

平成 21年 5月 19日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791344

研究課題名 (和文)

骨芽細胞分化における転写因子 Hand2 の作用の解析

研究課題名 (英文)

Role of Hand2 in osteoblast differentiation

研究代表者

阿部 真土 (ABE MAKOTO)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40448105

研究成果の概要：

詳細な Hand2 遺伝子の発現様式の解析から、本因子は骨格形成初期には骨芽細胞に発現し、軟骨細胞には発現しない事がわかった。初代骨芽細胞の分化に対する Hand2 の作用は見出せなかったが、軟骨初期分化に対して強力な抑制作用が認められた。さらに、Hand2 を軟骨細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作成しこれを解析した結果、椎骨、頭蓋底、四肢における軟骨の無形成、低形成、また成熟の遅延など内軟骨骨化の異常などが認められた。

交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,600,000 | 0       | 1,600,000 |
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 480,000 | 3,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学・頭蓋顔面形成・転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

Hand2 はマウス初期発生において必須の転写因子である。四肢においては前後軸形成に必須の役割を持つことが既に報告されている。四肢骨格の細胞分化における作用も持つことが予想はされていたが、実際に証明されてはならず、またその際どの細胞に Hand2 が作用を及ぼすかは全く不明である。

## 2. 研究の目的

- (1) Hand2 の遺伝子発現を他の細胞分化マーカーと詳細に比較検討する。
- (2) Hand2 を骨芽細胞、軟骨細胞に過剰発現させ分化への影響を検討する。
- (3) Hand2 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作成し表現型を詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

- (1) 胎生期のマウス四肢、鰓弓における Hand2 の遺伝子発現を in situ hybridization 法を用いて検索する。同時に骨芽細胞、ならびに

軟骨細胞分化マーカーの遺伝子発現を同様の方法で検索し、Hand2 の発現部位と比較する。

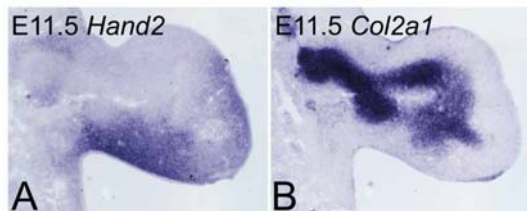
(2) Hand2 を産生するアデノウイルスを作成し頭蓋冠より調整した初代骨芽細胞、骨芽細胞株 MC3T3E1、胎生マウス肢芽より調製した細胞を用いた高密度培養系に感染させ作用を解析する。

(3) Hand2 を適当なエンハンサーを用いてマウス胎仔の特異的な部位にこれを強制発現するトランスジェニックマウスを作成し表現型を解析する。

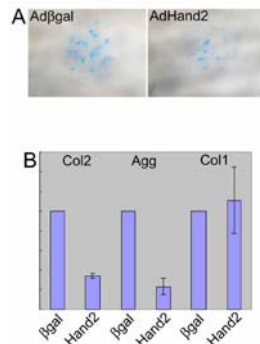
#### 4. 研究成果

(1) Hand2 は胎生 11 日以降に鰓弓、肢芽において軟骨細胞の分化する部位を避けるように発現が認められた。また、軟骨分化がさらに進んだ時期になると前肥大軟骨細胞層、ならびに軟骨膜に発現が認められた。

(下図説明) 胎生 11.5 日齢マウス胎仔前肢芽における Hand2 (左) および 2 型コラーゲン (右; Col2a1) の遺伝子発現を *in situ* hybridization 法にて検出したもの。濃く青紫色に染色されている部位が遺伝子発現の認められる領域である。Hand2 の発現は前肢芽の後縁、前縁に認められる。Hand2 の発現領域に囲まれるように 2 型コラーゲンの発現が認められる。



(2) 骨芽細胞に Hand2 を過剰発現させることで分化に対する影響は解析した範囲では認めなかった。しかし、胎生期マウス四肢由来の細胞を用いた高密度培養系に Hand2 を過剰発現させると 2 型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨特異的因子の発現を強く抑制した。また、軟骨初期分化を抑制する古典的 Wnt の経路を活性化することで Hand2 の発現が誘導された。

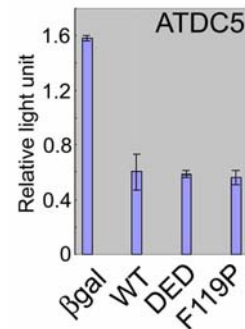


(右図説明) A: 胎生 11.5 日齢マウス胎仔肢芽より調整した細

胞を高密度培養すると培養日数の経過とともに軟骨の凝集が認められるようになる。この培養系にコントロール ( $\beta$  Gal) および Hand2 を産生するアデノウイルスを感染させ 4 日間培養した。その後、軟骨凝集の検出をアルシアンブルー染色により行った。軟骨凝集の部位は青く染色されるが、Hand2 により軟骨への分化が抑制されている。

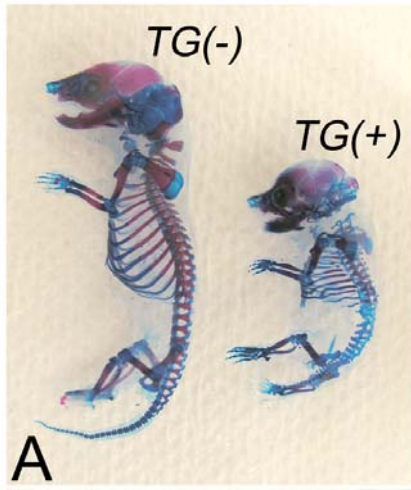
B: 同様の培養、感染を行った後トータル RNA を精製後、定量 RT-PCR を行ったもの。Hand2 により軟骨に発現する 2 型コラーゲン (Col2) やアグリカン (Agg) がコントロールに比べ大きく低下していることが認められる。一方、広範に間葉系に発現する 1 型コラーゲン (Col1) の発現はコントロールに比して Hand2 感染による変化は認めない。

(3) Hand2 は bHLH 型転写因子であり、分子内にある HLH domain でヘテロあるいはホモダイマーを形成し、basic region で DNA に結合することで作用を発揮する。HLH domain に変異を導入したクローン (F119P) や basic region に変異を導入したクローン (DED) は bHLH 型転写因子としての Hand2 の作用を持つことができない。ところが、2 型コラーゲンのエンハンサーを用いたレポーターに対する野生型、各変異型の Hand2 は変化がなく Hand2 の軟骨分化抑制のメカニズムは Hand2 の bHLH 型転写因子としての作用以外のメカニズムで起こることが示唆された。

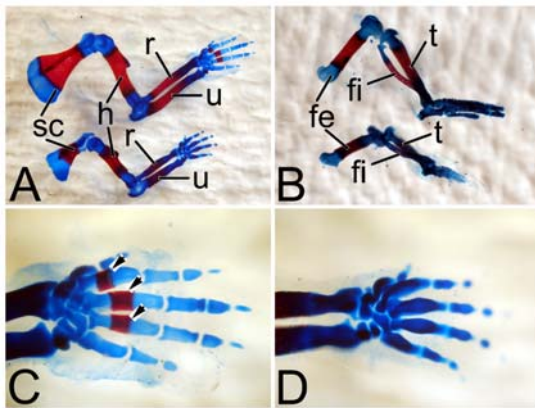


(右図説明) マウス 2 型コラーゲンの発現制御領域を用いたレポーターコンストラクトに対する Hand2 の作用を調べたもの。野生型 Hand2 (WT) によりコントロール ( $\beta$  Gal) に比べ約 70% のレポーター活性の低下が認められる。いずれの変異型 Hand2 (DED、F119P) を用いても野生型同様に約 70% のレポーター活性の低下が認められる。

(4) 2 型コラーゲンの発現制御領域の配列を利用し軟骨特異的に Hand2 を過剰に発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスは生後すぐに重篤な骨格形成異常のため大部分の個体は致死となった。異所性に Hand2 を発現するマウスは体幹部、四肢、頭蓋顔面骨格の発生、分化に異常が認められた。



(上図説明) 軟骨特異的に Hand2 を過剰発現させたトランスジェニックマウスの胎生 17.5 日齢胎仔をアリザリンレッド/アルシアンブルーにて骨格染色したもの。軟骨は青く、石灰化部位は赤く染色される。左が同腹の野生型胎仔 (TG(-))、右がトランスジェニックマウス胎仔 (TG(+))。頭部の形成は野生型に比べてトランスジェニックマウスではやや小さくなり前頭部がドーム型に変形している。また、頭殿長が野生型に比べ著しく短くなっている。さらに、脊椎の石灰化の程度がトランスジェニックマウス胎仔では低くなっている。



(上図説明) 野生型およびトランスジェニックマウス胎仔の骨格染色像。(A) 野生型 (上) およびトランスジェニック (下) マウス胎仔の上肢を取り出したもの。各骨格要素において野生型に比べてトランスジェニックマウス胎仔のほうが小さい。sc: 肩甲骨、h: 上腕骨、r: とう骨、u: 尺骨。(B) 野生型 (上) およびトランスジェニック (下) マウス胎仔の下肢を取り出したもの。上肢と同様、各骨格構成要素が野生型に比べてトランスジェニックマウス胎仔のほうが小さい。fe: 大腿

骨、fi: ひ骨、t: 脛骨。(C、D) 指骨部の拡大したもの。野生型 (C) および同腹のトランスジェニック (D) マウス胎仔。指形成のパターニングの異常はトランスジェニックマウス胎仔で認めないが、サイズの矮小化、ならびに石灰化部位の欠失 (C において認められる石灰化部位 (矢頭) が D においては全く認められない)。が顕著である。

#### 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 2 件)

(1) Abe M., Maeda T. and Wakisaka S. Retinoic acid affects craniofacial patterning by changing Fgf8 expression in the pharyngeal ectoderm. *Dev. Growth. Differ.* 50, p717-29, 2008, 査読有。

(2) Abe M., Inagaki S., Furuyama T., Iwamoto M. and Wakisaka S. Semaphorin 4D inhibits collagen synthesis of rat pulp-derived cells. *Arch. Oral Biol.* 53, p27-34, 2008 査読有。

[学会発表] (計 4 件)

(1) 阿部真土、道上郁美、福士暁也 「レチノイン酸は頭蓋底 synchondrosis の分化を制御する」 第 26 回 日本骨代謝学会学術集会 10/29-31/2008 (2008) 大阪国際会議場、大阪

(2) 阿部真土、道上郁美、大嶋隆、脇坂聡 「bHLH 型転写因子 Hand2 は軟骨分化を抑制する」 第 50 回 歯科基礎医学会学術大会 9/23-25/2008 TOC 有明コンベンションホール、東京

(3) 道上郁美、阿部真土、大嶋隆、脇坂聡 「レチノイン酸は頭蓋底軟骨成長板の分化を制御する」 第 50 回 歯科基礎医学会学術大会 9 月 23 日-25 日 (2008) TOC 有明コンベンションホール、東京

(4) Abe M. Down regulation of Hand2 level in the pharyngeal arches induce ectopic cartilage formation and contribute to craniofacial defects. 21<sup>st</sup> Century COE Program Symposium 2007 Japan-Korea International Symposium. 2/1/2008, Osaka, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 真土 (ABE MAKOTO)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40448105

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：