

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780094

研究課題名(和文)機能未知Y染色体遺伝子による骨格性差構築の新規分子基盤の解明

研究課題名(英文)Study of Y chromosome gene in sex differences of skeletal growth

研究代表者

井上 和樹 (KAZUKI, INOUE)

愛媛大学・総合科学研究支援センター・助教

研究者番号：60623725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：骨長や骨量は、雄性が明確な優位を示すことが知られている。このような性差には性ホルモン非依存的なY染色体遺伝子群の骨長雄性化への関与が推測されてきた。しかしながら、Y染色体遺伝子群の骨組織における生理機能は不明なままであった。そこで、本研究では、軟骨細胞に発現するY染色体遺伝子に着目し、新規手法により作出した遺伝子欠損マウスを用い、骨組織におけるY染色体遺伝子の生理機能の解明を試み、Y染色体遺伝子による性差構築の分子基盤の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Males have higher bone mass and larger skeletal size than females. Such gender-specific bone phenotype has considered to be generated by the actions of sex steroid hormones. However, an uncharacterized Y chromosome gene is assumed as a significant factor to form gender-specific bone phenotype from clinical observations of patients mutated in the Growth Controlling region on the Y chromosome. To reveal the biological functions of Y chromosome gene in skeletal systems, we generated Y chromosome gene knockout mice by using a novel method. We revealed that Y chromosome gene regulates male skeletal length by controlling cartilage development. Taken together, the present study has uncovered a molecular basis of gender-specific cartilage development.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：Y染色体

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の雌雄間には、生殖器官や性行動等の様々な性差が存在する。中でも、骨長や骨量においては、雄性が明確な優位を示すことが知られている。このような性差は、これまで性ホルモン作用により生じるとされてきた。性ホルモンである男性ホルモン(アンドロゲン)および女性ホルモン(エストロゲン)は、標的組織におけるアンドロゲン受容体およびエストロゲン受容体を介した標的遺伝子の発現制御により、その生理作用を発揮する。現在までの遺伝子欠損マウスの解析により、これら性ホルモンは、雌雄の各生殖器の発生や脳の性分化などにおいて機能する事が明らかとなっている。しかしながら、これら受容体遺伝子欠損雄マウスの体長は完全には雌性化せず、性ホルモン作用以外による性差構築の要因が考えられた。そのため、雄性での性差構築にはY染色体遺伝子群の関与が推測された。しかしながら、現在までに、雄性特異的なY染色体の遺伝子群個々の生理機能は不明である。これまでのヒト低身長患者のゲノム解析より、Y染色体上には、Y染色体特異的な成長制御領域(GCY)が存在すると考えられている。そこで、我々は、GCY上に座位する遺伝子の中でも、ヒトとマウスにおいて共通に存在するY染色体遺伝子が雄性特異的な身長制御に関与すると考えられる。

2. 研究の目的

GCYに座位すると推測される遺伝子群の中でも、機能未知遺伝子Uty(Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome)に注目した。Utyの生理機能の解明には、遺伝子欠損マウスを用いた解析が必須と考えられる。しかしながら、Y染色体遺伝子欠損マウスの作出は報告されていない。そこで我々は、挿入型ベクターを用いた二段階のターゲティングにより、遺伝子全長を網羅する領域にloxP配列をそれぞれ2カ所挿入し、Cre/loxPシステムを応用すること

で、Y染色体非同義領域に座位するUty floxマウスを作出することに成功した。さらに、Uty floxマウスと全身性Cre(CMV-Cre)マウスと交配させることにより、Uty遺伝子欠損マウス(Uty KOマウス)を作出した。Uty KOマウスの骨軟骨組織における表現型を解析することにより、骨格性差構築におけるY染色体遺伝子の分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の点について、個体レベルおよび分子レベルでUtyの機能を解析した。

(1) 全身性Uty遺伝子欠損マウスの骨軟骨組織における表現型解析

まず血中ホルモン等の基本パラメーターを測定した。続けて、Uty KOマウスの頭胴長計測による成長曲線作製や週齢ごとの骨長測定により、Uty KOマウスが成長遅延を示すかを調べた。さらに、長管骨の骨組織切片の作製・組織染色を行い、成長板軟骨層の長さおよび形態観察を行うことにより軟骨組織におけるUtyの生理機能を解析した。続いて、X線学的解析やDEXA法により骨量の測定を行うことにより骨量性差構築における生理機能を解析した。さらに、骨組織を構成する軟骨細胞・骨芽細胞をUty KOマウスより単離し、invitro培養系により、その分化能・増殖能などを解析した。

(2) 骨・軟骨細胞におけるUtyの分子機能の解明

Utyは、ヒストン脱メチル化酵素に広く保存されているJmjCドメインを有している。このことから、Utyはヒストンの脱メチル化を介して、転写共役因子として機能する可能性が考えられる。そこで、Runx2、Osterix、Sox9などの骨軟骨組織における主要な転写因子と機能的に関連するかを解析した。また、エピゲノム制御におけるUtyの分子機能を解析した。

4. 研究成果

全身性 Uty 染色体遺伝子欠損マウスの本パラメーターの解析(外観観察、臓器重量、ELISA を用いた血中ホルモン濃度の測定)を行ったところ、Testosterone、17 β -Estradiol、LH、FSH、Growth hormone、IGF-1、PTH に変化を認めなかった。しかしながら、頭胴長計測による成長曲線を作製した結果、成長遅延を認めた。そこで、アリザリンレッド・アルシアンブルー染色による胎児の骨格標本を作製し、骨格形態の観察を行ったところ、骨格の形状に大きな異常は認めなかったものの、大腿骨・脛骨の骨長の短縮が認められた。サフラニン・ファーストグリーン染色を行い、成長板軟骨層の計測を行い、成長板軟骨層の増殖軟骨層および肥大軟骨層の長さを計測したところ、軟骨層の長さに異常が認められた。そこで、初代培養軟骨細胞を用いて、増殖やアポトーシスに異常が起きているかを解析したところ、軟骨細胞の増殖およびアポトーシスに異常は認められなかった。初代培養細胞を用いて軟骨および骨芽細胞の分可性を調べたところ、軟骨細胞分化の異常が認められた。特に、肥大軟骨細胞マーカー遺伝子の発現に異常が認められた。さらに Uty が肥大軟骨細胞分化制御転写因子 Runx2 の転写能を制御することが明らかとなった。さらに、骨量に関する解析を行った。軟 X 線撮影および DEXA 法による骨密度測定を行ったところ、全領域にわたって骨密度の減少変化が認められた。これらの結果より、Uty が軟骨細胞の分化成熟を制御することにより、雄型の骨長を制御する可能性が示唆された。

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 7 件)

(1) Inoue K and Imai Y.

Identification of Novel Transcription

Factors in Osteoclast Differentiation using Genome-wide Analysis of Open Chromatin Determined by DNase-seq.

J Bone Miner Res. 2014 Mar 28. doi: 10.1002/jbmr.2229. (査読あり)

(2) Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shiode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi J, Kanno J, Bonewald L, Imai Y. Estrogen receptor in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice.

Bone. 2014 Mar;60:68-77. doi: 10.1016/j.bone.2013.12.005. (査読あり)

(3) Okuno Y, Inoue K, Imai Y.

Novel insights into histone modifiers in adipogenesis

Adipocyte. 2013 Oct 1;2(4):285-8. doi: 10.4161/adip.25731. (査読あり)

(4) Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y.

Autoimmune regulator, *Aire*, is a novel regulator of chondrocyte differentiation.

Biochem Biophys Res Commun. 2013 Aug 9;437(4):579-84. doi:

10.1016/j.bbrc.2013.07.001. (査読あり)

(5) Inoue K, Inoue E, Imai Y.

Female sex hormones ameliorate arthritis in SKG mice.

Biochem Biophys Res Commun. 2013 May 17;434(4):740-5. doi:

10.1016/j.bbrc.2013.03.111. (査読あり)

(6) Imai Y, Youn MY, Inoue K, Takada I, Kouzmenko A, Kato S

Nuclear Receptors in Bone Physiology and Diseases

Physiol Rev. 2013 Apr;93(2):481-523. doi: 10.1152/physrev.00008.2012. (査読あり)

(7) Yamamoto Y, ... , Inoue K(21 人中 13 番目),, Imai Y.

Vitamin D receptor in osteoblasts is a

negative regulator of bone mass control.
Endocrinology.2013 Mar;154(3):1008-20.
doi: 10.1210/en.2012-1542. (査読あり)

(3)連携研究者
なし

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Kazuki Inoue and Yuuki Imai
Identification of Novel Transcription
Factors in Osteoclast differentiation
using DNase-seq. Herbert Fleisch Workshop.
2014年3月16日-3月18日 Brugge, Belgium

(2) Kazuki Inoue and Yuuki Imai
Dynamic changes in chromatin
accessibility during early
osteoclastogenesis. 2nd Joint Meeting of
the International Bone and Mineral Society
and the Japan Society for Bone and Mineral
Research. 2013年5月28日-6月1日 Kobe,
Japan

(3) Kazuki Inoue and Yuuki Imai
Dynamic changes in chromatin accessibility
during early osteoclastogenesis. ASBMR
2012 Annual Meeting 2012年10月13日~2012
年10月13日Minneapolis, USA

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者
井上 和樹 (Inoue, Kazuki)
愛媛大学・総合科学研究支援センター・
助教
研究者番号: 60623725

(2)研究分担者
なし