



Title	Osterix トランスジェニックマウスにおける骨芽細胞分化機能の解析
Author(s)	川崎, 馨嗣
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45181
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	川崎 馨 嗣
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 18618 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学 位 論 文 名	Osterix トランスジェニックマウスにおける骨芽細胞分化機能の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高田 健治 (副査) 教 授 伊集院直邦 助教授 西村 理行 講 師 和田孝一郎

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

Osterix は Zinc-finger を持つ、BMP-2 によって誘導される遺伝子としてクローニングされた。Osterix 欠損マウスでは内軟骨性骨形成も膜性骨形成も進行せず、完全に骨を欠損する。Osterix 欠損マウスの骨形成予定領域に存在する間葉系細胞は骨芽細胞分化に必須の転写因子 Runx2/Cbfa1 を発現していたが、骨芽細胞に分化しなかった。これらのことから、Osterix は骨芽細胞分化に不可欠な因子であり、かつ、Runx2 の下流に位置することが示された。

一方、Osterix は生後の骨芽細胞、骨細胞においても継続して発現するが骨芽細胞の分化成熟過程において Osterix がどのように作用するのかはいまだ明らかでない。本研究の目的は、骨芽細胞特異的に Osterix を強制発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製して、このマウスの骨芽細胞の分化段階、機能を調べ、Osterix の骨芽細胞分化過程における役割を検討することにある。

【研究方法】

(1) トランスジェニックマウスの作製

I 型コラーゲンプロモーター下に Osterix cDNA を組みこんだ DNA 断片をマウス受精卵に注入して偽妊マウスの子宮に戻し、Osterix を過剰発現する Tg マウスを作製した。遺伝子型はマウスの尾より抽出した DNA を用いたサザンブロット法にて決定し、osterix mRNA の発現量はマウスの尾より抽出した RNA を用いたノーザンブロット法にて測定した。

(2) トランスジェニックマウスの解析

Tg マウスにおける骨組織と骨芽細胞機能の変化を調べるために以下の解析をおこなった。

- ・ X 線解析 ・ H-E 染色骨組織切片の解析 ・ pQCT 解析
- ・ 骨形態計測
- ・ ノーザンブロット、in situ ハイブリダイゼーション解析
- ・ BrdU 取り込み解析
- ・ Runx2/Osterix ダブル Tg マウスの作製

【結果】

Osterix Tg マウスは3系統をライン化 (R1、R2、R3) し、これらはほぼ同一の表現形を示した。従って導入遺伝子の発現が最も強い R2 マウスを中心に解析をおこなった。

Osterix Tg マウスは野生型マウスに比べて体が小さく、稀に踵骨に骨折を起こす個体もみられた。4週令以降の X 線解析では、X 線透過性の亢進が明らかであった。H-E 染色組織切片を観察すると Tg マウスでは皮質骨と海綿骨の骨量がともに低下していた。また野生型マウスの皮質骨骨幹部はコラーゲンの走行が規則的な層状骨となっていたが、Tg マウスではコラーゲンの走行が不規則な繊維性骨であり、埋め込まれている骨細胞も形態的に未熟であった。pQCT 解析の結果、R2 マウスは海綿骨と皮質骨の骨密度、および皮質骨厚の著明な低下を認めた。また皮質骨内膜および外膜の周囲長は増加しており、R2 マウスの骨は太くなっていた。

骨形態計測の結果、R2 マウスでは骨芽細胞数は有意に増加していたが、骨石灰化速度、骨石灰化面、骨形成速度は著明に低下していた。骨吸収のパラメーターである破骨細胞数や骨吸収面に有意差は認められなかった。BrdU 取り込み実験の結果、R2 マウスの一次海綿骨梁に存在する骨芽細胞の増殖は亢進していた。

ノーザンブロット解析と *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、R2 マウスでは広範な分化段階の骨芽細胞が発現する Type I コラーゲンと成熟骨芽細胞が発現する osteocalcin の発現量は著明に低下しており、未熟骨芽細胞が発現する osteopontin の発現量はわずかに低下していた。

R2 マウスを type I コラーゲンプロモーターRunx2 Tg マウスと交配し、Runx2/Osterix ダブル Tg マウスを作製したところ、高頻度に骨折を起こし、X 線解析、組織学的解析の結果、ダブル Tg マウスでは骨の脆弱化が進行していることがわかった。

【考察】

Osterix Tg マウスでは骨芽細胞増殖が亢進し骨芽細胞数は増加していたが、骨芽細胞分化が著明に抑制されていた。この結果、骨形成速度は低下し、骨の脆弱化を引き起こした。

Osterix Tg マウスは、type I コラーゲンプロモーターRunx2 Tg マウスと異なる表現形を示し、両者は骨芽細胞分化過程で異なる作用を持つことがわかった。Runx2 Tg マウスでは破骨細胞を引き寄せる osteopontin を強発現する未熟骨芽細胞が蓄積され、皮質骨で骨融解が進行していた。これに対し、Osterix Tg マウスの未熟骨芽細胞では osteopontin の発現は低下しており、骨融解の亢進は認められなかった。これは osteopontin の発現が上昇する前から Osterix による分化抑制作用が働いたためと考えられる。Runx2 Tg マウス、Osterix Tg マウスともに骨芽細胞の成熟抑制がみられたが、骨細胞数の著明な低下は Runx2 Tg マウスのみで観察された。これは Runx2 が、骨芽細胞が骨基質に取り込まれる時に関与する因子の発現を抑制しているためと考えられる。

今回の検討から Osterix は間葉系幹細胞が骨芽細胞系列へ分化決定された前骨芽細胞の増殖を促進し、その後の分化過程では、早期から分化を抑制する働きを持つことが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、骨芽細胞特異的に Osterix を過剰発現させたトランスジェニックマウスにおける骨芽細胞の分化機能を検討したものである。その結果、Osterix トランスジェニックマウスでは骨芽細胞数は増加したが、前骨芽細胞から未熟骨芽細胞への分化、さらに成熟骨芽細胞への分化が抑制され、骨が脆弱化した。従って、Osterix は前骨芽細胞の増殖に必要な因子であり間葉系幹細胞から前骨芽細胞への分化決定に必須の因子として機能した後、その後の分化過程においては抑制的に働くことが明らかとなった。

以上の研究結果は、Osterix と骨芽細胞分化の関連を考察する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。