

平成30年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

| | | | | | |
|---|--|----------|-------------|----|----|
| ふりがな 氏名 | ふじわら ちか 藤原 知佳 | 学部 学科 | 歯学部 | 学年 | 4年 |
| ふりがな 共同 研究者氏名 | | 学部 学科 | | 学年 | 年 |
| | | | | 学年 | 年 |
| アドバイザー教員 氏名 | 高畑 佳史 | 所属 | 歯学研究科 生化学教室 | | |
| 研究課題名 | 転写因子 Runx2 の標的遺伝子の同定と機能解析 | | | | |
| 研究成果の概要 | 研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。) | | | | |
| 「研究目的」 | | | | | |
| <p>マウスジェネティクスおよびヒト遺伝学の研究成果により、転写因子 Runx2 と Osterix が骨形成過程において必須的役割を果たしていることが明らかにされてから久しい。その後、数多くの研究により、Runx2 の発現調節ならびに骨形成機能の制御に、骨形成因子 BMP2 のシグナル分子である Smad1、Smad4 および Smad5 が深く関与していることが明らかにされている。また Osterix が Runx2 の標的遺伝子であることも見出されている。さらに BMP/Smad シグナル、Runx2 あるいは Osterix の標的遺伝子として、オステオカルシン、オステオポンチン、および骨シアロタンパク質が同定され、骨芽細胞の主要な分化マーカーとして用いられている。しかしながら、Runx2 および Osterix 遺伝子欠損(KO)マウスでは完全に骨形成が消失するにも関わらず、オステオカルシン、オステオポンチンあるいは骨シアロタンパク質の KO マウスにおける骨形成障害の程度は、ほとんど見られない、あるいは、非常に軽微である。したがって、骨形成過程において必須的役割を果たす、未知の Runx2 および Osterix 標的遺伝子が存在することが示唆される。私たちは先行実験において BMP2/Smad シグナル、Runx2 あるいは Osterix により制御され、骨形成に深く関与する遺伝子を同定するために、未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 および Runx2 遺伝子欠損マウス頭蓋冠由来間葉系細胞株 C2 細胞に、BMP2、Runx2 あるいは Osterix のアデノウイルスを作用させ、GeneChip を用いた Microarray 解析を行った。その結果、いくつかの基質タンパク質やコラーゲン関連タンパク質などの Runx2 関連遺伝子の発現が顕著に上昇することを見出した。本研究では Runx2 関連遺伝子の一つである Smoc1,2 遺伝子に着目し、Smoc1,2 遺伝子の骨形成に対する役割解明を目的とする。</p> | | | | | |
| 「研究計画」 | | | | | |
| <p>本研究計画では、①Smoc1,2 遺伝子の分子細胞生物学および生化学的解析を進めるとともに、②Smoc1,2 遺伝子の発現期における発現時期と発現部位の同定を行う。③さらに Smoc1,2 遺伝子の遺伝子欠損(KO)マウスを作成し、KO マウスの骨表現系および病理組織学的解析を行い Smoc1,2 遺伝子の骨形成における機能について解析する。</p> | | | | | |

「研究方法」

Runx2 あるいは BMP2 による Smoc1, Smoc2 遺伝子の発現制御機構の解析

胎生 12 日目のマウスから肢芽細胞を採取し、単層条件で培養を行った。コントロールには Venus を使用し、Runx2, BMP2 のアデノウイルスを作用させて過剰発現を行った。ウイルス感染後 24 時間後に新しい培地に交換し、さらに 2,4,6 日間培養後 Total RNA を抽出した。その後、逆転写反応を行い、Smoc1, Smoc2 を特異的に認識するプローブを用いて RT-qPCR 法により各遺伝子を定量した。

Whole mount in situ hybridization 法による Smoc1, Smoc2 遺伝子の発現部位の解析

Whole mount in situ hybridization(WISH) を行うため、*Col2a1*, *Smoc1*, *Smoc2* mRNA を特異的に認識する Dig 標識 RNA probe を作成した。これらのプローブを用いて、胎生 11 日目および 12 日目のマウスを 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、DIG 抗体にて検出を行いマウスの全身での発現部位を検討した。

shRNA を用いた Smoc1, Smoc2 遺伝子ノックダウンの骨芽細胞機能に対する影響

Smoc1 および Smoc2 遺伝子の骨芽細胞機能における機能について明らかにするために、shSmoc1, shSmoc2 をコードする RNA 配列を組み込んだ shRNA 発現レトロウイルスベクターを作成した。続いて、生後 3 日目のマウス頭蓋冠から骨芽細胞を調製し、対数増殖期において shGFP control, shSmoc1 または shSmoc2 を導入した。さらにウイルス感染 48 時間後に、BMP2 を用いた骨芽細胞分化誘導培地にて 6 日間培養を行った。分化誘導後、total RNA を抽出し、RT-qPCR 法により各遺伝子のノックダウン効率の評価と、石灰化能の指標である Alizarin red 染色および ALP 染色を行った。

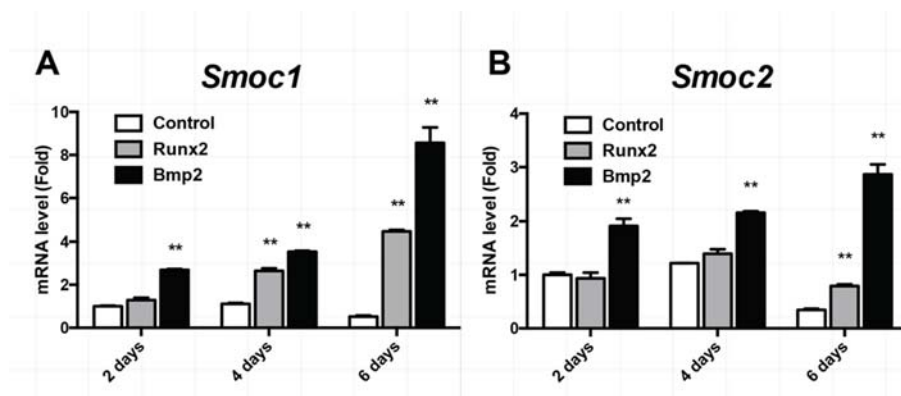
Smoc1, Smoc2 遺伝子ノックアウトマウスにおける骨表現系の解析

生体において Smoc1, Smoc2 遺伝子の骨格形成に与える影響について検討するために、Smoc1 KO マウスと Smoc2 KO マウスの骨表現系を骨格標本を作成することで評価した。さらに、Smoc1, Smoc2 両者のダブルノックアウトマウスを作成し、Smoc 関連遺伝子の全身での機能を詳細に解析した。

「研究経過」

Runx2 あるいは BMP2 による Smoc1, Smoc2 遺伝子の発現制御機構の解析

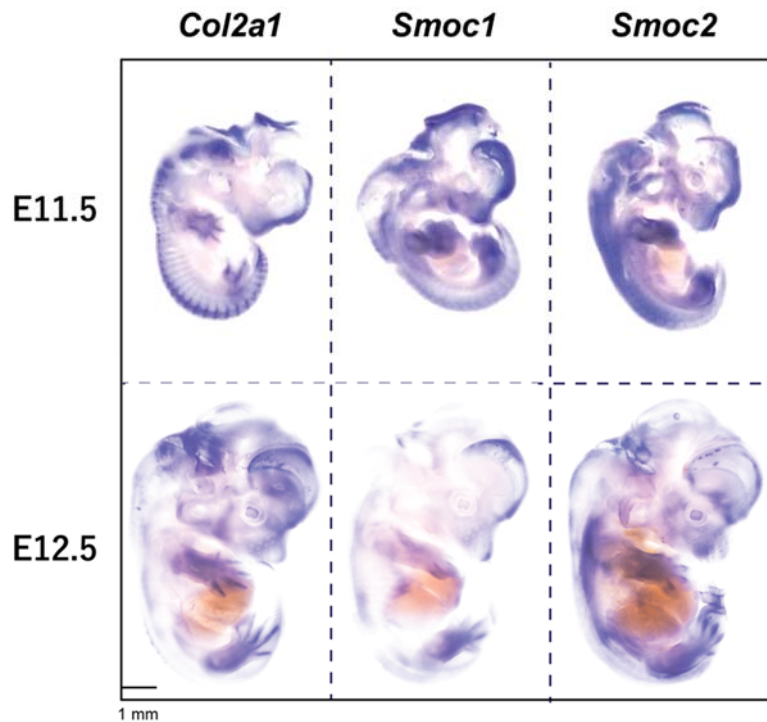
肢芽細胞に Venus, Runx2 あるいは BMP2 のアデノウイルスを作用させて過剰発現を行い、各日数培養した。Total RNA を回収し、逆転写反応を行ったのち、リアルタイム PCR 法により Smoc1 および Smoc2 遺伝子の定量を行った。その結果、肢芽細胞に Runx2, BMP2 を過剰発現させると Smoc1 遺伝子の発現誘導が引き起こされた(A)。Smoc2 の発現については BMP2 の作用で発現誘導が引き起こされた。また Runx2 を過剰発現させても培養初期では誘導が観察されなかったが、培養 6 日目では有意な発現上昇が引き起こされた(B)。



Whole mount in situ hybridization 法による Smoc1, Smoc2 遺伝子の発現部位の解析

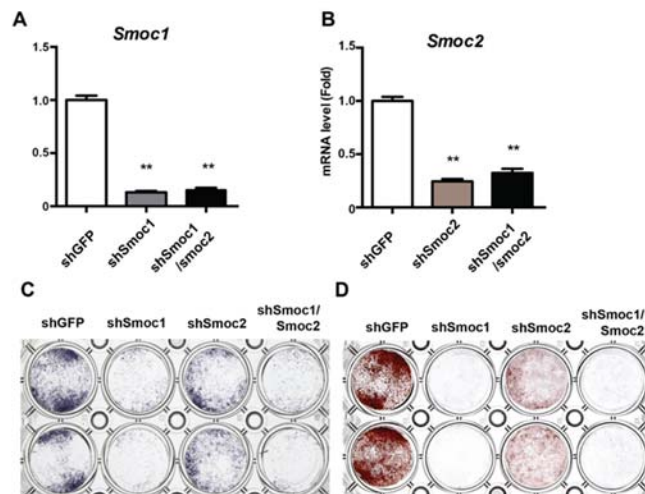
生後 11 日目および 12 日目のマウスを 4%パラホルムアルデヒドで固定後、脱色、プレハイブリダイゼーションを行い、引き続きプローブのハイブリダイゼーションを行った。翌日、洗浄を繰り返す、プローブに対して

ALP 標識 DIG 抗体を反応させ、NBT/BCIP による発色を行った。WISH 法を用いて全身での *Smoc1*, *Smoc2* の mRNA 発現部位を検討した。その結果、*Smoc1*, *Smoc2* いずれのプローブを使用しても四肢の先端部および頭蓋間に強いシグナルが検出された。さらに *Smoc1*, *Smoc2* の染色部位は軟骨細胞マーカーである *Col2a1* 染色領域と重なっていることが明らかとなった。



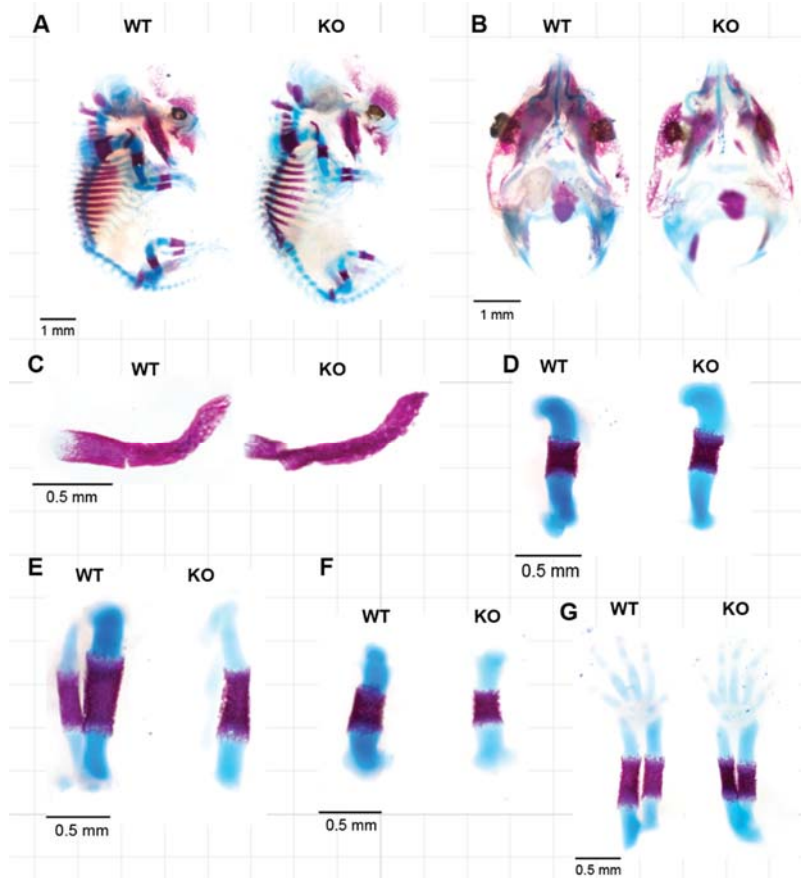
shRNA を用いた *Smoc1*, *Smoc2* 遺伝子ノックダウンの骨芽細胞機能に対する影響

マウス頭蓋冠から調製した骨芽細胞にレトロウイルスを用いて shGFP コントロール, sh*Smoc1* または sh*Smoc2* を導入して遺伝子ノックダウンを行い骨芽細胞機能について解析した。石灰化誘導培地にて 6 日間培養し、total RNA を回収後、RT-qPCR 法にて *Smoc1*, *Smoc2* 遺伝子の発現定量を行った。その結果、sh*Smoc1*, sh*Smoc2* をそれぞれ導入すると、*Smoc1*, *Smoc2* 共に効率の良い遺伝子ノックダウンが観察された(A, B)。さらに、骨芽細胞の石灰化能を検討するためアリザリンレッド染色にて石灰化について検討した。その結果、*Smoc2* 遺伝子のノックダウンでは骨芽細胞の ALP 活性や石灰化能についてほとんど変化が観察されなかった(C-D)。一方で、*Smoc1* 遺伝子をノックダウンすると骨芽細胞の ALP 活性や石灰化能は shGFP コントロール群に比べ著明に減少することが明らかとなった(C-D)。



Smoc1 ノックアウトマウスにおける骨表現系の解析

胎生 15 日目の Smoc1 KO マウスと野生型コントロールマウスの骨表現系を解析するため、臓器や皮膚を除去したのちエタノールで固定を行った。続いてアルシアンブルー、アリザリンレッド染色を行い、1%KOH にて全身の軟組織を融解し、骨格標本を作成した。Smoc1 KO マウスでは野生型コントロールマウスと比較して全身の骨格の大きさに特に変化は認められなかった(A)。各部位の骨格の詳細を解析すると、後肢の指先のアポトーシス遅延が認められ(G)、腓骨の形成遅延が観察された(E)。



「研究成果」

現時点での、本研究で最も重要な所見は、Smoc1 は細胞レベルにおいて、骨芽細胞の石灰化に関わる重要遺伝子であることが明らかとなったことである。一方、マウスを用いた *in vivo* 解析により Smoc1 は腓骨形成にも関わる遺伝子であり、内軟骨骨形成を制御する可能性についても示された。

研究計画と方法に記載があるように Smoc1 ノックアウトマウスと Smoc2 ノックアウトマウスのそれぞれの骨表現系解析を進めた上で、両者の Smoc1, Smoc2 ダブルノックアウトマウスの全身骨格標本を作成する予定だったが、時間の関係上 Smoc1 ノックアウトマウスのみの解析しか行うことができなかった。Smoc1, Smoc2 ダブルノックアウトマウスの解析は現在進行形であり、今後、全身の骨表現系と病理組織学的解析を通じて、Smoc1, Smoc2 の両者が骨形成に与える影響についてさらなる解析をしていく必要がある。