

## 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29日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592356

研究課題名（和文） 骨芽細胞転写因子の硬組織形成における分子基盤解析

研究課題名（英文） Molecular dissection of transcription factor on bone formation

研究代表者

河合 伸治（KAWAI SHINJI）

大阪大学・大学院歯学研究科・特任准教授

研究者番号：40362678

研究成果の概要（和文）：Osrl 遺伝子のトランスジェニックマウスを作出したところ、頭蓋骨の縫合に異常が生じる表現型が観察された。胎生期および生後のマウスから頭蓋骨を採取し、組織切片に HE 染色を施すことにより形態異常が観察された。頭蓋骨より骨芽細胞を分離培養し、骨芽細胞マーカーなどの発現変動、アルカリフォスファターゼ染色およびフォンコッサ染色により骨芽細胞分化の異常が観察された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the in vivo function of Osrl, we generated transgenic mice overexpressing Osrl. Osrl transgenic mice demonstrated delayed cranial sutures. Examinations of newborn Osrl transgenic mice skeletons stained with alcian blue and alizarin red showed abnormalities in the skull and skeletal elements. Calvarial osteoblasts obtained from Osrl transgenic mice showed abnormalities in osteoblast differentiation and proliferation, confirming that Osrl is required for osteogenesis. Our genetic observations showed that the Osrl gene plays a key role in osteoblastic cell proliferation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

## 1. 研究開始当初の背景

Osrl 遺伝子と骨形成に関与する研究は、国内外ともに緒に就いたばかりであり、我々が世界の Osrl 研究をリードする立場にある。研究代表者は、平成18年度から科学研究費補助

金（基盤C）の助成を受け、Osrl のドミナントネガティブ型遺伝子のトランスジェニックマウスを作出した。そのマウスでは、頭蓋骨の形成に異常が生じる表現型が観察され、研究代表者は、Osrl の骨形成における生理的

機能を解明した。これらの成果は米国骨代謝学会にて口演発表に選出された。また、日本骨代謝学会にて口演発表し、優秀演題賞として高い評価を受けた。更に、骨生物学分野におけるトップジャーナルである国際誌 *Journal of Bone and Mineral Research* にアクセプトされた (2007 22(9) 1362-72)。本研究課題では、*Osr2* と同源性の高い *Osr1* の骨形成における機能は未解明のままであるため、*Osr1* の骨形成における役割を把握することを計画している。

## 2. 研究の目的

我々はトランスクリプトーム解析により、骨や歯などの硬組織の形成に関わる因子の網羅的検索を精力的に行っている。特に遺伝子発現を制御する転写因子に着目した解析の結果、幾つかの転写因子が骨芽細胞の分化過程で強く発現していることが判明した。そこで、これらのひとつ *Odd-skipped related (Osr)* に着目した。研究代表者は、既に *Osr2* の骨形成における分子機能について重要な知見を世界に先駆け示した。本研究課題では、もうひとつの *Osr* ファミリー遺伝子である *Osr1* の骨形態形成における生理的機能を、遺伝子改変動物を用いて解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

遺伝子改変動物を作成し、ライン化する。次に、胎生期と生後のマウスから頭蓋骨および長管骨組織を採取し、組織切片後、HE染色、類骨染色、骨染色を施すことにより骨形態異常を評価する。また、骨形態計測により硬組織を観察する。更に、頭蓋骨または長管骨より骨芽細胞を分離培養し、骨芽細胞マーカーの発現変動、アルカリフォスファターゼ染色およびフォンコッサ染色により骨芽細胞分

化を観察する。既存の転写因子 *Runx2* との関連をレポーターアッセイやリアルタイムPCR法を用いて検討する。骨芽細胞における機能、特に細胞周期、細胞死、細胞分化についての知見を得るために、アデノウイルスによる過剰発現系やRNAiによるノックダウン系を用いて骨芽細胞マーカーの発現を解析により評価する。

## 4. 研究成果

(1) 常法に従って、本来の発現を保つために *Osr1* プロモーターの制御下で *Osr1* 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成した (図1)。導入された遺伝子はテイルPCR法により確認し、*Osr1* 過剰発現マウスをライン化し、以下の実験に用いた。

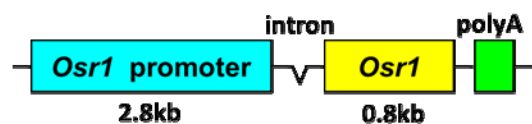


図1 *Osr1* 発現用コンストラクト

(2) *Osr1* 遺伝子のトランスジェニックマウスの頭蓋部分をソフトX線で観察した所、頭蓋の長さに異常が生じる表現型が観察された (図2)。

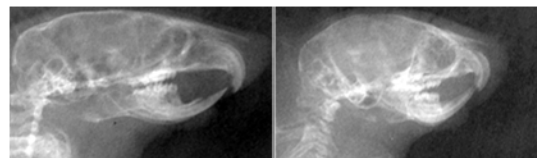
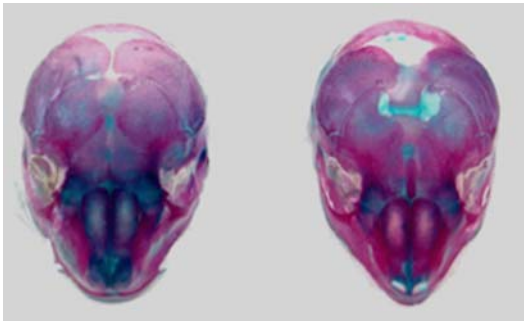


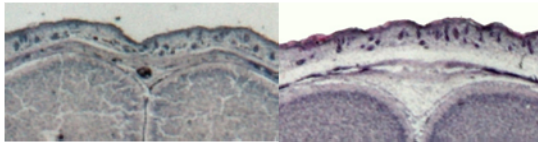
図2 Tgマウス (右) では野生型 (左) と比較して頭蓋の長さに異常が見られる

(3) *Osr1* 遺伝子のトランスジェニックマウスの骨格標本を作成し、頭蓋部分を観察した。その結果、頭蓋骨の縫合に異常が生じる表現型が観察された (図3)。



**図3 Tgマウス(右)では野生型(左)と比較して頭蓋縫合部分に異常が見られる**

(4) 胎生期および生後のマウスから頭蓋骨を採取し、組織切片に HE 染色を施すことにより形態異常が観察された (図4)。



**図4 Tgマウス(右)では野生型(左)と比較して頭蓋縫合が遅延している**

(5) 頭蓋骨より骨芽細胞を分離培養し、骨芽細胞マーカーなどの発現変動、アルカリフォスファターゼ染色およびフォンコッサ染色により骨芽細胞分化の異常が観察された。

(6) トランスクリプトーム解析は強力な最新技術であるため、多くの研究室で利用されている。我々の研究室でも当初からこの技術に着目し、有用遺伝子および新規遺伝子のスクリーニングを精力的に行ってきた。時代のニーズは次のステップであるポストゲノミクス解析に移りつつある。我々はそのニーズを踏まえ、トランスクリプトーム解析で得られた結果が実際の生命現象を反映し得るかどうか、遺伝子改変動物や細胞生物学的手法により検討を加えた。今回見出したターゲット遺伝子が予想通りの機能を有し、その形態形成の詳細が解明でき、骨欠損部位に骨を再生する未来医療につながると期待された。更にトランスクリプトーム解析の結果得られた他の遺伝子群についても同様な手法によ

り解析を継続し、骨の再生メカニズムの全体的な理解につながる可能性を秘める。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Kawai S, Amano A. Negative regulation of Odd-skipped related 2 by TGF-beta achieves the induction of cellular migration and the arrest of cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 May 18;421(4):696-700. 査読有

② Kawai S, Amano A. BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *J Cell Biol*. 2012 Apr 16;197(2):201-8. 査読有

③ Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, Amano A, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T. Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter Pit-1 is critical to chondrogenesis. *J Biol Chem*. 2011 Jan 28;286(4):3094-103. 査読有

④ Kawai S, Abiko Y, Amano A. Odd-skipped related 2 regulates genes related to proliferation and development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jul 23;398(2):184-190. 査読有

⑤ Kawai S, Amano A. Odd-skipped related 2 is epigenetically regulated in cellular quiescence. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jun 11;396(4):831-6. 査読有

[学会発表] (計7件)

① Odd-skipped Related1 and Odd-skipped Related2 are Mutually Regulated Kawai S, Amano A The 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (San Diego, CA, 2011.9.17)

② Odd-skipped related1 と Odd-skipped related2 の相互的な発現制御 河合伸治, 天野敦雄 第29回日本骨代謝学会学術集会 (大阪 2011.7.30)

③ TGF-beta suppressed the expression of Odd-skipped related 2 in mesenchymal cells Kawai S, Amano A The 32nd Annual Meeting

of the American Society for Bone and Mineral Research (Toronto, ON, 2010.10.17)

④ TGF-beta による Odd-skipped related 2 遺伝子の発現制御 河合伸治、天野敦雄 第 28 回 日本骨代謝学会学術集会 (東京 2010.7.23)

⑤ Expression of Odd-Skipped Related 2 in Dental Mesenchyme and Renal Corpuscle Kawai S, Amano A The 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (Denver, CO, 2009.9.13)

⑥ Odd-skipped related 1 遺伝子の硬組織形成過程における機能解析 山内理司、河合伸治、大嶋隆、天野敦雄 第 51 回歯科基礎医学会学術大会 (新潟 2009.09.11)

⑦ Odd-skipped related 2 の発現パターン解析 河合伸治、天野敦雄 第 27 回 日本骨代謝学会学術集会 (大阪 2009.7.24)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河合 伸治 (KAWAI SHINJI)

大阪大学・大学院歯学研究科・特任准教授

研究者番号：40362678

### (2) 研究分担者

天野 敦雄 (AMANO ATSUO)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：50193024

