

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592271

研究課題名(和文) 明らかな骨量減少をきたすLima1/EPLIN遺伝子欠損マウスの機能解析

研究課題名(英文) Analysis of Lima1/EPLIN deficient mice which show obvious bone loss

研究代表者

船元 太郎 (Funamoto, Taro)

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：20404452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：可変型遺伝子トラップ法で作製したLima1/EPLINトラップマウスの骨表現型の解析を行った。Lima1/EPLINトラップマウスでは大腿骨の骨強度や骨密度が低下していた。そこで骨組織標本を作製し各種染色を行ったところ骨を形成する骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性の低下や、コラーゲン遺伝子の発現低下を認めた。また、mRNAを抽出し発現量を野生型と比較したところ、BMP2やコラーゲン、オステオカルシンなど骨芽細胞関連の遺伝子の発現低下を認めた。以上からLima1/EPLINは骨芽細胞の分化、機能発現に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the bone phenotype of Lima1/EPLIN trapped mice that were produced by the exchangeable gene trap method. We underwent micro-CT imaging, bone morphometry analysis, bone strength testing, various staining of bone tissue specimens, and realtime PCR analysis. Bone strength and bone density of the femur had decreased in these mice. In the alkaline phosphatase staining of bone tissue specimens, osteoblasts of the gene trapped mice had been reduced its activity. And the signal of type I collagen had been also decreased in comparison with wild type mice in in situ hybridization. Furthermore, realtime PCR revealed that expression levels of the various genes associated to bone formation such as BMP2, Col1a1, and osteocalcin were decreased in the gene trapped mice. From the results of these analysis, it was suggested that Lima1/EPLIN is involved in the differentiation and/or function of osteoblasts.

研究分野：骨代謝

キーワード：Lima1 EPLIN 骨代謝 骨芽細胞 EGTC

1. 研究開始当初の背景

近年『ロコモティブシンドローム』という新しい疾患概念が提唱され一般社会にも浸透しつつある。これは「運動器の障害」によって「要介護」になるリスクの高い状態であるが、本邦で 4700 万人以上とも推計されている。ロコモティブシンドロームは以前からある変形性関節症 (OA) や骨粗鬆症などの疾患も包含する。これら個々の疾患の発症原因はいまだ不明であり、診断時点で予後を判断するまでには至っておらず、根治療法も解明されていない。OA の病期が進行した場合は、多くの場合人工関節置換術が施行され、また骨粗鬆症の病期が進行した場合は、骨折や痛みなどから運動器全般の機能低下から寝たきり状態を余儀なくされ、患者本人のみならず、医療経済にも多大な影響を及ぼしている。これらの病因には多数の因子が関与していることが推察されるが、その因子の一つと考えられている遺伝子について様々な研究が行われているにもかかわらず、素因遺伝子として確立されたものは OA や骨粗鬆症にはいまだ見いだされていない。

近年の分子生物学のめざましい発展により、多くの疾患に遺伝子が関与していることが明らかになってきた。遺伝子の機能の理解にはジーンターゲット法やトラップ法など目的の遺伝子を破壊することで当該遺伝子の機能が明らかになってきた。骨関節疾患や骨軟骨代謝においても例外ではなく、例えば骨芽細胞分化のマスター遺伝子である Runx2 の機能も同法で明らかとなり、その後の骨代謝の理解に大きな貢献を行った。

我々は『可変型遺伝子トラップ法』で作製したトラップマウスラインを『EGTC』に公開している。この『EGTC』に登録されているマウスラインが樹立したクローンにおいて骨・軟骨にトラップした遺伝子の発現がみられるクローンを選別し、ホモ・ヘテロ接合体マウスを作製し表現型をスクリーニングしている。上記遺伝子トラップマウスラインから *Lima1/EPLIN* トラップマウス (図 1) の骨表現型をスクリーニングしたところ、骨量減少、骨強度低下を認め骨代謝に何らかの異常を呈していた (図 2)。

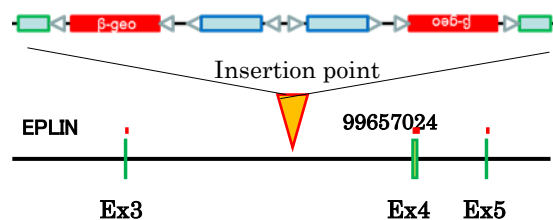


図 1. ベクターインサージョンポイント

2. 研究の目的

本研究の目的は *Lima1/EPLIN* トラップマウスを用いて *Lima1/EPLIN* の骨代謝における機能を解析することである。

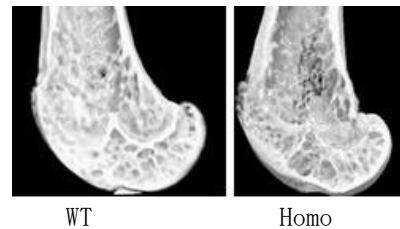


図 2. 大腿骨 3D-マイクロ CT 像

3. 研究の方法

スクリーニングの結果を元に

(1) 野生型マウスを用いたの *Lima1/EPLIN* 発現細胞の解析

野生型マウスの下肢を摘出、膝関節周囲の骨組織の免疫染色を行い *Lima1/EPLIN* の発現細胞を検討した。

(2) 成長段階の骨表現型の評価

4 週、8 週、16 週時点で大腿骨を摘出し、マイクロ CT 像の撮像、骨形態計測を行い、骨強度試験を行った。

(3) *Lima1/EPLIN* トラップマウスを用いた骨軟骨代謝関連遺伝子の発現解析

大腿骨から mRNA を抽出し、リアルタイム PCR 法で各遺伝子の発現解析を行った。BMP2、Runx2、type I collagen、RANKL などの骨代謝に関与する遺伝子群の発現量をリアルタイム PCR にて評価した。これらにより発現量に差があるものについては骨軟骨組織標本作製し種々の染色法、免疫染色、in situ ハイブリダイゼーション法などで確認を行った。

(4) 骨傷害時の治癒過程における *Lima1/EPLIN* の機能評価

8 週齢マウスを用いて大腿骨骨折モデルを作製した。経時的にマイクロ CT の撮像、及び組織標本作製し骨癒合の経過を評価した。

4. 研究成果

(1) 抗 EPLIN 抗体 (16639-1-AP, proteintech) を用いて野生型マウスの大腿骨骨組織の免疫染色を施行し、EPLIN 発現細胞の検討を行った。この結果骨芽細胞、軟骨細胞、骨細胞に発現がみられた (図 3)。

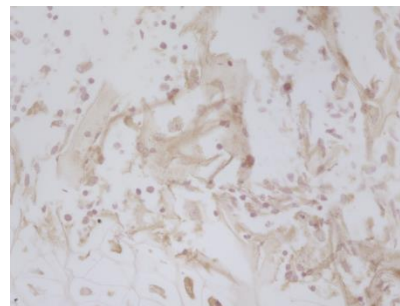


図 3. 大腿骨骨幹端部の EPLIN 免疫染色

(2) 4週、8週時点のマイクロCT像では *Lima1/EPLIN* トラップマウスと野生型で明らかな差はみられなかった。骨形態計測、骨強度試験においても骨密度、最大荷重などに差は認めなかった。一方16週時点で野生型では骨密度や骨梁幅、最大荷重が8週時点から増加しているが、*Lima1/EPLIN* トラップマウスでは増加がわずかであり最大荷重では有意に強度の差を認めた(図4,5)。

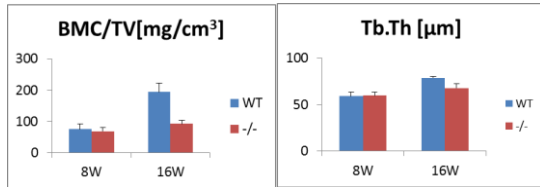


図4. 骨形態計測結果

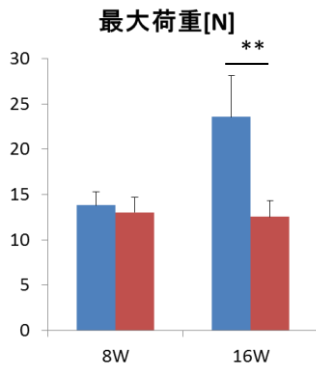


図5. 骨強度試験結果

(3) *Lima1/EPLIN* トラップマウスでは *BMP2*, *BMP4*, *Coll1a1*, *ALP*, *Osteocalcin*, *RANKL* など骨代謝関連遺伝子の発現低下を認めた(図6)。そこで骨組織のALP染色を施行したところ、*Lima1/EPLIN* トラップマウスの骨芽細胞でALP活性が低下していた(図7)。また、未脱灰組織切片のアリザリンレッド染色では *Lima1/EPLIN* トラップマウスに染色性の低下が見られた(図8)。さらに、*Coll1a1* の *in situ* hybridization では *Lima1/EPLIN* トラップマウスの骨芽細胞で *Coll1a1* のシグナル低下を認めた(図9)。

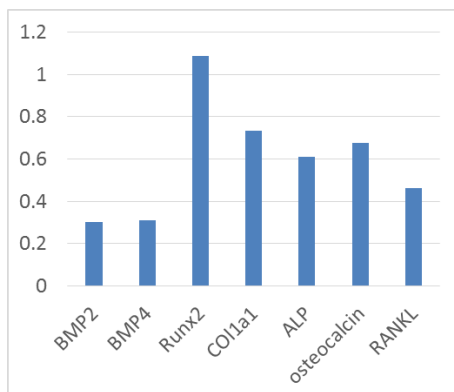


図6. 骨代謝関連遺伝子の発現解析 (WT比)

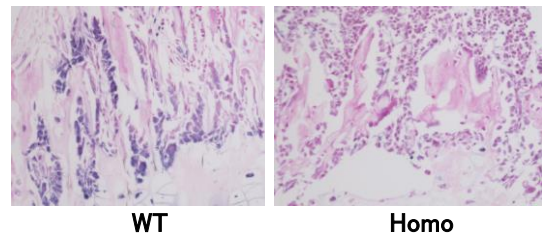


図7. 海綿骨組織のALP染色像

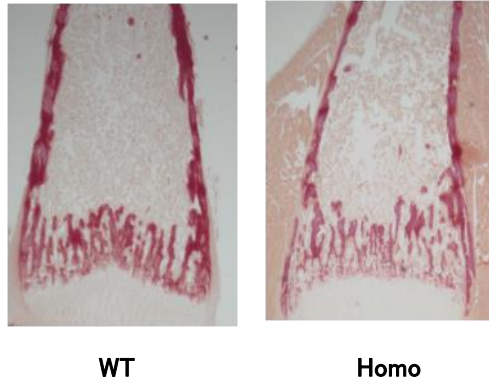


図8. 未脱灰大腿骨のアリザリンレッド染色像

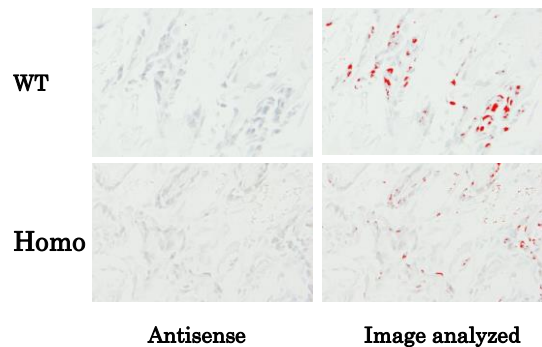


図9. *Coll1a1* の *in situ* hybridization

以上の結果から骨芽細胞の分化または機能の低下が示唆された。

(4) *Lima1/EPLIN* トラップマウスの軟骨細胞の組織切片を作製して観察した。成長軟骨の肥大軟骨細胞層が薄く、軟骨細胞内が濃染され軟骨基質の分泌不全を認めた。また分泌された基質も少なかった(図10)。そこで軟骨細胞の分化マーカーであるX型コラーゲンの免疫染色を施行したところ、*Lima1/EPLIN* トラップマウスのほうが少なく、軟骨細胞の分化不全が示唆された(図11)。

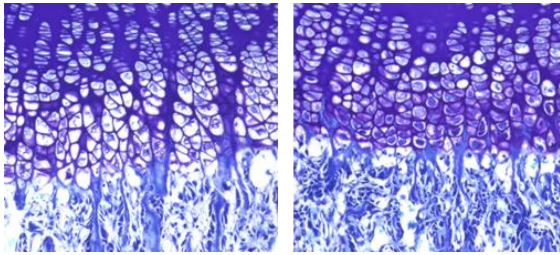


図 10. 成長軟骨の組織像
トルイジンブルー染色

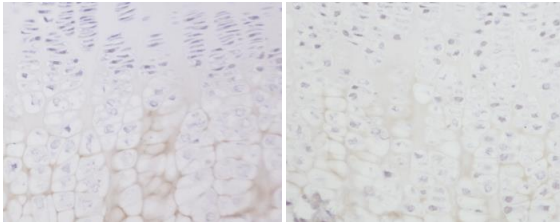


図 11. 成長軟骨の X 型コラーゲン
免疫染色像

(5) 8 週齢マウスの大腿骨骨折モデルを作製した。1 週毎に大腿骨を摘出しマイクロ CT の撮像及び組織標本を作製し、観察を行った。1 週目に両者に骨折部に軟骨の形成がみられ、2 週目では軟骨による架橋（軟性仮骨）がみられ、骨化も進行していた。3 週目には両者で軟骨が骨への置換が進み架橋が完成（硬性仮骨）し骨癒合が得られた（図 12）。以上から骨傷害時の治癒過程において *Lima1/EPLIN* の欠損による骨癒合不全や遷延は観察されなかった。

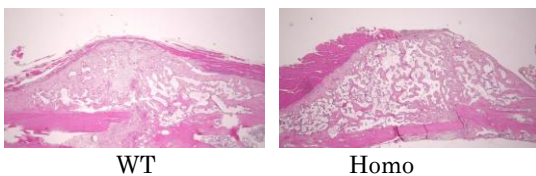


図 12. 大腿骨骨折後 3 週の HE 染色像

以上の結果から *Lima1/EPLIN* は骨芽細胞の分化、機能発現また軟骨細胞の分化に寄与している可能性が示唆された。一方で骨軟骨代謝が活発な成長期や骨傷害時の治癒過程においては骨強度や骨癒合に明らかな差が見られなかったのは興味深い。*EPLIN* はカドヘリン-カテニン複合体と結合しており (Maul, JCB 2003, Abe, PNAS 2007)、細胞接着に関与していることが報告されている。今後骨芽細胞の活性化シグナルと知られている *Wnt/β-カテニン* 系との関連を明らかにしていきたい。

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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中村 志保子、船元 太郎 他：可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨に異常を来す新規遺伝子群の効率的スクリーニング、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、2014 年 10 月 9 日-10 日、城山観光ホテル、鹿児島県・鹿児島市
- ② 黒木 修司、船元 太郎 他：可変型遺伝子トラップ法を用いた *Lima1/EPLIN* の骨代謝における機能解析、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、2013 年 10 月 17-18 日、幕張メッセ、千葉県・千葉市
- ③ 黒木 修司、船元 太郎 他：可変型遺伝子トラップ法を用いた *EPLIN* 遺伝子の骨代謝における機能解析、第 86 回日本整形外科学会学術総会、2013 年 5 月 23-26 日、広島グリーンアリーナ他、広島県・広島市
- ④ 船元 太郎 他：可変型遺伝子トラップ法を用いた *Lima1/EPLIN* の骨代謝における機能解析、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、2012 年 10 月 26-27 日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船元 太郎 (FUNAMOTO Taro)

宮崎大学医学部・医員

研究者番号：20404452

(2) 研究分担者

帖佐 悦男 (CHOSA Etsuo)

宮崎大学医学部・教授

研究者番号：00236837

関本 朝久 (SEKIMOTO Tomohisa)

宮崎大学医学部・講師

研究者番号：60305000

荒木 正健 (ARAKI Masatake)

熊本大学生命資源研究・支援センター・准教授

研究者番号：80271609

荒木 喜美 (ARAKI Kimi)

熊本大学生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：90211705