

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15682

研究課題名(和文)真に骨細胞特異的なCre発現マウスの樹立

研究課題名(英文)Generation of osteocyte-specific Cre mouse

研究代表者

林 幹人(Hayashi, Mikihiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50581914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨構成細胞の大部分を占める骨細胞は、骨の恒常性のみならず、全身の臓器に影響を有する内分泌性の細胞であるという認識が広まりつつある。これまで、骨細胞特異的な遺伝子欠損マウス作製のためのCreマウスとしてはDmp1-Creが使用されてきたが、Dmp1-Creは骨細胞だけでなくその前駆細胞である後期骨芽細胞や、筋細胞、脳の一部の細胞、消化管の間葉系細胞の一部などでもCreが発現してしまうことが指摘されている。本研究では、骨細胞分化過程や、頭蓋骨Dmp1陽性・陰性細胞画分のトランスクリプトーム解析などにより、骨細胞に局限して発現する遺伝子を同定し、真に骨細胞特異的なCre発現マウスの樹立を行った。

研究成果の概要(英文)：Growing evidences suggest that osteocytes, which constitute a considerable fraction of bone cells, play a key role not only in the regulation of bone homeostasis, but also in the maintenance of whole body as an endocrine cell. Currently, Dmp1-Cre transgenic mice are widely used as an osteocyte-specific Cre mouse line to achieve osteocyte-specific gene deletion. However, recent reports suggest that Dmp1-Cre is also expressed in mature osteoblasts, muscle, certain brain cells, gastric and intestinal mesenchymal cells, as well as osteocytes. In this study, by performing transcriptomic analysis of osteoblastogenesis/osteocytogenesis and Dmp1-positive/negative calvarial cells derived from Dmp1-Cre CAG-CAT-EGFP mice, we identified the gene which exclusively expressed in osteocytes and generated truly osteocyte-specific Cre mice.

研究分野：骨代謝学

キーワード：Creマウス 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨は単なるカルシウムの塊ではなく、様々な種類の細胞によって構成されている。近年、その構成細胞の大部分を占める骨細胞が骨代謝制御にとどまらず、さまざまな液性因子を分泌することで全身の多様な臓器の機能などを制御する内分泌性の器官であることが明らかになりつつある。しかしながら、細胞の機能解析を生体レベルで実行するために必要不可欠なツールである骨細胞特異的 Cre 発現マウスは必ずしも特異性が高いとはいえないのが現状であった。

2. 研究の目的

骨細胞に発現する特定の遺伝子の生体内での機能を調べるためには Cre-loxP システムによるコンディショナル欠損マウスの作製が必要不可欠であるが、最近、これまで骨細胞特異的 Cre 発現マウスとして使用されてきた 10 kb Dmp1-Cre マウスの Cre 発現が Ai9 レポーターマウスを用いて調べられたところ、骨細胞だけでなくその前駆細胞である後期骨芽細胞でも発現することが示された (Kalajzic et al., Bone. 2013、Lim et al., Bone Res. 2017)。また、筋細胞や、脳の一部の細胞、消化管の間葉系細胞の一部などでも発現してしまう可能性も示されており、これまでの骨細胞特異的遺伝子欠損マウスで得られた解析結果は骨細胞以外の細胞でも遺伝子が欠損してしまった影響である可能性が残されている。その他にも 8 kb Dmp1-Cre や Sost-Cre、10 kb Dmp1-CreERT2 マウスなどが作製されているが、いずれも骨細胞にのみ特異的とはいえず、より特異的な Cre 発現マウスの樹立が課題であった。

我々は 10 kb Dmp1-Cre と CAG-CAT-EGFP を用いた骨細胞の単離培養系を確立し (Nakashima et al., Nat Med. 2011)、骨細胞・後期骨芽細胞を高純度で精製する技術

を有していることから、これら細胞集団の網羅的解析によって骨細胞特異的に発現する遺伝子を絞り込んだ。さらに、骨細胞単離培養系から得られた骨芽細胞から骨細胞への分化過程のトランスクリプトーム・プロテオーム解析と他臓器での発現データベース解析も併せ、全身でも骨細胞に限局して発現する遺伝子を同定し、真に骨細胞特異的な Cre 発現マウスの樹立を目的とした。

3. 研究の方法

以下の3点の研究計画を実施した。

(1) 骨細胞特異的発現遺伝子の絞り込み
骨細胞は硬い骨基質中に存在するという特性から、初代培養系の確立が困難であった。申請者らは、Dmp1-Cre マウスと CAG-CAT-EGFP マウスを交配することで、骨細胞・後期骨芽細胞でのみ EGFP 陽性となるマウスを樹立し、骨の酵素処理とフローサイトメーターにより当該細胞の単離培養に成功しており、本研究ではこのマウスを用い、骨組織から骨芽前駆細胞・前期骨芽細胞 (EGFP 陰性) と骨細胞・後期骨芽細胞 (EGFP 陽性) をフローサイトメーターによって分取し、それぞれの細胞から RNA 回収後、トランスクリプトーム解析を行った。また、通常の in vitro 骨芽細胞培養系から得られた細胞のトランスクリプトーム解析も並行して行った。

また、骨組織だけでなく、他の組織や発生過程でも発現していない遺伝子を選出するため、NCBI EST や BioGPS などの公共データベースを検索し、骨細胞・骨組織特異的な発現を示す遺伝子を絞り込んだ。

(2) ノックインによる Cre 発現マウスの樹立

これまで、多くの Cre 発現マウスは単純に発現ベクターを受精卵に注入して得られるトランスジェニックマウスとして樹立され

てきたが、この方法では染色体挿入部位やコピー数の影響を受けるため、想定していないような異常を示したり、発現特異性が本来の内因性発現パターンと異なってしまったり、逆に発現量不足になってしまうことがあった。そこで、本研究では内在遺伝子プロモーターを利用し、プロモーター領域直後に Cre 遺伝子をノックインする方法でマウスを作製した。

(3) 樹立された Cre 発現マウスの特異性の確認

上記方法により樹立したマウスを CAG-CAT-EGFP マウスや Ai9 マウスなどのレポーターマウスと交配し、蛍光によって Cre 発現の骨細胞特異性を確認した。Cre リコンビナーゼによって EGFP や tdTomato 発現が誘導され、骨細胞特異的に蛍光を発するかどうかを凍結切片作製により観察した。また、骨の連続的酵素処理によって得られた骨細胞画分における Cre 遺伝子発現や EGFP、tdTomato 遺伝子発現を qPCR によって確認し、骨細胞での Cre 発現特異性を担保した。

4 . 研究成果

Dmp1-Cre+ CAG-CAT-EGFP+マウス頭蓋骨由来の EGFP 陽性細胞と陰性細胞のトランスクリプトーム解析を実行し、数個の候補遺伝子が選出された。これらの候補遺伝子は骨芽細胞培養 0 日目と比較して、7 日目でも発現は 2 倍以下だが、EGFP 陽性細胞では非常に高く発現している。この結果は、骨芽細胞分化過程における Dmp1 遺伝子発現とは対照的で、Dmp1 は骨芽細胞分化培養 7 日目で既に 5 倍以上の上昇を示す一方、候補遺伝子は 1 . 5 倍以下であることから、分化後期の骨芽細胞での発現も低く保たれていると考えられる。

さらに、全身臓器の発現パターンを公共データベースで検索することで候補遺伝子の

絞り込みを行い、非常に骨組織特異性が高い候補 X を同定した。内在遺伝子プロモーターを利用し、当該骨細胞特異的発現遺伝子 X プロモーター領域後に Cre 遺伝子をノックインする方法でマウスを作製し、C57BL6/J マウスにバッククロスを行い、さらに CAG-CAT-EGFP マウスや Ai9 マウスなどのレポーターマウスと交配した。これらのマウス大腿骨を採取し、Cre 発現の特異性を確認した。

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)

林幹人、中島友紀、セマフォリンシグナルによる骨リモデリング制御、THE BONE、査読無、30、2016、151-156

[学会発表](計 2 件)

井上綾乃、林幹人、中島友紀、骨芽細胞系細胞における Sema3A の発現制御機構、第 33 回日本骨代謝学会学術集会、2015 年 7 月 25 日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)
林幹人、中島友紀、高柳広、骨細胞が産生する Sema3A による骨代謝制御、第 1 回日本骨免疫学会、2015 年 7 月 1 日、ホテルブリーズベイマリーナ(沖縄県・宮古島市)

[図書](計 1 件)

Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Hiroshi Takayanagi、Springer Japan、Semaphorins: A Diversity of Emerging Physiological and Pathological Activities Semaphorins in Bone Homeostasis、2015、159-173

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

()

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 幹人 (HAYASHI, Mikihito)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教
研究者番号：50581914

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者