

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20422

研究課題名(和文) Sp7による骨の血管新生制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of angiogenesis in bone by Sp7

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨は骨芽細胞によって形成されるが、骨芽細胞は、骨内膜、骨外膜及び骨内の血管周囲に存在し、骨形成を行う。骨芽細胞が骨に取り込まれて骨細胞になるが、骨細胞は、骨内の血管から酸素や栄養を供給される。したがって、骨での血管新生は、骨形成及び骨細胞の生存に必須である。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。骨芽細胞特異的Sp7 トランスジェニック(tg)マウスでは、骨芽細胞の成熟が阻害され、骨量の減少が認められた。さらに、Sp7 tgマウスでは、血管腔体積の有意な増加及びVegfa発現の増加が認められ、骨芽細胞でSp7とVegfaは共発現していた。

研究成果の概要(英文)：Bone is formed by osteoblasts. Osteoblasts locate in the endosteum, periosteum, and around the blood vessels in bone. Osteoblasts become osteocytes after embedding into bone, and blood vessels in bone supply oxygen and nutrient to osteocytes. Therefore, angiogenesis in bone is essential for bone formation and the survival of osteocytes. Sp7, which is regulated by Runx2, is an essential transcription factor for osteoblast differentiation. Osteoblast-specific Sp7 transgenic mice showed osteopenia due to the impaired osteoblast maturation. Further, the volume of blood vessels in bone and Vegfa expression were significantly increased in Sp7 transgenic mice. Sp7 and Vegfa were co-expressed in osteoblasts.

研究分野：骨代謝学

キーワード：Sp7 血管新生 Vegfa 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化し、骨形成を行うが、骨芽細胞は、骨内膜、骨外膜及び骨内の血管周囲に存在し、骨基質タンパク質の産生を行っている。さらに、骨芽細胞が骨に取り込まれて骨細胞になるが、骨細胞は、骨内の血管から酸素や栄養を供給される。したがって、骨での血管新生は、骨形成及び骨細胞の生存に必須である。骨芽細胞分化には、Runx2、Sp7、Wnt シグナル、及びヘッジホグシグナルが必須である。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。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。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。

我々は、Sp7 の骨芽細胞での機能を明らかにするために、2.3 kb Col1a1 プロモーターを用いて、骨芽細胞特異的 Sp7 トランスジェニック (tg) マウスを作製した。Sp7 tg マウスでは、骨芽細胞の成熟が阻害され、未熟骨芽細胞によって未熟な骨が形成され、骨量の減少及び易骨折性が認められた。面白いことに、Sp7 tg マウスでは、皮質骨の組織切片において、多くの血管が観察された。これは、抗 CD34 抗体を用いた免疫組織染色で血管内皮を描出させることで確認した。皮質骨内の血管の増加は、透過電顕像、走査電顕像でも観察された。そこで、血管新生で重要な役割を果たす Vegfa の発現を、まず野生型マウスで抗 Vegfa 抗体を用いた免疫組織化学で調べたが、骨芽細胞に強く、血管内皮細胞に弱く発現していた。したがって、骨における主な Vegfa 発現細胞は骨芽細胞であることが明らかとなった。さらに、野生型マウスと Sp7 tg マウスの骨芽細胞と比べると、Sp7 tg マウスの骨芽細胞により強い発現を認めた。次に Western blot 解析で野生型マウスと比較したところ、Sp7 tg マウスで Vegfa の強い発現が検出された。したがって、Sp7 が Vegfa を誘導し、血管新生を促進させる可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

(1) Sp7^{fl/fl}GFP-Cre マウスを作製・解析し、Sp7 が骨での生理的な血管新生に関与するかを明らかにする。

① 2.3 kb I 型コラーゲン (Col1a1) プロモーターを用い、十分な発現レベルの Cre トランスジェニックマウスを作製する。この場合、Cre 発現細胞を GFP で特定できるように、green fluorescent protein (GFP)-Cre の融合蛋白質を高発現する (GFP-Cre) マウスを作製する。

このマウスと Sp7^{fl/fl} マウスを交配し、Sp7^{fl/fl} GFP-Cre マウスを作製し、その表現型を解析する。

② 野生型マウス、Sp7 tg マウスおよび Sp7^{fl/fl} GFP-Cre マウスの皮質骨中の血管腔体積を定量し、Sp7 発現と血管新生が相関するか明らかにする。

③ 野生型マウスで、Sp7 と Vegfa が同一の骨芽細胞に発現しているか明らかにする。

④ レポーターアッセイにより Sp7 が Vegfa 遺伝子を活性化できるか、ChIP アッセイにより、Sp7 が Vegfa プロモーター領域に結合しているか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Sp7^{fl/fl}GFP-Cre マウスの作製

Cre 発現レベル及び発現細胞を GFP で特定できるように、GFP-Cre の融合蛋白質を高発現する GFP-Cre マウスを作製した。このマウスが骨芽細胞特異的に発現することを、凍結切片で GFP を観察することにより確認した。次に、2.3kb Col1a1 プロモーター-GFP-Cre tg マウスを Sp7^{fl/fl} マウスと交配し、Sp7^{fl/fl} GFP-Cre マウスを作製した。

(2) Sp7^{fl/fl}GFP-Cre マウスの解析

10 週齢の Sp7^{fl/fl} マウス及び Sp7^{fl/fl} GFP-Cre マウスで、マイクロ CT 解析を行った。また、Sp7^{fl/fl} マウス及び Sp7^{fl/fl} GFP-Cre マウスの大腿骨の骨芽細胞分画から RNA を抽出、リアルタイム RT-PCR で骨芽細胞マーカー遺伝子発現を比較した。

(3) 高解像度マイクロ CT 解析

これまで、皮質骨内の血管腔をリガクのマイクロ CT (最高分解能 10 μm) で解析を試みたが、皮質骨内に入り込んだ骨髓腔と区別することが困難であった。そこで、東陽テクニカの SkyScan 1272 (最高分解能 350nm) を用いて血管腔の描出を試みた。野生型マウス、Sp7 tg マウスおよび Sp7^{fl/fl}GFP-Cre マウスの大腿骨骨幹部で、30 μm 以下の管腔を描出し、その体積を定量、比較した。

(4) Sp7 と Vegfa の免疫組織化学

パラホルムアルデヒド固定した野生型マウスの大腿骨パラフィン切片を用いて、抗 Sp7 抗体 (核に染色) と抗 Vegfa 抗体 (細胞質に染色) で、2重免疫組織染色を行った。

(5) レポーターおよび ChIP 解析

① Vegfa プロモーター領域を用いたレポーターベクターと Sp7 発現ベクターを野生型マウス由来初代培養骨芽細胞に導入し、Sp7 が Vegfa プロモーターを活性化できるか検討した。

②野生型マウス由来初代培養骨芽細胞をホルムアルデヒドで固定、超音波破碎装置でDNAを断片化後、抗Sp7抗体で免疫沈降し、沈降したDNAを、Vegfa遺伝子領域でSp7の結合配列のある部位をPCRで増幅した。

4. 研究成果

(1) Sp7^{f1/f1}GFP-Cre マウスの作製

2.3kb Coll1a1 プロモーター-GFP-Cre tg マウスの作製では、GFPを強発現するF0マウスを選択し、系統を樹立した。しかし、最初に樹立した系統では、骨芽細胞に加えて精子にも発現し、Sp7^{f1/f1}マウスと交配後、germline koマウスとなったため、Creマウスとして使用できなかった。次に樹立した系統では、骨芽細胞特異的に発現したが、兄弟間でGFPの発現レベルが一定せず、トランスジーンが複数挿入されていると考えられた。2.3kb Coll1a1 プロモーター-GFP-Cre tg マウスのゲノムシークエンスにより、兄弟間での発現レベルの差が生じる原因を探索したが、ゲノムへの挿入箇所は1箇所であった。そこでdigital PCRによってトランスジーンの各部位のコピー数を定量したが、プロモーター領域のDNA断片が多コピー挿入されたマウスで発現が低下していることがわかった。この多コピーのDNA断片は、継代中に欠失していき、一定した発現が得られる系統を樹立することができたが、多大の時間を要した。最終的には、骨芽細胞特異的にGFP-Creを安定的に高発現するGFP-Cre tg マウスの作製に成功した。このマウスとSp7^{f1/f1}マウスと交配、最終的にSp7^{f1/f1}GFP-Cre マウスを作製することができた。

(2) Sp7^{f1/f1}GFP-Cre マウスの解析

マイクロCT解析では、海綿骨量では有意差を認めなかったが、皮質骨の骨密度が、Sp7^{f1/f1}マウスに比較し、Sp7^{f1/f1}GFP-Creマウスで低下していた。骨芽細胞分画のRNAを用いたリアルタイムRT-PCRでは、骨芽細胞マーカーの遺伝子発現に差を認めなかった。

(3) 高解像度マイクロCT解析

15週齢の野生型マウスとSp7 tgマウスで、SkyScan 1272で血管腔体積を定量した。Sp7 tgマウスで有意に血管腔体積の増加が認められた。9週齢のSp7f1/f1マウスとSp7f1/f1GFP-Creマウスの血管腔体積の比較を現在行っている。

(4) Sp7とVegfaの免疫組織化学

1週齢の野生型マウスの大腿骨切片を用いて、抗Sp7抗体と抗Vegfa抗体を用いて、2重免疫組織染色を行った。Sp7を発現する骨芽細胞でVegfaの発現が認められた。

(5) レポーターおよびChIP解析

初期培養骨芽細胞で、1.3 kb及び2 kbのVegfaプロモーターを用いたレポーターアッ

セイでは、Sp7発現ベクターの導入で、レポーター活性の上昇は認めなかった。また、Sp7抗体を用いたChIP解析でも現在のところ、Sp7のVegfaプロモーター領域での結合を検出できていない。両者ともに、さらに領域を広げて検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ①Jiang Q, Qin X, Kawane T, Matsuo Y, Taniuchi I, Komori H, Ito K, Izumi S, Komori T: Cbfb2 isoform dominates more potent Cbfb1 and is required for skeletal development. J Bone Miner Res. 査読有, 31(7):1391-404, 2016.
DOI: 10.1002/jbmr.2814.

[学会発表] (計1件)

- ①姜晴, 秦昕, 小守寿人, 松尾友紀, 宮崎敏博, 森石武史, 小守壽文: Cbfb1とCbfb2アイソフォームは骨格形成過程において重要な役割を果たす, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016.

[図書] (計0件)

[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

http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/k_aibou-2/index.html

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし