The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Krüppel-like factor 4　は骨格の発生を制御する
Author(s)	道上, 郁美
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59284
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

【33】

氏　　名	道上郁美（みちかみいくみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯学）
学位記番号	第　２５０４１　号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 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	Krüppel-like factor 4 は骨格の発生を制御する
論文審査委員	（主査） 教　授　大嶋　　隆 （副査） 教　授　脇坂　　聡　　准教授　西村　理行　　講　師　上松　節子

論文内容の要旨

【緒言】

Krüppel-like factor 4 （ Klf4 ） は Krüppel ファミリーに属し，C 末端近傍に３つの zinc finger モチーフをもつ転写因子である．腸および皮膚での発現が顕著であり，腸管においては Klf4 が canonical Wnt 経路に拮抗し，増殖抑制因子として作用することが明らかになっている．発見当初より骨芽細胞に *Klf4* が発現することは知られていたが，骨芽細胞における Klf4 の作用はいまだ報告されていない．このため本研究では，骨芽細胞における Klf4 の作用およびその機序を解明することを目的とした．

【方法と結果】

①骨芽細胞特異的に Klf4 を発現するトランスジェニック（TG）マウスの作製

Klf4 cDNA を *type 1 collagen* promoter/enhancer 配列の下流にクローニングしたトランスジェニック発現ベクターを受精卵に注入し，骨芽細胞に特異的に Klf4 を発現するトランスジェニック（TG）マウスを作製した．胎生 18.5 日齢マウス胎仔骨格染色像において TG マウス胎仔では，膜性骨化によって生じる頭蓋冠の石灰化の遅延だけでなく，内軟骨性骨化により生じる下顎頭や四肢においても，未石灰化領域の拡大が認められた．

②Klf4 による骨芽細胞分化の抑制

膜性骨化の遅延は，胎生 18.5 日齢 TG マウス胎仔前頭骨切片における von Kossa 染色，*type 1 collagen* の発現においても確認された．そこで、この Klf4 による骨芽細胞の分化抑制が，骨芽細胞自律的な作用であるかを確認するため，*in vitro* において，マウス頭蓋冠より調製した初代骨芽細胞に，レトロウィルスシステムにより Klf4 を過剰発現させ，骨芽細胞分化における Klf4 の作用を，アルカリホスファターゼ染色，アリザリンレッド染色，およびリアルタイム PCR を用いて解析した．コントロールと比較して， Klf4 を過剰発現させた細胞では，アルカリホスファターゼ活性も石灰化も顕著に抑制された．また，この培養骨芽細胞についてリアルタイム PCR をおこなった結果，多くの骨芽細胞遺伝子の発現が低下していた．しかし，オステオカルシンの発現は培養期間を通じ増加していた．

③ Klf4 による canonical Wnt 経路の活性化

腸管においては， Klf4 が canonical Wnt 経路に拮抗し，増殖抑制因子として作用することから，骨芽細胞における Klf4 の canonical Wnt 経路に対する作用を検討した．Klf4 を過剰発現させた初代骨芽細胞において，canonical Wnt 経路により誘導される *Axin2* の発現上昇が認められた．また，同骨芽細胞において Klf4 は，canonical Wnt 経路の下流で作用する TCF シグナルのレポーターを活性化した．さらに， canonical Wnt 経路を活性化するリチウムおよび SB216763 を添加すると，骨芽細胞の石灰化が強く抑制された．

④内軟骨性骨化における Klf4 の影響

内軟骨性骨化により生じる上腕骨において，HE 染色，アルシアンブルー染色および *in situ* hybridization を行ったところ，TG では軟骨細胞の正常な分化は認められるが，一次骨化中心の形成が認められず，一次骨化中心形成予定領域は軟骨基質が占めていた．また，血管内皮細胞のマーカーである CD31 で検索すると，骨髄の形成に不可欠な血管進入が確認できず，TRAP 染色においては，破骨細胞が浸潤せずに 骨膜に停留していることが確認された．胎生 16.5 日齢マウス上腕骨のリアルタイム PCR の結果，協調的に石灰化軟骨基質を分解する *Mmp9* および *Mmp13* の発現が低下していた．さらに WT と比較し，TG マウスでは破骨細胞の停留している部位で，オステオカルシンがより早期に強く発現していた．

⑤Klf4 によるオステオカルシンの転写制御

1.3kb オステオカルシンプロモーターを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果，コントロールと比較して Klf4 は約 5 倍，Runx2 と Klf4 では約 26 倍の転写活性が認められた．さらに Klf4 の作用部位を検索するため，マウスオステオカルシンプロモーターの欠失変異体を作成し，ルシフェラーゼ解析を行った結果，343kb の欠失変異体では，Klf4 による活性化が認められなかった．また，オステオカルシン転写開始部位上流 1.3Kb において，Klf4 が結合する可能性のある３つの site（site 1，site 2，site 3）を検出し，転写開始部位上流 500bp に位置する site 2 に変異を導入すると， Klf4 による活性化が認められず，クロマチン免疫沈降の結果，site 2 にのみ Klf4 の結合が認められた．mammalian two hybrid assay を行った結果，Klf4 と Runx2 が特異的に結合することが確認された．

【考察】

Klf4 が広範囲にかつ持続的に骨芽細胞に発現することにより，骨芽細胞の分化が抑制され，膜性骨化の遅延が認められた．*in vitro* の結果からこの分化抑制は骨芽細胞自律的であり，また，Klf4 による canonical Wnt 経路の活性化がその一因であることが示唆された．

また，内軟骨性骨化においては，破骨細胞浸潤および血管進入が阻害され，一次骨化中

心ならびに骨髄腔の形成が認められなかった．TG におけるオステオカルシンの誘導部位と破骨細胞の局在が一致していたことから，軟骨膜におけるオステオカルシンの発現上昇と軟骨細胞における *Mmp* の発現低下により，破骨細胞浸潤が阻害されたと考えられた．これは，正常な内軟骨性骨化において，適切な時期に骨膜における *Klf4* の発現が低下する必要があることを示唆している．以上の結果から，厳密な発現制御によって，Klf4 が骨芽細胞の分化および血管内皮細胞と破骨細胞の遊走を調整し，正常な骨格の発生を制御していることが示唆された．

論文審査の結果の要旨

本研究は，骨芽細胞に特異的に Krüppel-like factor 4（Klf4） を発現するトランスジェニックマウスを作製してその表現型を解析するとともに，*in vitro* における Klf4 による骨芽細胞の分化制御作用を調べることにより，転写因子 Klf4 の骨芽細胞ならびに骨格の形成に対する作用機序を検討したものである．その結果，厳密な発現制御によって，Klf4 が骨芽細胞の分化および血管内皮細胞と破骨細胞の遊走を調整し，正常な骨格の形成を制御していることが明らかになった．

以上の研究結果は，骨格の形成における Klf4 の作用とそのメカニズムを明らかにし，正常な骨格の形成機序を理解する上で重要な示唆を与えるものであり，博士（歯学）の学位授与に値するものと認める．