが示された。

B. 大腿骨端組織

3 週齢における軟骨特異的過剰発現マウスについて、大腿骨端組織切片を作成し HE 染色を行い、増殖軟骨細胞層の厚みを計測した。その結果、軟骨特異的 KD-DDR2 過剰発現マウスにおいて同腹子と比較して増殖軟骨細胞層の厚みが増していた。肥大軟骨細胞層については同腹子の間に違いはなかった。

C. 全身骨格

6 週齢の軟骨特異的 KD-DDR2 過剰発現の雌マウスについて、アルシアンブルー、アリザリンレッド共染色により全身骨格標本作製した。全身骨格標本の外観からは、同腹子との間に変化は認められなかった。

次に、頭蓋骨長、尺骨、脛骨の骨長を測定したところ、同腹子の間に差は無かった。

(4)

① 全身性 DDR2 過剰発現マウスの作出

A. Tgマウスの作出

CAG-*Ddr2* を顕微注入し、生存胚を ICR 偽妊娠マウスの卵管に移植することで産子を得た。3 系統の Tg マウスの作出に成功した。

B. TgマウスにおけるDDR2 の過剰発現

作出した全身性 DDR2 過剰発現マウスおよびその同腹子の雄マウスより、DDR2 の発現が知られている組織である精巣および心臓を採取し、タンパク質を抽出して DDR2、 α -Tubulin についてウエスタンブロッティングを行った。その結果、精巣、心臓ともに Tg マウスにおいて大幅な DDR2 の過剰発現が確認された。

② Tg マウスの表現型解析

全身性 DDR2 過剰発現マウスの表現型について解析を行った。

A. 体重推移

全身性 DDR2 過剰発現マウスおよびその同腹子について、2 週齢から 8 週齢にかけて体重測定を行った結果、雌雄共に 3 週齢より同腹子と比較して低い体重を示し、5 週齢以降は同腹子の約 85% の体重を示した。特に 8 週齢における体重測定の結果、同腹子と比較して有意に低い体重であった。

B. 骨、軟骨組織解析

前項より、全身性 DDR2 過剰発現マウスは成体において同腹子と比較して低体重であることが明らかとなった。この低体重の原因が骨長の減少、軟骨組織の形成不全など骨、軟骨組織における変化にあるのかどうかを確かめるため、骨、軟骨組織についての解析を行った。

C. 大腿骨端組織

10 週齢における全身性 DDR2 過剰発現マウスおよびその同腹子の雄マウスについて、大腿骨端組織切片を作成し HE 染色を行った。その結果、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層について、いずれも同腹子と比較して変化は認められなかった。

D. 全身骨格

10 週齢の全身性 DDR2 過剰発現マウスおよびその同腹子の雄マウスについて、アルシアンブルー、アリザリンレッド共染色により全身骨格標本作製した。全身骨格標本の外観からは、同腹子の間に差は認められなかった。

次に、作製した全身骨格標本について、全長、頭蓋骨長、尺骨、脛骨の長さを測定したところ、同腹子の間に差はなかった。

E. 脂肪蓄積量

全身性 DDR2 過剰発現マウスは成体において同腹子と比較して低い体重を示すものの、骨、軟骨組織、さらに体長にも変化はないこ

とが明らかとなった。そこで、全身性 DDR2 過剰発現マウスに見られた低体重の原因として脂肪蓄積の異常があるのではないかと考え、脂肪の蓄積量について解析を行った。蓄積脂肪量として、24-26 週齢の全身性 DDR2 過剰発現マウスおよびその同腹子の雌マウスより、皮下脂肪として背側、鼠径部の白色脂肪を、内臓脂肪として生殖腺、腸間膜の白色脂肪を採取し、その重量を計量した。その結果、同腹子と比較して皮下脂肪重量、内臓脂肪重量ともに有意に減少していた。

F. 食餌量

これまでの解析より、全身性 DDR2 過剰発現マウスに認められた低体重の原因の一つとして、蓄積脂肪量の減少があることが明らかとなった。次に、全身性 DDR2 過剰発現マウスに観察された脂肪量蓄積の減少の原因として食餌量について解析を行った。

体重あたりの食餌量を求めたところ、全身性 DDR2 過剰発現マウスの食餌量は同腹子と比較して減少しておらず、むしろ、有意な差ではなかったものの、同腹子よりも若干の増加傾向が認められた。

G. 血液生化学検査

前項の実験より、全身性 DDR2 過剰発現マウスに認められた蓄積脂肪量の減少と食餌量の間に関連は認められないことが明らかとなった。そこで、全身性 DDR2 過剰発現マウスにおける何らかの代謝異常が脂肪蓄積量の減少の原因となっているのではないかと考え、特に代謝に関わる因子に着目した血液生化学検査を行った。

6 週齢の全身性 DDR2 過剰発現マウスおよびその同腹子の雄マウスより血漿を採取し、Rat Metabolic MAPV1.0 により血液生化学検査を行った。また、血漿を採取した個体の精巣よりタンパク質を抽出し、DDR2 および α -tubulin についてウエスタンブロッティングを行うことで、全身性 DDR2 過剰発現マウスが DDR2 発現を確認した。その結果、血液検査に供した全身性 DDR2 過剰発現マウスは、どの個体も DDR2 を過剰発現していることが確認された。血液生化学検査の結果、同腹子と比較して全身性 DDR2 過剰発現マウスにおいて血中濃度が著しく低下している因子として Growth Hormone (GH) が、同腹子と比較して全身性 DDR2 過剰発現マウスにおいて血中濃度が著しく上昇している因子として Testosterone、Prolactin、Leptin が同定された。

H. 精巣組織

血液生化学検査の結果、全身性 DDR2 過剰発現マウスにおいて Testosterone の血中濃度が著しく上昇していることが明らかとなった。このことが脂肪蓄積量の減少と関連があるかは不明であるが、全身性 DDR2 過剰発現マウスにおいて精巣に形態的異常が認め

られる可能性が考えられたため、精巣の組織化学的解析を行った。

6 週齢の全身性 DDR2 過剰発現マウスおよびその同腹子の雄マウスより精巣を採取し、組織切片を作成し HE 染色を行った。その結果、全身性 DDR2 過剰発現マウスにおいて同腹子と比較して、テストステロンを分泌するライディヒ細胞を含めて精巣の形態的異常は認められなかった。

I. 脂肪組織における DDR2 の発現確認

全身性 DDR2 過剰発現マウスに見られた脂肪蓄積量減少や血中 Leptin 濃度上昇が脂肪組織における DDR2 の異所的発現によるものではないことを確かめるために、導入遺伝子の確認されなかった同腹子より採取した脂肪組織を用いて RT-PCR およびウエスタンブロッティングを行った。その結果、RT-PCR により脂肪組織における *Ddr2* の発現が確認され、ウエスタンブロッティングにより脂肪組織における DDR2 の発現が確認された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Egashira A, Kano K, Naito K. Preimplantation-embryo-specific cell-cycle regulation is attributable to a low expression of retinoblastoma protein rather than its phosphorylation. *J Reprod Dev* (査読有) 57: 492-499 (2011)
- ② Endo T, Imai A, Shimaoka T, Kano K, Naito K. Histone exchange activity and its correlation with histone acetylation status in porcine oocytes. *Reproduction* (査読有) 141: 397-405. (2011)
- ③ Fujii W, Nishimura T, Kano K, Sugiura K, Naito K. CDK7 and CCNH are components of CDK-activating kinase and are required for meiotic progression of porcine oocytes. *Biol Reprod* (査読有) 85: 1124-1132 (2011)
- ④ Kano K, Kitamura A, Matsuwaki T, Morimatsu M, Naito K. Discoidin Domain Receptor 2 (DDR2) is required for maintenance of spermatogenesis in male mice. *Mol Reprod Dev* (査読有) 77: 29-37. (2010)
- ⑤ Matsumura H, Kano K, Evsikova CM, Young J, Nishina P, Naggert J, Naito K. Multiple dysregulated hormone and anti-apoptosis pathways underlie infertility in mice with a loss-of-function allele for the collagen receptor gene, *Ddr2*. *Physiol Genomics* (査読有) 39: 120-129. (2009)

〔学会発表〕（計 3 件）

① Nishimura T, Fujii W, Kano K, Sugiura K, Naito K. Involvement of PKA and AKAP in Meiotic Competence of Porcine Growing Oocytes. 2nd World Congress on Reproductive Biology. 2011 年 10 月 11 日. Cairns, Queensland Australia.

② Hisaki T, Kawai I, Kobayashi S, Naito K, Kano K. Size regulation of early mouse embryo *in vitro*. Mouse Development, Genetics & Genomics, Meeting of Cold Spring Harbor Laboratory. 2010 年 10 月 27 日. Cold Spring Harbor, USA.

③ Kawai I, Matsumura K, Hisaki T, Kobayashi S, Naito K, Kano K. Role of discoidin domain receptor 2 (DDR2) in mouse growth. Mouse Development, Genetics & Genomics, Meeting of Cold Spring Harbor Laboratory. 2010 年 10 月 27 日. Cold Spring Harbor, USA.

〔図書〕（計 1 件）

① Kano K, Brenner's Online Encyclopedia of Genetics, Second Edition. Academic Press. (2012) （共著・デジタル図書）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加納 聖 (KANO KIYOSHI)
山口大学・農学部・准教授
研究者番号：40312516

(2) 研究分担者

森松正美 (MORIMATSU MASAMI)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：70241370