

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592796

研究課題名(和文) 新規な骨芽細胞転写因子の Cre-loxP 系を応用した発現細胞系列の解析

研究課題名(英文) Analysis of cell lineage expressing novel osteoblast transcription factor by Cre-loxP system

研究代表者

河合 伸治 (Kawai, Shinji)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：40362678

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)：Osr2を発現する細胞が、骨を作る骨芽細胞や歯を作る象牙芽細胞、関節を作る滑膜細胞とどのような関係にあるのかという疑問を解決することを目的とした。Cre-loxP系とジフテリア毒素を利用したOsr2を発現する細胞のみを破壊する手法を用いた。硬組織の観察を行う予定であったが、Osr2を発現する細胞をジフテリア毒素で破壊してしまうと、かなり早い時期で胎仔が致死に至ってしまい、目的のマウスが死亡してしまったため、硬組織の異常を観察することは不可能であった。Osr2は、胎生期、腸、腎、脳下垂体、肺、胃での発現も認められるため、臓器形成がうまくいかず、胎生致死になってしまった可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the relationship between Osr2 expressing cells and osteoblast/odontoblast/synovial cells in the present research. We planned that cell disruption of Osr2 expressing cells by Cre-loxP with diphtheria toxin. We scheduled to analyze long bone and skull bone from the postnatal mice and to stain the section of bones by HE, MacNeal, or Goldner staining. Unfortunately, our purpose mice died during embryogenesis. Embryonic lethality was happened in early development of the mice. The reason of embryonic lethality seems to be the expression of Osr2 in various types of organs such as intestine, kidney, pituitary gland, lung, and stomach.

研究分野：口腔生化学

キーワード：骨芽細胞 転写因子 骨形成 特異的細胞破壊

1. 研究開始当初の背景

我々はトランスクリプトーム解析により、骨や歯などの硬組織の形成に関わる因子の網羅的検索を精力的に行っている。特に遺伝子発現を制御する転写因子に着目した解析の結果、幾つかの転写因子が骨芽細胞の分化過程で強く発現していることが判明した。そこで、これらのひとつ Odd-skipped related (Osr)に着目した。Osr 遺伝子と骨形成に関する研究は、国内外ともに緒に就いたばかりであり、我々が世界の Osr 研究をリードする立場にある。研究代表者は、平成 18 年度から科学研究費補助金(基盤 C)の助成を受け、Osr2 のドミナントネガティブ型遺伝子のトランスジェニックマウスを作出した。そのマウスでは、頭蓋骨の形成に異常が生じる表現型が観察され、研究代表者は、Osr2 の骨形成における生理的機能を解明した。これらの成果は米国骨代謝学会にて口演発表に選出された。また、日本骨代謝学会にて口演発表し、優秀演題賞として高い評価を受けた。更に、骨生物学分野におけるトップジャーナルである国際誌 Journal of Bone and Mineral Research にアクセプトされた(2007 22(9) 1362-72)。

2. 研究の目的

研究代表者は、既に Osr2 の骨形成における分子機能について重要な知見を世界に先駆け示した。本研究課題では、Osr2 を発現する細胞が、骨を作る骨芽細胞や歯を作る象牙芽細胞、関節を作る滑膜細胞とどのような関係にあるのかと言う疑問を解決することを目的とする。Cre-loxP 系とジフテリア毒素を利用した Osr2 を発現する細胞のみを破壊する手法を用いて、マウス発生過程で Osr2 を発現する細胞が欠損した場合、マウスの形態にどのような変化が現れるかを観察する。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウスの作出

Osr2 発現細胞を破壊した遺伝子改変マウス

を作出するために 2 系統のマウスを作出する。手法は、組織特異的細胞破壊システムが開発されている。まず、普遍的に発現する CAG プロモーター、loxP 配列で挟んだ neo 遺伝子、ジフテリア毒素遺伝子を配置したトランスジェニックベクターを作製する。このベクターを用いて floxed トランスジェニックマウスを作製する。このマウスでは、DNA 組換え酵素 Cre が働いたときにだけ、ジフテリア毒素遺伝子が発現し、細胞の蛋白合成を停止させ、細胞を致死させる。Cre が働かない場合は、neo 遺伝子が発現し、ジフテリア毒素は発現しない。もう 1 系統のマウスは、Osr2 のプロモーターの制御下に、Cre を発現するようにした Cre トランスジェニックマウスであり、Osr2 を発現する細胞のみで特異的に Cre が発現する。これらの 2 系統のマウスを交配して、Osr2 発現細胞系列のみを破壊したマウスを作出する。トランスジェニックマウスの作出は、日本 SLC に外注依頼する。マウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、PCR により目的遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスを選別(ジェノタイプング)する。

(2) トランスジェニックマウスにおける骨の解析

出生後マウスの外観の観察

出生後 3 週齢のトランスジェニックマウスの骨格をソフト X 線により観察し、野生型と比較する。特に長管骨における X 線像を検討し、大きさや透過性に関して評価する。大きさに相違が見られる場合は、経時的な体重変化を観察する。出生直後のトランスジェニックマウスと野生型マウスの軟組織を除去後、アルシアン・ブルーおよびアリザリン・レッドにて染色することにより骨格標本作製し、骨化や軟骨化が低下するかどうかを比較検討する。

骨構造解析、骨密度測定、骨力学測定

マイクロ CT (高分解能マイクロフォーカス X 線 CT スキャナー)により 2 次元多層撮影し、

骨構造を解析する。DXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) により骨密度を測定する。大腿骨を用いて3点曲げ試験により、骨力学測定を行う。

骨形態計測による骨代謝機能の評価

生後8週齢のマウスにカルセインを腹腔内投与し、3日後2回目のテトラサイクリン投与を行う。更に1日後にマウスを解剖し、脛骨を採取し、切片を作製後、骨形態計測を行う。同一の標本を用いて、海綿骨量、骨梁幅、骨梁数などの骨構造に関するパラメータ、類骨面、骨芽細胞面、骨石灰化面、石灰化速度など骨形成に関するパラメータ、骨吸収面、破骨細胞数などの骨吸収に関するパラメータを計測する。

トランスジェニックマウスの組織切片による解析

頭蓋骨、脛骨、歯周組織、関節の組織切片を作製し観察する。胎生期および出生直後のトランスジェニックマウスと野生型マウスの頭部および下肢組織を採取し、樹脂包埋後、組織切片を作製する。組織切片をHE染色、MacNeal 類骨染色、Goldner 骨染色することにより各組織の形態異常や異形成がないか、正常型マウスと比較観察する。

(3) 遺伝子改変マウスの骨芽細胞の分析

生後直後の野生型およびトランスジェニックマウスの頭蓋骨から骨芽細胞を分離し、初代培養細胞の性状を解析する。まず、細胞増殖に関して評価するために、一定期間培養後の細胞数を計測し、更にMTSアッセイにて判定する。細胞分化に関しては、一定期間培養した細胞よりRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によりアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、Runx2、オステリックス、I型コラーゲンの発現を観察する。また、培養細胞をアルカリフォスファターゼ染色、コラーゲンに対するワンギーソン染色、石灰化の評価にフォンコッサ染色などの細胞染色を行い、細胞分化への影響を検討する。

4. 研究成果

Osr2 発現細胞を破壊した遺伝子改変マウスを作成するためにマウスを作成した。まず、Osr2 のプロモーターの制御下に、Cre を発現するようにした Cre トランスジェニックマウスを日本 SLC に外注依頼し、作製した。マウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、PCR により目的遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスをジェノタイプングした。

また、普遍的に発現する CAG プロモーター、loxP 配列で挟んだ neo 遺伝子、ジフテリア毒素遺伝子を配置したトランスジーンベクターは、理化学研究所バイオリソースセンターから入手が可能であったため、購入した。これらの2系統のマウスを交配して、Osr2 発現細胞系列のみを破壊したマウスの作出を試みた。このマウスでは、DNA 組換え酵素 Cre が働いたときにだけ、ジフテリア毒素遺伝子が発現し、細胞の蛋白合成を停止させ、細胞を致死させる。Cre が働かない場合は、neo 遺伝子が発現し、ジフテリア毒素は発現しない。

硬組織の観察を行う予定であったが、Osr2 を発現する細胞をジフテリア毒素で破壊してしまうと、かなり早い時期で胎仔が致死に至ってしまい、目的のマウスが死亡してしまったため、硬組織の異常を観察することは不可能であった。Osr2 は、胎生期、腸、腎、脳下垂体、肺、胃での発現も認められるため、臓器形成がうまくいかず、胎生致死になってしまった可能性が考えられる。

下記には本研究課題と関連の深い発表論文と学会発表を示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

1. Kawai S, Amano A. Negative regulation of Odd-skipped related 2 by TGF-beta achieves the induction of cellular migration and the arrest of cell cycle.

Biochem Biophys Res Commun. 2012
421(4):696-700. 査読有

2. Kawai S, Michikami I, Kitagaki J,
Hashino E, Amano A. Expression pattern of
zinc-finger transcription factor
Odd-skipped related 2 in murine
development and neonatal stage. Gene Expr
Patterns. 2013 13(8):372-6. 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

1. Wnt シグナル伝達経路の Odd-skipped
related 2 による制御

河合伸治、天野敦雄

第 30 回 日本骨代謝学会学術集会 (新宿
2012.7.20) 新宿京王プラザホテル

2012年7月19日(木)~21日(土)

2. Odd-skipped related2 regulates Wnt
signaling pathway

Kawai S, Amano A

The 34th Annual Meeting of the American
Society for Bone and Mineral Research
(Minneapolis, MN, 2012.10.14)
2012.10.12-15 Minneapolis Convention
Center

3. Odd-skipped related 2 による Dkk1 を介
した Wnt シグナル伝達経路の制御

河合伸治

第 31 回 日本骨代謝学会学術集会 (神戸
2013.5.30) 神戸国際会議場

2013年5月28日(火)~6月1日(土)

4. Odd-skipped related 2 regulates Wnt
signaling pathway through Dkk1

Kawai S, Amano A

The 35th Annual Meeting of the American
Society for Bone and Mineral Research
(Baltimore, MD, 2013.10.6) 2013.10.4-7
Baltimore Convention Center

5. Odd-skipped related 1 transcription
factor modulates skull closure and cranial
bone formation

Kawai S, Yamauchi M, Michikami I

The 36th Annual Meeting of the American
Society for Bone and Mineral Research
(Houston, Texas, 2014.9.15) 2014.9.12-15
George R. Brown convention center

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

河合 伸治 (KAWAI SHINJI)
大阪大学・大学院歯学研究科・特任准教授
研究者番号：40362678

(2) 研究分担者

天野 敦雄 (AMANO ATSUO)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：50193024

(3) 連携研究者

()

研究者番号：