

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09891

研究課題名(和文) rRNA合成の調節因子Nopp140の骨格形成における役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of Nopp140, a regulator of rRNA biosynthesis, in skeletal formation

研究代表者

松裏 恵子 (Matsuura, Keiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・特別研究員

研究者番号：20770423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Runx2<sup>-/-</sup>マウス由来初代軟骨細胞でRunx2の標的遺伝子を探したところ、Runx2がNopp140の発現を高めることがわかった。Nopp140の軟骨細胞における機能を明らかにするため、Co2a1プロモーターを用いて、軟骨細胞特異的にNopp140のtgマウスの作製による機能解析より、軟骨細胞の増殖は低下し、肥大化は促進されていると考えられた。そこで、Nopp140生理的機能を調べるために、昨年度はCRISPR/Cas9のシステムを用いてNopp140のgermline knockoutマウス及びNopp140 floxマウスの作製に成功し、表現型解析が行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nopp140は、骨・軟骨においては全く未知のタンパク質であり、その機能解明は独自性の極めて高い研究である。また、軟骨細胞・骨芽細胞の増殖・分化・アポトーシスの新たなシグナル経路の発見につながる独創性の高い研究である。

研究成果の概要(英文)：Searching for Runx2 target genes in primary chondrocytes derived from Runx2<sup>-/-</sup> mice, we found that Runx2 up-regulated Nopp140 expression. In order to clarify the function of Nopp140 in chondrocytes, functional analysis was performed by generating chondrocyte-specific Nopp140 tg mice using the Co2a1 promoter, and it was thought that chondrocyte proliferation was reduced and hypertrophy was promoted. Therefore, in order to investigate the physiological functions of Nopp140, last year we succeeded in generating Nopp140 germline knockout mice and Nopp140 flox mice using the CRISPR/Cas9 system, and we conducted phenotypic analysis.

研究分野：分子硬組織生物学

キーワード：Runx2 Nopp140 軟骨細胞 増殖 分化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Runx2 は骨芽細胞分化および軟骨細胞後期分化に必須な転写因子である。Runx2<sup>-/-</sup>マウス由来初代軟骨細胞および Runx2<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>マウス由来軟骨細胞株に Runx2 を導入、Runx2 のターゲット遺伝子を探索、Nopp140 を同定した。Nopp140 タンパク質は、折りたたまれた立体構造を取らない intrinsically disordered proteins (IDPs) の典型例である。IDPs は DNA、RNA、タンパク質と相互作用できるいくつかのモチーフを持っている。核小体、カハール体 (small nuclear RNA に富んだ核内小器官)、細胞質を移動し、リボソーム合成への関与が報告されている。また細胞分裂や細胞増殖・分化、アポトーシス等様々な細胞動態を制御するセリン・スレオニンキナーゼ casein kinase 2 (CK2) と相互作用し、その働きを抑制すると報告されている。Nopp140 の軟骨細胞や骨芽細胞での報告は全くなく、Runx2 による制御の報告もない。一方、CK2 は、Ia 型 bone morphogenetic protein レセプター (BMPRIa) に結合し、BMP シグナルを抑制する。CK2 阻害剤あるいは CK2 の BMPRIa への結合を阻害するペプチドは、軟骨細胞・骨芽細胞分化を促進すると報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、軟骨細胞・骨芽細胞の増殖・分化・アポトーシスにおける Nopp140 の機能を解明することを目的とする。具体的には、以下のことを期間内に明らかにする。1) Nopp140 Tg マウスの軟骨細胞の増殖・分化・アポトーシスの動態を詳細に明らかにする。2) Nopp140 の germline knockout (ko) マウス、Dermo1 Cre を用いて軟骨細胞と骨芽細胞の前駆細胞で Nopp140 を欠失させる conditional ko (cko) マウスを作製、Nopp140 の骨格形成における役割、特に軟骨細胞・骨芽細胞の増殖・分化・アポトーシスにおける生理的機能を明らかにする。3) Nopp140 の tg, ko, cko マウスの異常がリボソーム生合成異常によるか、CK2 の抑制によるか、あるいはその他の機構によるかマイクロアレイ解析を含めて明らかにする。

### 3. 研究の方法

令和2年度

#### I. Nopp140 tg マウスの解析

- 1) 母体に BrdU を注射し、胎生 15.5 日で組織切片を作成、BrdU 染色を行い、増殖細胞を定量する。
- 2) Col2a1, Ihh, Col10a1, osteopontin プロローベを用いた in situ hybridization を行い、軟骨細胞分化を調べる。
- 3) TUNEL 染色によりアポトーシスの頻度を定量する。

II. Nopp140 の germline ko マウス、Nopp140 flox マウス、Dermo1 Cre Nopp140<sup>fl/fl</sup> マウスの作製 exon 1 に CRISPR/Cas9 により変異を導入し、germline ko マウスを作製する。また、exon 2 の 5' 側と exon 4 の 3' 側に loxP 配列を CRISPR/Cas9 により導入し、Nopp140 flox マウスを作製する。Nopp140 flox マウスは、全身の軟骨細胞と骨芽細胞の前駆間葉系細胞に Cre を発現する Dermo1 Cre マウスと交配し、Nopp140<sup>fl/flCre</sup> マウスを作製する。

令和3年度

### III. Nopp140 koマウス、Nopp140<sup>fl/flCre</sup>マウスの解析

- 1) リボソーム成熟の最終段階は、28S rRNAなどのリボソームサブユニットがribosomal RNA (rRNA)前駆体からプロセシングされ、細胞質に移行するため、成熟28S rRNAに対する特異抗体(Y10B)を用いた免疫組織染色を行い、Nopp140の欠損がリボソーム合成に影響するか調べる。
- 2) Nopp140 koマウスが胎生15.5日以前で致死の場合は、Nopp140<sup>+/-</sup>マウスを解析する。Nopp140の類似構造を持つ核小体タンパク質Treacle をコードする遺伝子TCOF1のヘテロ変異はTreacher Collins症候群を引き起こす。マウスのTcof1ヘテロ変異では、マウスのバックグラウンドによって胎生致死となるため、Nopp140<sup>+/-</sup>マウスが胎生致死の場合は、ガイドRNAおよびCas9をinjectionする卵の系統を変える。
- 3) Nopp140 koマウス、Nopp140<sup>fl/flCre</sup>マウス共に、胎生15.5日、胎生18.5日で骨格標本を作製する。胎生15.5日、胎生16.5日の四肢で組織切片を作製、H-E染色を行うと共に、Col2a1, Ihh, Col10a1, osteopontin, Col1a1プロローベを用いたin situ hybridizationを行い、軟骨細胞・骨芽細胞分化を調べる。BrdU染色、TUNEL染色で軟骨細胞の増殖・アポトーシスを調べる。さらにRunx2抗体を用いた免疫組織染色を行う。
- 4) 胎生18.5日で頭部の組織切片を作製、H-E染色を行うと共に、Col1a1, osteopontin, osteocalcinプロローベを用いたin situ hybridizationを行い、頭蓋冠での骨芽細胞分化を調べる。BrdU染色、TUNEL染色で骨芽細胞の増殖・アポトーシスを調べる。さらにRunx2抗体を用いた免疫組織染色を行う。

#### 令和4年度

### IV. in vitroでの軟骨細胞、骨芽細胞の増殖・分化・アポトーシス

胎生15.5日の野生型マウス、Nopp140 koマウス、Nopp140<sup>fl/flCre</sup>マウスの四肢より軟骨細胞を採取し、増殖を調べるとともに、マイクロマス培養を行い、軟骨細胞分化をアルシアンブルー染色で評価するとともに、TUNEL染色によりアポトーシスを、RNAを抽出し軟骨細胞分化マーカーの発現を調べる。同様に胎生18.5日の頭蓋冠より骨芽細胞を採取、増殖を調べるとともに、分化培地で培養、アルカリホスファターゼ染色、von Kossa染色を行うと共に、TUNEL染色によりアポトーシスを、RNAを抽出し骨芽細胞分化マーカーの発現を調べる。また、CK2阻害剤を培養液に添加し、CK2の関与を調べる。また、軟骨細胞、骨芽細胞にNopp140を過剰発現させた場合のCK2阻害剤の効果も検討する。

### V. マイクロアレイ解析

野生型マウス、Nopp140 tgマウス、Nopp140 koマウス、Nopp140<sup>fl/flCre</sup>マウスの四肢軟骨、頭蓋冠よりRNAを抽出、マイクロアレイによりNopp140の過剰発現および欠損により発現変動する遺伝子を同定する。階層的クラスタリングによるヒートマップを作成、Gene Ontology (GO)解析を行う。上記のin vivo、in vitro解析の結果とマイクロアレイ解析の結果を合わせて、軟骨細胞・骨芽細胞に対するNopp140の生理的作用のシグナル経路を明らかにし、論文作製する。

## 4. 研究成果

Co2a1プロモーターを用い、軟骨細胞特異的にNopp140を発現させたtgマウスを作製し、軟骨細胞におけるNopp140の機能を調べた。胎生18.5日のtgマウスは野生型(Wt)と比較して、

身体が小さく、四肢が短く、頭部の前後径が短縮していて、ダルマのような外観を呈した。胎生 18.5 日の脛骨の HE 染色では成長板は縦横共に短く、特に静止軟骨細胞層と増殖軟骨細胞層が長軸方向に短縮していた。静止軟骨細胞層では、細胞形態が野生型マウスよりやや大きい細胞が多数認められた。増殖軟骨細胞層の柱状構造は乱れ、柱状構造を取らない軽度肥大化した細胞が増殖軟骨細胞層に見られた。また、成長板全体に細胞密度が低下していた。したがって、Nopp140 tg マウスでは軟骨細胞の増殖は低下し、肥大化は促進されていると考えられた。また、胎生 15.5 日の頭蓋冠と主に軟骨からなる四肢から RNA を抽出、real-time RT-PCR で Nopp140 の発現を調べた。頭蓋冠、軟骨共に発現が認められたが、特に頭蓋冠での発現が強かった。RNA マイクロアレイでより、マウス四肢軟骨、頭蓋冠における発現を網羅的に解析した。さらに、Nopp140 欠失させたマウスを作製し、骨格標本、組織解析、RNA 発現解析等により、生理的役割を明らかとなり、その結果を現在発表すべく準備している。(論文作製中)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuura Viviane K. S. Kawata, Yoshida Carolina Andrea, Komori Hisato, Sakane Chiharu, Yamana Kei, Jiang Qing, Komori Toshihisa	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression of a Constitutively Active Form of Hck in Chondrocytes Activates Wnt and Hedgehog Signaling Pathways, and Induces Chondrocyte Proliferation in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2682 ~ 2682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21082682	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Jiang Qing, Qin Xin, Yoshida Carolina Andrea, Komori Hisato, Yamana Kei, Ohba Shinsuke, Hojo Hironori, Croix Brad St., Kawata-Matsuura Viviane K. S., Komori Toshihisa	4. 巻 21
2. 論文標題 Antxr1, Which is a Target of Runx2, Regulates Chondrocyte Proliferation and Apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2425 ~ 2425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21072425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------