

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659685

研究課題名(和文)脊椎動物に普遍的な骨石灰化制御機構の解明

研究課題名(英文)In search for shared regulatory mechanisms of bone mineralization in vertebrates

研究代表者

松尾 光一 (Matsuo, Koichi)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40229422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、小型魚類であるメダカで細胞特異的にマウスの転写因子Fra-1を発現させ、骨芽細胞におけるFra-1の機能を明らかにすることを目的とした。メダカで骨芽細胞特異的にFra-1を発現するトランスジェニックメダカを作製したところ、骨石灰化の抑制が起こることが観察された。すなわち、Fra-1の発現を介してミネラル化を抑制する分子機構が、マウスだけでなくメダカにもあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic medaka fish expressing mouse Fra-1 in osteoblasts to determine cell-autonomous function of Fra-1 in osteoblasts in vivo. Alizarin complexone staining and micro-computed tomography revealed that Fra-1 transgenic medaka showed lower bone mineral density than wild-type controls. These data suggest that Fra-1 expression in osteoblasts impairs bone mineralization not only in mice but also in medaka.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨代謝 石灰化 転写因子 メダカ 骨芽細胞 ミネラル化

1. 研究開始当初の背景

(1) メダカ(*Oryzias latipes*)などの小さくて透明な小型魚類では、個体全体の骨を非破壊的に観察することが可能である。目的遺伝子を細胞特異的に発現するトランスジェニックメダカを作製するだけでなく、蛍光タンパク質によって目的遺伝子の発現を可視化したり、骨芽細胞、破骨細胞、血管を生体内で可視化したりできるようになった(Chatani et al, Dev Biol, 2011 など)。

(2) 転写因子 Fra-1 は Fos ファミリーに属し、Jun ファミリーのタンパク質とヘテロ2量体を形成して働く。これまでに、主要組織適合性抗原(MHC クラス I)のプロモーターを用い、Fra-1 を全身性に発現するトランスジェニックマウス(Fra-1 マウス)を作製し、骨髄腔が骨で埋まる程に骨形成が促進することを報告した(Jochum et al, Nat Med, 2000)。その後、Fra-1 マウスが様々な異常、すなわち頭蓋顔面の形態異常、骨折治癒遅延、自然免疫障害などを示すことを見出した(Nishiwaki et al, J Bone Miner Res, 2006; Yamaguchi et al, J Bone Miner Res, 2009; Takada et al, J Immunol 2010, Oncogene 2011)。新生仔 Fra-1 マウスの頭蓋骨から調製した骨芽細胞や、Fra-1 を強制発現した骨芽細胞の培養実験では、石灰化結節そのものの形成促進ではなく、石灰化度の低い、均一な骨マトリックスが作られた。すなわち、Fra-1 の骨芽細胞特異的な機能は、石灰化の抑制と類骨形成の促進であり、特に類骨形成の促進には、骨芽細胞と骨芽細胞以外の細胞との相互作用(破骨細胞、マクロファージ、血管内皮細胞などとの相互作用)に依存するものと考えられた。

2. 研究の目的

われわれは、これまで10年以上にわたる Fra-1 トランスジェニックマウスの研究から「転写因子 Fra-1 の骨芽細胞におけるもっとも基本的な細胞自律的な機能は、「低石灰化骨の形成」であり、「骨形成促進による骨硬化症」は骨芽細胞の細胞非自律的な機能であり、両者は分離できるとの仮説を立てた。つまり、Fra-1 トランスジェニックマウスで骨が増えるのは、Fra-1 を高発現する、骨芽細胞以外の細胞系譜における機能を反映していると考えられた。さらに、骨芽細胞自律的な機能は哺乳動物だけでなく、魚類などの脊椎動物にも共通であると推測した。本研究では、小型魚類であるメダカの骨芽細胞特異的にマウスの転写因子 Fra-1 を発現させ、骨の低石灰化が種を超えて起こることを実証する。さらに、そのメカニズムを追究するために、メダカの全身の高い透明性を生かして、脊椎動物に普遍的な「Fra-1 による骨石灰化の新たな制御システム」を見出すことを目的

とした。

3. 研究の方法

(1) アミノ酸配列の解析

Clustal X (ver. 2.1)を用いてアミノ酸配列を並べ、系統樹をNJplotで作成した。

(2) Fra-1 トランス遺伝子の構築

メダカの骨芽細胞特異的 Osterix プロモーター(東工大、猪早敬二先生より分与)の下流にマウス Fra-1 の翻訳領域と、ウイルス由来の自己消化性ペプチド配列である T2A および緑色蛍光タンパク質 EGFP をつないだ。トランス遺伝子部分をメガヌクレアーゼ I-SceI で切り出せるようにプラスミドベクターに挿入した。

(3) メダカとマイクロインジェクション

野生型メダカ Cab を用い、トランス遺伝子 DNA 溶液を受精後 30 分以内の一細胞期の卵の細胞質に注入し、5-6 日後に EGFP 陽性の胚を選択した。

(4) 遺伝子およびタンパク質の発現確認

ウエスタンブロット法および定量 RT-PCR 法を用いた。

(5) 顕微鏡観察

Alizarin complexone (Sigma) で染色し、蛍光実体顕微鏡(Leica, AF6000 M205FA)で観察した。

(6) アルカリホスファターゼ(ALP)と酒石酸

抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)の染色凍結切片をそれぞれの染色キット(Sigma)を用いて染色した。

(7) マイクロ CT

4%パラホルムアルデヒドで固定した後、マイクロ CT(R_mCT2, Rigaku)を用いて撮像した。

(8) 統計解析

Student t-test を用いて両側検定を行った。

4. 研究成果

(1) マウスとメダカの Fos ファミリーと Jun ファミリーの転写因子について、網酸配列を比較解析したところ、マウス Fra-1 タンパク質は、メダカの Jun タンパク質と2量体を形成して転写因子 AP-1 として機能すると予測された。

(2) メダカで骨芽細胞特異的にマウス Fra-1 を発現するトランスジェニックメダカを作製するため、骨芽細胞分化前期より発現するメダカ Osterix (Osx) 遺伝子の下流にマウス Fra-1 と緑色蛍光タンパク質(GFP)を組み込んだ発現ベクターを構築した(図1)。

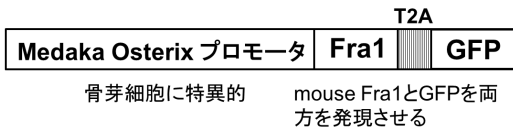


図1 Fra-1トランスジーン(7.1 kbp)の構造

(3)このベクターを一細胞期のメダカ胚にマイクロインジェクションすることで(慶應義塾大学清水厚志助教との共同研究) GFP 陽性のトランスジェニックメダカ (Fra-1 メダカ、初代 F0) を得た(図2)。

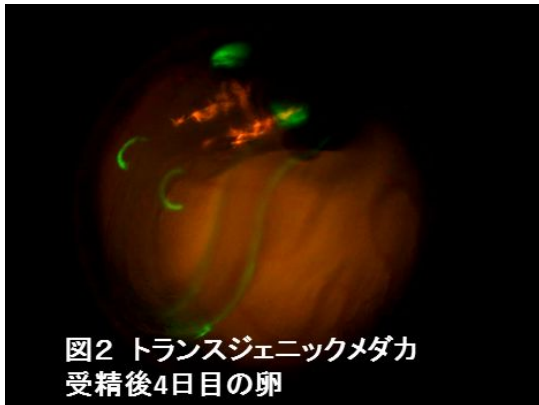


図2 トランスジェニックメダカ受精後4日目の卵

さらに生殖系列に移行するトランスジェニックメダカが3系統得られた(第一世代 F1)。この中で GFP の蛍光強度が比較的強いものを選択し、野生型メダカと交配させ F2 を得た。

(4) マウス Fra-1 がメダカで発現していることを直接調べるために、受精後およそ8日後に孵化した直後の対照メダカおよび Fra-1 メダカを回収し、定量 RT-PCR および、ウエスタンブロット法の両方でマウス Fra-1 の発現が確認された。

(5) Fra-1 のメダカ骨格形態への影響の解析するために、Fra-1 メダカを Alizarin complexone を用いて生体染色したところ、骨格形態の異常はなく、石灰化が低下していた。このことは、マウスでの石灰化低下の現象と矛盾しない。さらに、小動物用マイクロ CT 装置により、骨格形態には異常がなく、石灰化が低下していることを確認した(図3)。



図3 マイクロCTによる骨格の解析

(6)メダカでの Fra-1 標的遺伝子の解析を行

った。Fra-1 メダカでは、マウス Fra-1 が転写因子としてメダカ DNA に結合し、骨形成や骨の石灰化に関連する遺伝子群の発現制御を行なっていると予測されるが、標的遺伝子は明らかでない。そこで、マウス Fra-1 がマウスにおいて発現を制御する遺伝子のメダカオルソログを検索し、そのメダカオルソログがマウス Fra-1 によりどのように発現パターンが変化するかを、経時的にかつ定量的に解析した。発生段階によって増減があり、対照メダカと Fra-1 メダカで有意な差を示す遺伝子も見出されたが、石灰化の低下の原因になっているかどうかは不明である。すなわち、全身発現性 Fra-1 マウスで発現が上昇する MGP は、Fra-1 メダカでは変化がなく、オステオカルシンの発現は低下していた。分子メカニズムは明らかではないものの、マウス Fra-1 は、メダカでは、石灰化の抑制因子であることが示唆された。

(7) マウス Fra-1 をマウスで全身発現させると骨量が増加する(Jochum et al, Nat Med, 2000)にもかかわらず、Fra-1 をメダカで骨芽細胞特異的に発現させても骨量増加は認められなかった。これは、骨芽細胞自律的には、骨形成促進には至らず、骨芽細胞以外の細胞を介して骨形成促進が起こること、Fra-1 を発現させると、骨芽細胞自律的には、骨のミネラル化が低下するという考えと矛盾しない。

(8) メダカでは軟骨性骨化の存在が報告されておらず、骨化システムの違いは残されている。しかし、本研究から、骨芽細胞自律的な機能と、非自律的な機能とが分離できるという作業仮説をさらに検討することは有意義であると考えられた。

(9) 今後の展望：

全身性 Fra-1 トランスジェニックマウスでは、骨髄腔が埋まるほど骨が増える(Jochum et al, Nat Med, 2000)。しかし、Fra-1 を高発現するマウス骨芽細胞を培養系で分化させても分化促進を示さないし、本研究でも、骨芽細胞特異的な Fra-1 トランスジェニックメダカでは、骨形成は促進されなかった。逆に、いずれの場合も石灰化(ミネラル化)は低下した。

これらことは、Fra-1 による骨形成促進が、メダカでも Fra-1 を全身性に発現させれば、「骨芽細胞非自律的に」再現できる可能性を示唆する。これを実験的に示すために、(マウスやメダカの) Fra-1 を、全身性に発現するトランスジェニックメダカを作製する必要がある。そこで、全身発現性の Beta-actin プロモーター(東工大、川上厚志先生より分与)の下流にマウス Fra-1-T2A-EGFP をつないだトランスジーンを作製し、全身発現性マウス Fra-1 メダカを作成する準備を進めている。これによって、骨芽細胞以外の細胞を標

的に骨を増やす新たな原理が見出される可能性がある。

一方で、Fra-1 の発現を介してミネラル化を抑制する分子機構が、マウスだけでなく、魚類でも働いていることが、本研究で示唆された。今後、Fra-1 を欠損するマウスでは石灰化の亢進が認められるかどうかなどを解析したい。これによって、異所性石灰化を含む、好ましくない石灰化を抑制する原理の発見につながることを期待される。

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 1 件)

松尾光一 (2013) 石灰化機序とその調節機構 Mechanism and regulation of bone mineralization. Clin. Calcium 23 (10), 1463-1467. doi: CliCa131014631467 (査読なし)

〔学会発表〕(計 5 件)

Ichiro Takada, Nobuhito Nango, Yoshihiro Takeda, Atsushi Momose, Yoshiaki Kubota, Sho Kanzaki, Kouji Shimoda, Yasunari Takada, Latifa Bakiri, Erwin Wagner and Koichi Matsuo. Pericapillary Bone Formation by Mural Osteoblasts during Endochondral Ossification. (Poster) 35th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, October 4-7, 2013, Baltimore, Maryland, USA.

Matsumoto, T., Takada, Y., Nakamura, T., Suematsu, M., Inohaya, K., Kudo, A., Shimizu, A. and Matsuo, K. Impaired Bone Mineralization In Transgenic Medaka Fish Expressing Fra-1 In Osteoblasts. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research. 2013年05月28日~2013年6月1日(神戸)

松尾光一(招待講演) バイオミネラル化:細胞からマルチスケールへ. 第12回松本ボーンフォーラム. 2013年5月17-18日(長野)

Matsumoto, T., Takada, Y., Nakamura, T., Suematsu, M., Inohaya, K., Kudo, A., Shimizu, A., and Matsuo, K. (英語口演) Transgenic expression of mouse Fra-1 in osteoblasts reduces bone mineralization in medaka fish. 小型魚類研究会(第18回). 2012年9月22-23日(京都)

〔図書〕(計 1 件)

松尾光一(2013)破骨細胞分化と活性化メカニズム。骨研究最前線 ~代謝・疾病のメカニズムから再生医療・創薬・リハビリ機器・機能性食品開発まで~』(株)エヌ・ティー・エス, 29-35.

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾 光一(MATSUO, Koichi)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 40229422

(2)研究分担者

高田 康成(TAKADA, Yasunari)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 40407086
(平成24年度まで研究分担者)

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

松本 朋弘(MATSUMOTO, Tomohiro)
東海大学・医学部・学生