

博士論文

論文題目: 破骨細胞における新規骨量調節因子

Dennd2A の生体内機能解析

氏 名: 辻 直也

目次

論文の内容の要旨	4
略語一覧	8
第一章 序論	10
第一節 骨組織と骨代謝制御機構	
第一項 骨リモデリングとカップリング	
第二項 骨構成細胞	
第二節 破骨細胞の分化制御と機能制御	
第一項 破骨細胞分化の制御機構	
第二項 破骨細胞の多核成熟化と骨吸収活性	
第三節 Small GTPase family と guanine nucleotide exchange factor(GEF)の生理機能	
第一項 Small GTPase family 分子の生理機能	
第二項 GEF 分子の生理機能	
第三項 GEF 分子による骨代謝調節	
第四節 DENN/MADD family 分子の構造と生理機能	
第一項 DENN/MADD family 分子の種類と構造的特徴	
第二項 DENN/MADD family 分子の生理機能	
第五節 破骨細胞における Dennd2A の発現	
第一項 材料と方法	
第二項 破骨細胞分化と Dennd2A の発現パターン	
第六節 本研究の目的	
第二章 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出	32
第一節 緒言	
第二節 遺伝子欠損マウス作出の概要	
第一項 targeting vector による標的遺伝子組換え	
第二項 Cre/loxP システムについて	
第三節 targeting vector の構築	
第一項 Dennd2A targeting vector の設計	
第二項 材料と方法	

第四節	Dennd2A 遺伝子相同組換え ES 細胞クローンの取得	
第一項	材料と方法	
第二項	Dennd2A 遺伝子相同組換え ES 細胞の同定	
第五節	キメラマウスと Dennd2A <i>flox</i> マウスの作出	
第一項	材料と方法	
第二項	キメラマウスおよび Dennd2A <i>flox</i> マウスの出生確認	
第六節	全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウス(Dennd2A ^{-/-})の作出	
第一項	材料と方法	
第二項	Dennd2A ^{-/-} の出生確認	
第三章	全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの表現型解析	66
第一節	緒言	
第二節	全身的な表現型解析	
第一項	材料と方法	
第二項	Dennd2A ^{-/-} の生育と臓器	
第三節	骨組織における表現型解析	
第一項	材料と方法	
第二項	X 線学的手法を用いた解析	
第三項	骨形態計測を用いた解析	
第四項	血中骨代謝マーカーの解析	
第四節	破骨初代培養細胞を用いた <i>in vitro</i> 解析	
第一項	材料と方法	
第二項	初代培養細胞における破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現	
第五節	小括	
第四章	総合討論	95
第一節	本研究の成果 I. Dennd2A <i>flox</i> マウスおよび Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出	
第二節	本研究の成果 II. Dennd2A の骨代謝制御機構における生体内機能の解明	
第三節	今後の課題と展望	
参考文献		104
謝辞		110

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 23 年度博士課程 進学

氏 名 辻 直也

指導教員名 秋山 徹

論文題目 破骨細胞における新規骨量調節因子 Dennd2A の生体内機能解析

第一章 序論

破骨細胞は骨吸収を担う主要な骨細胞種の一つであり、正常な骨代謝及び骨量維持に必要な役割を果たしている。破骨細胞は造血幹細胞由来のマクロファージ系前駆細胞から分化し、細胞融合により多核成熟化する細胞である。多核成熟化した破骨細胞は、Cathepsin K などのプロテアーゼ群や酸を分泌することで骨吸収を行う。破骨細胞の分化や機能制御の概要は明らかにされつつあるものの、骨量調節における破骨細胞分化・機能を制御する因子群の全容は明らかにされておらず、そのメカニズムも不明な点が多いのが現状である。

破骨細胞が正常な骨吸収を行うためには、細胞融合による多核成熟化が必須である。破骨細胞の融合・多核化には DC-STAMP をはじめとする様々な因子群が関与することが知られているが、細胞融合の際に起こるアクチン細胞骨格の再構築や細胞接着に寄与することが知られる Small GTPase family をターゲットとする guanine nucleotide exchange factor (GEF)の重要性が近年明らかになってきた。Rac GTPase をターゲットとする GEF の一種である Vav 3 のノックアウトマウスは、破骨細胞の走化性やアクチンリングの形成に異常を認め、多核成熟化破骨細胞の減少による骨吸収不全を主原因とする、骨量増加の表現型を呈することが明らかにされた<Nature Med. 2005 11(3): 284-90. >。

Vav 3 と同様な GEF 活性を持つタンパク質ドメインとして DENN/MADD ドメインがよく知られている。DENN/MADD ドメインを有するタンパク質は 17 のファミリータンパク質が存在し、それぞれ特異的な GTPase をターゲットにもつ GEF として機能していることが報告されている<J. Cell Biol. Vol. 191 No. 2 367-381>。なかでも我々は、Rab 9 特異的に働く GEF として知られる Dennd2A が、マウスの成熟破骨細胞に強く発現していること、破骨細胞の分化過程に沿って発現が上昇することを見出した。

Dennd2A は C 末端側に DENN/MADD ドメインを有するタンパク質であるが、その生体内機能に関してはほとんど明らかにされていない。Vav 3 と同様な GEF 活性をもち、破骨細胞の分化過程で顕著に発現が上昇することから、成熟破骨細胞において重要な機能を有し

ていることが強く示唆された。そこで本研究では、Dennd2A のノックアウト(KO)マウスを作出し、その表現型解析を行なうことで Dennd2A が実際の生体内、特に骨代謝制御機構においてどのような機能を持つのか明らかにすることを目的とした。

第二章 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出

KO マウスは、組織特異的な遺伝子欠損マウスの作出が可能な Cre/loxP システムを用いて行った。Dennd2A は 19 個の Exon から構成される 1000 個のアミノ酸からなるタンパク質である。Exon3 を欠損させると Exon2-4 の間でフレームシフトを起こすことができるため、Exon3 の 5'側及び 3'側に loxP 配列を挿入するよう targeting vector の設計を行った。BAC を鋳型とした PCR 増幅法により targeting vector を構築し、エレクトロポレーション法を用いて ES 細胞に導入した。ネオマイシンによる薬剤耐性を利用した選択の後、サザンブロット法により相同組換え体の確認を行った。取得した ES 相同組換え体をアグリゲーション法によりマウス 8 細胞期胚に導入し、得られたキメラマウスの germline transmission を確認した。キメラマウスを野生型マウスと交配して得られた Dennd2A flox マウスと、全身で Cre recombinase を発現する CMV-Cre トランスジェニックマウスを掛け合わせることで、全身で Dennd2A 遺伝子を欠損する Dennd2A total KO マウス(Dennd2A^{-/-})を作出した。生まれたマウスの遺伝子型をゲノム PCR によって調べたところ、Dennd2A のゲノム DNA の欠損を確認することができた。また、KO マウスから抽出した RNA を用いてリアルタイム PCR を行ったところ、KO マウスにおける Dennd2A の発現が 100%消失している事を確認した。

以上の結果より、Dennd2A flox マウス及び Dennd2A total KO マウス(Dennd2A^{-/-})の作出に成功した。

第三章 全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの表現型解析

1. 骨組織における表現型解析

まず初めに、作出した Dennd2A^{-/-} マウスの全身的な影響を調べたところ、Dennd2A^{-/-} マウスは lethality を示さず、対照群と比較して身長や体重、臓器重量には差を認めず、正常な生育を確認した。

次に X 線学的解析手法を用いた骨組織の表現型解析を行った。16 週齢において、軟 X 線撮影及び Dual energy X-ray Absorptiometry (DXA)法による骨密度測定を用いた骨解析を行ったところ、Dennd2A^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して X 線透過性の低下を認め、大腿骨骨密

度の有意な増加を示した。また、マイクロ CT を用いた大腿骨海綿骨領域の 3D 画像解析においても *Dennd2A*^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して有意な骨量増加を認めた。

この骨量増加の原因を探索するために骨形態計測を行ったところ、対照群と比較して *Dennd2A*^{-/-} マウスにおいて骨吸収パラメータの著しい低下を認めた。また血清中の骨吸収マーカーである TRAP-5b も *Dennd2A*^{-/-} マウスで低下していることがわかった。

2. 破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析

Dennd2A^{-/-} マウスの骨表現型解析により、*Dennd2A*^{-/-} マウスは成熟破骨細胞の減少による骨吸収不全を主原因とする、骨量増加の表現型を呈することが明らかとなった。この骨表現型の分子メカニズムの一端を明らかにするべく、マウス的大腿骨骨髓細胞から単離した、破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析を行った。

対照群と *Dennd2A*^{-/-} マウスの骨髓中からマクロファージ様の破骨前駆細胞を単離し、分化成熟に必須な M-CSF と RANKL 存在下で培養することで、細胞同士が融合した多核成熟破骨細胞へと分化させた。分化誘導後 TRAP 染色を行い、TRAP 陽性且つ核の数が 3 つ以上の細胞を多核成熟破骨細胞としてカウントした。対照群と比較して *Dennd2A*^{-/-} マウスの骨髓中から単離した細胞は成熟破骨細胞の数が顕著に減少しており、骨量増加の表現型と一致するものであった。また分化の段階にそって細胞を回収し、それぞれから抽出した RNA を用いて破骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、対照群と比較して *Dennd2A*^{-/-} マウス由来の破骨細胞は分化初期段階において、分化の master regulator である NFATc1 遺伝子の発現が低下していることがわかった。

以上の結果より、*Dennd2A* は破骨細胞の分化成熟過程において、分化を促進し成熟破骨細胞の数を増加させることで、骨量を負に調節する因子であることが明らかになった。

第四章 総合討論

本研究では、破骨細胞の分化・成熟に伴って *Dennd2A* の発現が上昇することに着目し、機能未知因子である *Dennd2A* の全身性遺伝子欠損マウスの作出および骨表現型解析を行うことで、骨代謝制御機構における *Dennd2A* の生体内機能の解明を試みた。

Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出

本研究では、Cre/loxP システムを用いることでより汎用性の高い *fllox* マウスの作出に成功した。*Dennd2A fllox* マウスと、目的の組織でのみ Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせることで、組織特異的な *Dennd2A* マウスの作出が簡単に行える。今後、全身だけでなく、様々な組織特異的 *Dennd2A* 欠損マウスを作出することで、より詳細な *Dennd2A* の生理機能の解明につながることを期待される。

Dennd2A は骨代謝制御機構において負の骨量調節因子として働く

Dennd2A は Vav 3 と同様に GEF 活性をもつ DENN/MADD ドメインを有するタンパク質であり、成熟破骨細胞に強く発現していることから、破骨細胞において重要な機能をもつ因子であることが示唆された。実際に全身性 Dennd2A 欠損マウスの骨表現型解析により、Vav 3 KO マウスとよく似た骨表現型を呈することが明らかになった。

Dennd2A^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して X 線透過性の低下を認め、大腿骨骨密度の有意な増加を示す。この骨量増加は多核成熟破骨細胞の減少による骨吸収不全を主要原因とするものであることが、骨形態計測と破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析から明らかとなった。

しかし、この骨量増加の表現型は雌の KO マウスでのみ見られ、雄の KO マウスでは有意な差を認めなかったことから、雄の骨組織においては何らかの代替経路が存在し、Dennd2A 欠損による影響が表面化していないことが推察された。Vav 3 の上流に位置する非レセプター型 tyrosine kinase である c-Src は、破骨細胞の分化の際に M-CSF の受容シグナルを PI3 kinase と協調して下流に伝えることで、破骨細胞の分化を促進する因子であることが知られている。c-Src は女性ホルモン受容体である ER α と協調して破骨細胞の Cathepsin K や TRAP の分泌量を調節することや、アポトーシスによって破骨細胞の寿命を調節することも近年明らかにされつつあることから、雌において Dennd2A 欠損の影響がより顕著に現れる一因であることも推察される。今後、更に詳細な分子メカニズムとともに、雌雄における骨量調節機構の差異の究明にも期待がかかる。

また今後は、Dennd2A の特異的なターゲットとして知られている Rab 9 の欠損によっても同様の表現型を呈するかどうかなど、破骨細胞の分化や機能制御機構のなかで、Small GTPase や GEF がどのような意義をもつかを明らかにしていく必要がある。

総括

以上、本研究では全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスを作出し、その骨表現型を解析することにより、骨代謝制御機構における Dennd2A の生体内機能の一部が、破骨細胞が担う骨吸収を正に制御することによる骨量調節への寄与であり、Dennd2A が新規骨量調節因子であることを解明することが出来た。今後、更に詳細な分子メカニズムが解明されれば、骨量調節における破骨細胞分化・機能を制御する仕組みの全容が明らかになることが期待できる。

略語一覽

ALP	alkaline phosphatase
AP-1	activator protein-1
BMD	bone mineral density
BV	bone volume
Cre	cyclization recombination
CMV	cytomegalovirus
DC-STAMP	dendritic cell specific trans-membrane protein
DENN	differentially expressed in normal versus neoplastic cells
DH	dbl homology
DHT	dihydrotestosterone
Dmp1	dentin Matrix Protein 1
DTA	diphtheria toxin A
DXA	dual energy X ray absorptiometry
E2	estradiol
ER	17 β -estrogen receptor
ERE	estrogen responsive element
ES cells	embryonic stem cells
flox	flanked by loxP
FLP	flippase
FRT	flp recombinase target
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GEF	guanine nucleotide exchange factor
ICM	inner cell mass
KO	knock out
loxP	locus of crossover of P1
MADD	MAPK activating death domain
M-CSF	macrophage colony stimulation
N	number
NFATc1	nuclear factor of activated T cells 1
Ob.S	osteoblast surface

Oc.S	osteoclast surface
OPG	osteoprotegerin
OS	osteoid
OVX	ovariectomy
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
PH	pleckstrin homology
RANK	receptor activator of NF-kappaB
RANKL	receptor activator of NF-kappaB ligand
Runx2	runt related gene2
SERM	selective estrogen-receptor modulator
TRAP	tartrate-resistant acid phosphate
TV	total volume
WT	wild type

第一章 序論

はじめに

骨は脊椎動物の運動器官の要であり、体の支持や姿勢の維持に必須な組織である。同時に、骨は生体内のカルシウムの 99%以上を保持するカルシウム貯蔵庫として働き、血中カルシウム濃度の維持にとっても必要不可欠である。骨組織では骨形成と骨吸収が常に行なわれ、ダイナミックに代謝されている。骨は細胞外基質と 4 種類の骨構成細胞、骨芽細胞(osteoblast)、骨細胞(osteocyte)、破骨細胞(osteoclast)、軟骨細胞(chondrocyte)から構成され、これら骨構成細胞は骨代謝において非常に重要な役割を果たしている(Fig1-1)。

破骨細胞は骨吸収を担う主要な骨細胞種の一つであり、正常な骨代謝及び骨量維持に必須な役割を果たしている。破骨細胞は造血幹細胞由来のマクロファージ系前駆細胞から分化し、細胞融合により多核成熟する細胞である。多核成熟化破骨細胞は、Cathepsin K などのプロテアーゼ群や酸を分泌することで骨吸収を行う。破骨細胞の分化や機能制御の概要は明らかにされつつあるものの、未だ骨量調節における破骨細胞分化・機能を制御する因子群の全容は明らかにされておらず、そのメカニズムも不明な点が多いのが現状である。そこで本研究では、骨代謝制御において重要な骨吸収を担う破骨細胞の分化・機能を制御する因子群の詳細と、作用メカニズムを明らかにすることを主目的とする。

序論ではまず、第一節で骨代謝調節を行う骨構成細胞と骨リモデリング機構について概説する。第二節では、骨構成細胞の 1 つである破骨細胞に着目し、破骨細胞の分化・成熟過程や骨吸収に関わる骨代謝調節因子群と骨代謝の関連について述べる。続いて、第三節では破骨細胞の分化や機能制御に関わることが知られる Small GTPase family と guanine nucleotide exchange factor (GEF)について、その生理機能や骨代謝制御機構における意義について概説する。

本研究は、GEF 活性をもつタンパク質の中でも、成熟破骨細胞において顕著に発現が上昇する Dennd2A に着目し、骨代謝制御機構における生理機能の解明を目指すものである。そこで第四節では、Dennd2A が属する DENN/MADD ファミリーの構造的特徴や、これまで明らかにされている生理機能について詳述し、第五章で破骨細胞における Dennd2A の発現パターンとその解釈について述べる。最後に、これらを踏まえ本研究の目的を述べる。

第一節 骨組織と骨代謝制御機構

第一項 骨リモデリングとカップリング

骨は生物の一生を通じて絶えず吸収と形成を繰り返しており、この機構はモデリング・リモデリングと呼ばれている。モデリングは成長期に生じ、全体の骨格系が成長する現象である。一方、リモデリングは骨格の形状、大きさの変化を伴わずに古い骨組織を新しい骨組織に代謝・置換する現象であり、生涯を通じて絶えず行なわれる。リモデリングの過程は、静止相・活性化相・吸収相・逆転相・形成相で構成されており、ヒトでは1サイクルが120-150日程度である(Fig1-2)。リモデリングは骨基質を破骨細胞が吸収することで始まり、その後骨芽細胞が吸収面に類骨を形成し、石灰化を行なうことで骨が形成される。正常な骨量はこの破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の均衡（カップリング）により維持されており、均衡の破綻（アンカップリング）は、骨粗鬆症に代表されるような骨代謝疾患を招く¹⁻⁴。

骨粗鬆症とは、破骨細胞による過剰な骨吸収によって骨密度(BMD: bone mineral density)が低下し、海綿骨領域の微小骨折等によって骨が全体的に脆くなった結果、骨折リスクが非常に高まった状態の事を指す。逆に骨吸収が阻害されると、骨密度は増加し骨は硬化するものの、新しい骨への置き換えが正常に起らなくなるために、脆弱で骨折しやすい状態に陥る。この状態を大理石骨病という^{5,6}。正常なリモデリングを維持し、健康な骨代謝環境を保つためには、破骨細胞による正常な骨吸収と骨芽細胞による骨形成が重要である⁷⁻¹¹ (Fig1-3)。

リモデリングの制御は、骨芽細胞や破骨細胞の増殖・分化・寿命を直接もしくは間接的に制御することにより行なわれ、その制御因子として内分泌系・神経系・免疫系から分泌されるサイトカインや成長因子、ホルモンなどが報告されている^{2,12-14}。

第二項 骨を構成する細胞

・破骨細胞

破骨細胞は骨吸収を担う骨構成細胞である。組織学的には TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)陽性で数個から数十個の核を含む多核細胞として確認することができ、その大きさは 20~100 μm の巨大な細胞である。

破骨細胞は造血系幹細胞由来のマクロファージ系前駆細胞から分化し、Fig1-4 に示すように骨芽細胞から M-CSF(Macrophage-Colony Stimulating Factor)を受容することによ

り増殖し,^{15,16} 同じく骨芽細胞からの破骨細胞形成因子である RANKL(Receptor activator of NF- κ B ligand)刺激を受容することにより分化と細胞融合による多核成熟化が促進される。^{17,18} 一方, 骨芽細胞から発現される RANKL のデコイ受容体である OPG(Osteoprotegerin)により分化を抑制される。¹⁹ このように破骨細胞の分化成熟は骨芽細胞からのシグナルにより厳密に制御されている。

多核成熟化した破骨細胞は吸盤のように骨表面に吸着し, 波状縁と呼ばれる刷毛状の器官から, 骨基質のミネラル分や有機質分解のための酸(H⁺)や Cathepsin K などのプロテアーゼを分泌することで骨吸収を行う。

・骨芽細胞

骨芽細胞は骨形成を担う細胞である。形状は大きさ 20~30 μ m の立方体状である。骨芽細胞は間葉系幹細胞に由来し, Runx2 や Osterix などの転写因子により分化制御され,²⁰⁻²² 前骨芽細胞を経て成熟骨芽細胞へと分化する。^{23,24} その後, 一部の細胞は自らが産生した細胞外基質中に埋め込まれ, 次に述べる骨細胞へと最終分化する。また一部の細胞は骨表面の休止骨芽細胞(lining cell)とよばれる細胞へ最終分化する。

骨芽細胞は分化に伴いさまざまな骨基質タンパク質を発現し, 分泌する。前骨芽細胞では, Type I Collagen やアルカリフォスファターゼ(ALP)を, 初期骨芽細胞ではオステオポンチンと骨シアロタンパクを, そして成熟骨芽細胞はそれらに加えてオステオカルシンを発現する。このように骨芽細胞は骨基質タンパク質を発現・分泌し, それらは一旦類骨(Osteoid)となった後, ハイドロキシアパタイト結晶が沈着し, 石灰化されることで骨が作られる。^{25,26}

・骨細胞

骨細胞はメカニカルストレスを受容し, それを伝達する細胞として知られ, 間葉系幹細胞が前骨芽細胞を経て成熟骨芽細胞へ分化した後, その一部が細胞外基質中に埋まり, 最終的に骨細胞へと分化する。骨基質の深部に埋まっており, 数は骨構成細胞の 90% 以上を占める。形状は神経細胞様の多数の細胞突起を持ち, それらで骨細胞同士, 骨細胞と骨芽細胞がギャップ結合で連絡している。骨芽細胞から骨細胞の分化には ATF4 が中心的役割を担っているとの報告がある。^{27,28} 機能はメカニカルストレスの受容のほかに,²⁹ カルシウム・リン代謝への関与,³⁰ 骨芽細胞分化のアンタゴニストである SOST(sclerostin)の発現がこれまでに報告されている。³¹ 近年, 骨細胞特異的に発現する遺伝子として Dmp1(Dentin Matrix Protein 1)が同定された。³²⁻³⁴

第二節 破骨細胞の分化制御と機能制御

第一項 破骨細胞分化の制御機構

細胞の増殖・分化や機能調節は、主に細胞外から加わるサイトカイン刺激によって制御されている。サイトカインによる刺激が核内の転写制御因子の活性を調節することで、標的の増殖・分化制御遺伝子の発現をコントロールする。破骨細胞においても、分化や機能制御には特異的な転写制御因子の作用が非常に重要である。

破骨細胞前駆細胞の増殖を促進するサイトカイン M-CSF は細胞膜上の c-fms を介して、破骨細胞分化を促進するサイトカイン RANKL は膜受容体である RANK に結合することで、それぞれ細胞内へと刺激を伝達し、その下流にある転写因子群を活性化する³⁵。下流に位置する転写制御因子のうち、Pu.1, NF- κ B, MITF, AP-1 を欠損した KO マウスは破骨細胞分化異常や骨吸収異常により、大理石骨病や骨硬化症を呈する。³⁶ さらに、NF- κ B, AP-1 の下流に位置し、破骨細胞分化のマスターレギュレータとして同定された NFATc1(nuclear factor of activated T cells 1)を欠損する細胞株において、破骨細胞分化が顕著に抑制されることが報告されている。近年、NFATc1 は核内において転写因子として働き、様々な破骨細胞分化や機能制御に関わる遺伝子をターゲットとして、その発現調節を担っていることが明らかにされた。³⁷⁻³⁹

第二項 破骨細胞の多核成熟化と骨吸収活性

破骨細胞は、分化の最終段階に単核の破骨細胞同士が細胞融合により結合し、多核化することで成熟破骨細胞へと分化することが知られている。破骨細胞同士の融合・多核化には、NFATc1 のターゲットの 1 つとして同定された DC-STAMP(dendritic cell specific trans-membrane protein)が必須であることが、KO マウスの解析により明らかにされた。DC-STAMP 遺伝子欠損マウス由来の破骨細胞は野生型マウス由来の細胞と比べて、TRAP 陽性かつ核を 3 つ以上もつ成熟破骨細胞の数が顕著に減少し、骨量増加を示す。DC-STAMP 遺伝子欠損マウス由来の破骨細胞は、分化マーカーの発現は正常であり、細胞融合のみが障害されていることも明らかにされた。^{40,41}

細胞融合の際に起こる、細胞骨格を支えるアクチンリングの再構築や、成熟破骨細胞が骨接着面に吸着して骨吸収を行うためには、Rho GTPase family と呼ばれる Small GTPase の働きが不可欠であることが近年明らかにされた。Rho GTPase の反応はそれぞれ特異的な GEF(guanine nucleotide exchange factor)によって媒介されるが、GEF はタンパク質輸送や

分泌に関わるリソソームの形成にも不可欠な因子であることもわかっている⁴²⁻⁴⁴。成熟破骨細胞は骨接着面の波状縁から、酸(H^+)や Cathepsin K などのプロテアーゼを分泌することで骨吸収を行うことから、GEF が破骨細胞の骨吸収能に関与している可能性も示唆される。

第三節 Small GTPase family と guanine nucleotide exchange factor(GEF)の生理機能

第一項 Small GTPase family 分子の生理機能

低分子量 GTP 結合タンパク質(Small GTPase)は哺乳類において約 150 種類が同定されており、構造と機能によって大きく 5 つのグループに分類される⁴⁵。Rho ファミリーは細胞骨格制御, Ras ファミリーは細胞増殖制御, Rab ファミリーと Arf ファミリーは小胞輸送の制御, Ran ファミリーは核内輸送を制御することが知られている⁴⁶⁻⁵⁰。

Rho GTPase は分子量約 21 kDa の単量体で働く低分子量 G タンパク質で, GDP 結合型が不活性体, GTP 結合型が活性化体であり, GDP-GTP 交換反応によって細胞内の分子スイッチとして働く。GDP-GTP 交換反応は GEF と GAP によって媒介され, Rho の種類によってその基質特異性は異なる(Fig1-5)。代表的な Rho 分子である Rac1, Rho A, Cdc42 は, 細胞骨格形成の際にアクチン再構築において特異的な作用を示すことが明らかにされた^{42,51-54}。

第二項 GEF 分子の生理機能

GEF は, 不活性型 Small GTPase に結合した GDP を GTP に置換することで活性型へと移行させる⁵⁵。GEF の多くは, 触媒活性を有する Dbl homology (DH)ドメインと, 隣接する Pleckstrin homology (PH)ドメインから成る。Rho GTPase family を標的とする GEF はヒトでは約 70 種類以上存在し, それぞれ特異的な Rho をターゲットにして触媒反応を行うことにより様々な生理機能を担っている^{56,57}。

第三項 GEF 分子による骨代謝調節

近年骨代謝領域において, Rac 1 をターゲットとする GEF タンパク質の一種である Vav 3 が骨量調節に関与している事が, KO マウスの解析により明らかにされた⁵⁸⁻⁶¹。Vav 3 遺伝子欠損マウスは, 破骨細胞の走化性やアクチンリングの形成に異常を認め, 多核成熟化破骨細胞の減少による骨吸収不全を主原因とする, 骨量増加の表現型を呈することが明らかにされた⁶²。Vav 3 の KO マウスの解析結果により, Vav 3 と同様に GEF 活性をもつ他の分子が, 骨代謝制御機構のなかでも, 破骨細胞の分化・機能発現を調節する役割を担っている可能性が示唆された。

第四節 DENN/MADD family 分子の構造と生理機能

第一項 DENN/MADD family 分子の種類と構造的特徴

Vav 3 遺伝子欠損マウスの解析結果より, GEF 活性をもつ分子が骨代謝制御機構において重要な機能を有する可能性が示唆された. GEF 活性を有するタンパク質の中でも, 骨組織において発現の高い分子をスクリーニングした結果, DENN(Differentially expressed in normal versus neoplastic cells)/MADD(MAPK activating death domain)タンパク質が破骨細胞において強く発現している事がわかった.

DENN/MADD family に属するタンパク質はヒトで 18 種類存在し, その構造的特徴により DENND1A-C, DENND2A-D, DENND3, DENND4A-C, DENND5A/B, DENND6A/B, MTMR5/13, DENN/MADD の 8 グループに大きく大別される(Fig.1-6). DENN/MADD family タンパク質はそれぞれ特異的な Rab GTPase をターゲットとし, GDP-GTP 交換反応を触媒する^{63,64}.

DENN domain は上流領域 uDENN(upstream), 中心領域 central DENN, 下流領域 dDENN(downstream)から構成され, 領域間は長さの異なるリンカーによって繋がっている. 8 グループのうち, DENND2 を除く 7 グループがタンパク質 N 末端側に DENN domain を有するが, DENND2 グループのみ C 末端側に DENN domain を有することがわかっている.

第二項 DENN/MADD family 分子の生理機能

DENN/MADD family タンパク質のうち, 生理機能が明らかにされているものがいくつかあるが, そのほとんどが神経細胞の分化に関する報告である. DENND2 は Rab9a/b 特異的な GEF として機能し, 神経分化の際のアクチンフィラメントの局在に関与する. ヒトの遺伝病の原因遺伝子として同定された DENND2B の欠損患者は, 神経細胞の分化異常による精神遅滞, 聴覚異常を呈する. また, 循環器や腎臓機能にも異常が報告されている⁶⁵⁻⁶⁷.

DENN domain は Rab GTPase の GEF として機能することから, DENN の欠損により小胞輸送や endocytosis 機構が破綻することで, 神経分化に異常が現れることが示唆された. しかし DENN family タンパク質が骨代謝調節に関与する報告はなく, DENN family や Rab GTPase が骨代謝調節機構のなかでどのような意義をもつかは不明である.

そこで次節では, DENN family タンパク質が骨組織, 特に破骨細胞においてどのような発現パターンを示すか調べることにした.

第五節 破骨細胞における Dennd2A の発現

第一項 材料と方法

骨髓由来初代破骨細胞培養

8 週令の C57BL6/J の大腿骨を採取し、骨髓細胞を回収し M-CSF 存在下で培養を続けることで骨髓由来マクロファージを単離し、RANKL 刺激を与え破骨細胞に分化誘導した。

M-CSF, RANKL 添加等の実験スケジュールは Fig1-7 に示した。

○手順

1. マウスを屠殺後速やかに両足の大腿骨・脛骨を摘出する(繋がったまま)。
2. ピンセットをうまく使って肉をそぐ。コンタミ注意。
3. 10 cm シャーレの 70%EtOH→PBS→PBS→6well プレート PBS に回収。
4. Cell 室のクリーンベンチに移動。手袋変える。もう一度 PBS へ移す。
※ハサミ・ピンセットは 100%EtOH に付けて、火で炙ってから使用する。
5. 肉を削ぎながら骨端を切り、 α -MEM(10%FBS, M-CSF 抜き)で骨髓液をフラッシュ。
フラッシュ液を 50 mL ファルコンに回収する。サンプルごとに針を変える。
6. よくピペティングで懸濁しセルストレーナー(70 μ m メッシュ, BD Falcon)で濾す。
7. 1000rpm, 10min, 遠心後, 上清を除き 6 mL の培地によく懸濁する。
8. Ficoll-PaqueTM PLUS(GE, store at 4°C) 4 mL を 15 mL ファルコンに静かに注ぐ。
※壁に液が付かないようにピペットの先を底まで入れる。
9. 7 の懸濁液を 8 に静かに加える。液同士が混ざらないように慎重にピペットを斜めに壁に付けて伝わせて落とす。
10. 2000rpm, 15min, 遠心する。
11. 上清の赤い培地部分をアスピレートし、ブルーチップで中間層を 2~3 mL 新しいファルコンに回収する。
12. 培地を足して 10 mL まで up. Wash \times 2(1000rpm, 5min, 遠心)
13. マウス 1 匹あたり 2 枚の normal 6 cm dish(Falcon)に撒き 37°C で培養。培地は 4 mL/dish。
14. 8~10 時間後に培地を新しいファルコンチューブに回収し、遠心して上清を除く。
15. α -MEM(10%FBS, 100 ng/ml M-CSF)に懸濁し、細胞数をカウントする。
16. 2×10^5 cell/well になるように 24 well プレート〈BD Falcon〉に播種する。
17. 48 時間後から RANKL(100 ng/ml)刺激を開始する。
18. スケジュールに従って分化 DAY0, DAY2, DAY4, DAY5 の時点で細胞回収し、RNA を抽出する。

細胞からの RNA 抽出

○手順

1. 細胞の回収

破骨細胞に分化誘導した初代培養細胞を実験スケジュールに従って各段階で回収した。メディウムを除去し PBS で洗浄し, 1well 当たり ISOGEN を 1 ml 加えて馴染ませた後, セルスクレーパーで細胞を剥がし取りエッペンに回収した。

2. RNA 抽出

ISOGEN 液を 26G の注射針を用いてピペッティングした後, クロロホルム 200 μ l を加え激しく攪拌し, 13000 rpm で 15 分間遠心した。その後, 上清を 450 μ l 回収し等量のイソプロパノールを加え, 13000 rpm で 15 分遠心した。上清を捨て, ペレットを 70%エタノールで洗浄し, 13000 rpm で 5 分間遠心を行った。上清を捨て, 軽く乾燥後, 適量の DEPC 水で溶解した。

3. DNase 処理

濃度を測定し, total RNA 20 μ g を以下の組成(*1)の液に入れ, 37°Cで 30 分間 DNase 処理を行なった。

(*1) DNase 処理組成

Total RNA	20 μ g
10×DNase 1 Buffer	5 μ l
DNase 1	2 μ l
RNase OUT	1 μ l
DEPC 水	total 50 μ l

反応後 100 μ l にフィルアップし, フェノール・クロロホルムを 100 μ l 加えよく攪拌し, 10000 rpm で 5 分間遠心した。その上清に等量のクロロホルムを加え, 10000 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨て, そのペレットを 70%エタノールで洗浄した。上清を捨てペレットを乾燥させ, 適量の DEPC 水で溶解した。

4. 逆転写反応

濃度測定後, 以下の組成 (*2) のものを 37°C15 分で逆転写する。逆転写後, 85°C5 秒で逆転写酵素を失活させ, 4°Cで保持した。

(*2)

5×Buffer	2 μ l
Enzyme Mix	0.5 μ l
Oligo DT	0.5 μ l
Random primer (6mer)	0.5 μ l

RNA	1 μ g
DEPC 水	total 40 μ l

組織からの RNA 抽出

8 週令の C57BL6/J マウスを屠殺し, 各組織を適量切り取り, ISOGEN を 1 ml を加えてホモジナイザーで破碎する. RNA 抽出及び DNase 処理は細胞と同様の方法で行った.

Real-time PCR

調製した cDNA を 1 μ l と SYBR Premix EX Taq II (Takara Bio. Inc.)を用いて反応液を調製.

Thermal Cycler Dice (Takara Bio. Inc.)を用いて検出した.

各遺伝子の発現確認は以下のプライマーを用いて行った.

• Dennd1A

F: 5'-GGCAATTCCCAGAGGACTACA-3'

R: 5'-GTGAGGCTGTCCACATAGAAGG

• Dennd2A

F: 5'-ACACGCACTTTATCGGAGGAG-3'

R: 5'-GAGATGCGGGGAAAGTCAAG-3'

• Dennd3A

F: 5'-GACTGCCTCTCCTGTTTATTGACTC-3'

R: 5'-AGGCGGTGGACTAGGTATTAAGG-3'

• Dennd4A

F: 5'-AGTAAAGGAGAGAGCCCACCAC-3'

R: 5'-TATACCGCAGATCCCCACATAC-3'

• Dennd5A

F: 5'-CCTTTGATCAGGATGCAGTAGGA-3'

R: 5'-CCCAAATGTCCGAGAACCA-3'

• MADD

F: 5'-CTAGGCAAGAACTGGGCATC-3'

R: 5'-ACTGGACTTCTCCTCCACTAGCA-3'

第二項 破骨細胞分化と Dennd2A の発現パターン

DENN family タンパク質が破骨細胞においてどのような発現パターンを示すか確かめるため、マウスの骨髄細胞から単離した破骨初代培養細胞を用いて、DENN family mRNA の発現量を Real-time PCR で解析した。

その結果、DENN family の中でも特に Dennd2A, Dennd3, MADD は破骨細胞で強く発現しており、Dennd2A のみ破骨細胞の分化過程に沿って、発現量が顕著に上昇することが明らかになった(Fig.1-8-A)。また、Dennd2A は全身にユビキタスに発現しており、特に脳、肺、骨、白色脂肪組織において強い発現を認めた(Fig.1-8-B)。

以上の結果から、Dennd2A が破骨細胞の分化や機能制御に寄与し、重要な生理機能を有する分子である可能性が強く示唆された。

第六節 本研究の目的

以上の背景より, Small GTPase family と GEF の生理機能は多岐にわたり, Vav 3 の KO マウスの表現型からもわかるように, 骨代謝領域においても非常に重要な役割を担っている事が強く示唆された. なかでも, Dennd2A はマウスの破骨初代培養細胞の分化に沿って発現量が顕著に上昇することから, 破骨細胞の分化や骨吸収に関与し, 骨代謝調節を行っていることが推察された. しかしながら, 骨組織に着目した Dennd2A の機能解析を行った例は現在のところなく, 特に遺伝子欠損マウスの作出例や個体レベルでの解析報告は皆無である.

そこで本研究では, 機能未知因子である Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出を行い, 骨組織,

特に破骨細胞での機能解析を行うことを目的とした.

まず第二章では, Dennd2A の targeting vector の構築・相同組換え ES 細胞株の取得と, アグリゲーション法によるキメラマウスの取得から全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出まで行った. 続く第三章では, 作出した遺伝子欠損マウスの全身的な表現型解析から, 特に骨組織を中心とした表現型解析を行い, 骨組織における Dennd2A の生理機能の解明を試みた.

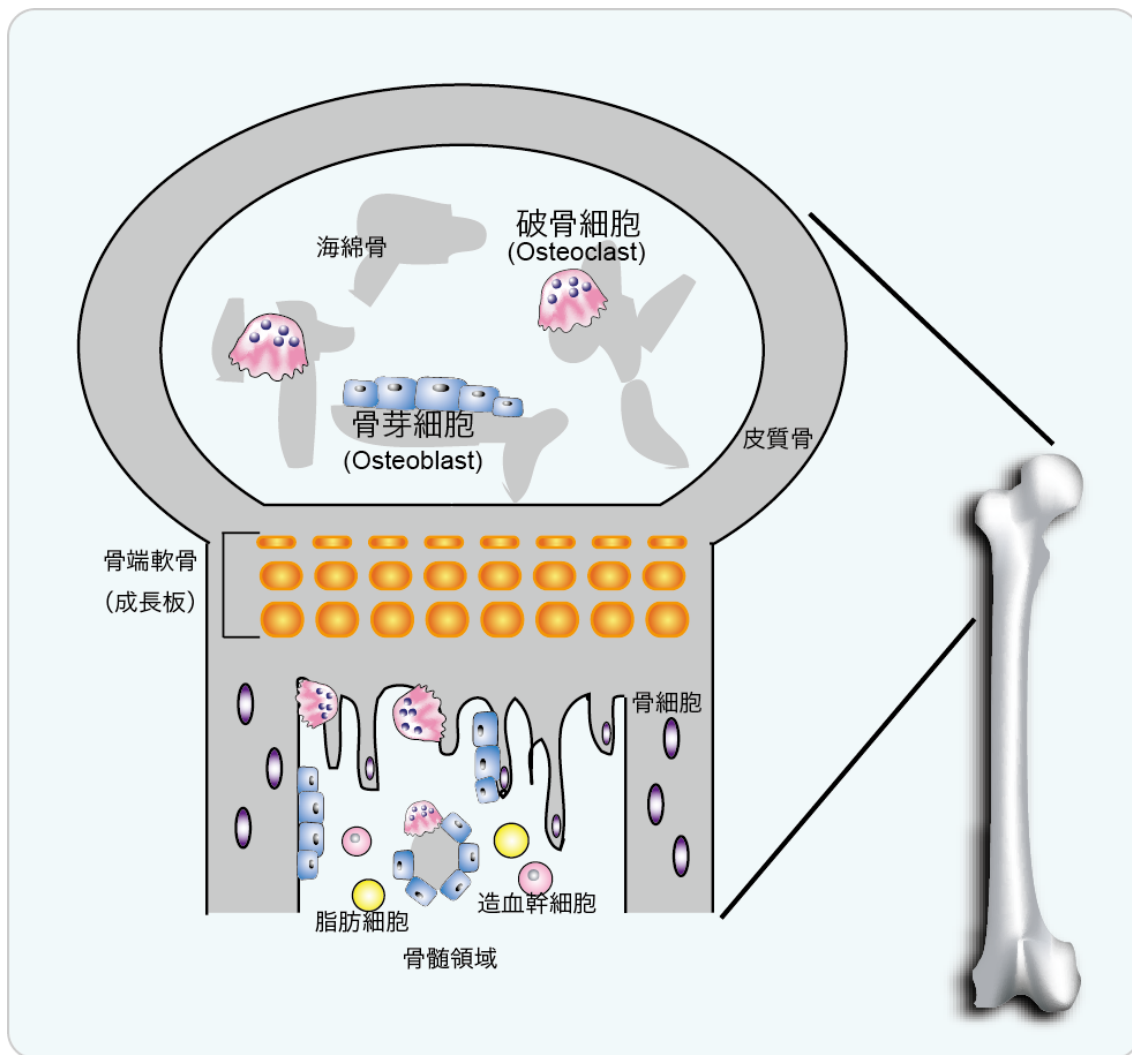


Fig 1-1 骨組織とそれを構成する細胞

骨組織は骨構成細胞（骨芽細胞，破骨細胞，骨細胞，軟骨細胞）のほか骨髓内の血球系細胞や脂肪細胞など多様な細胞で構成されている。

外側の骨は皮質骨と呼び，内側の，枝分かれした骨梁の 3 次元的な網目構造をとっている骨を海綿骨と呼ぶ。

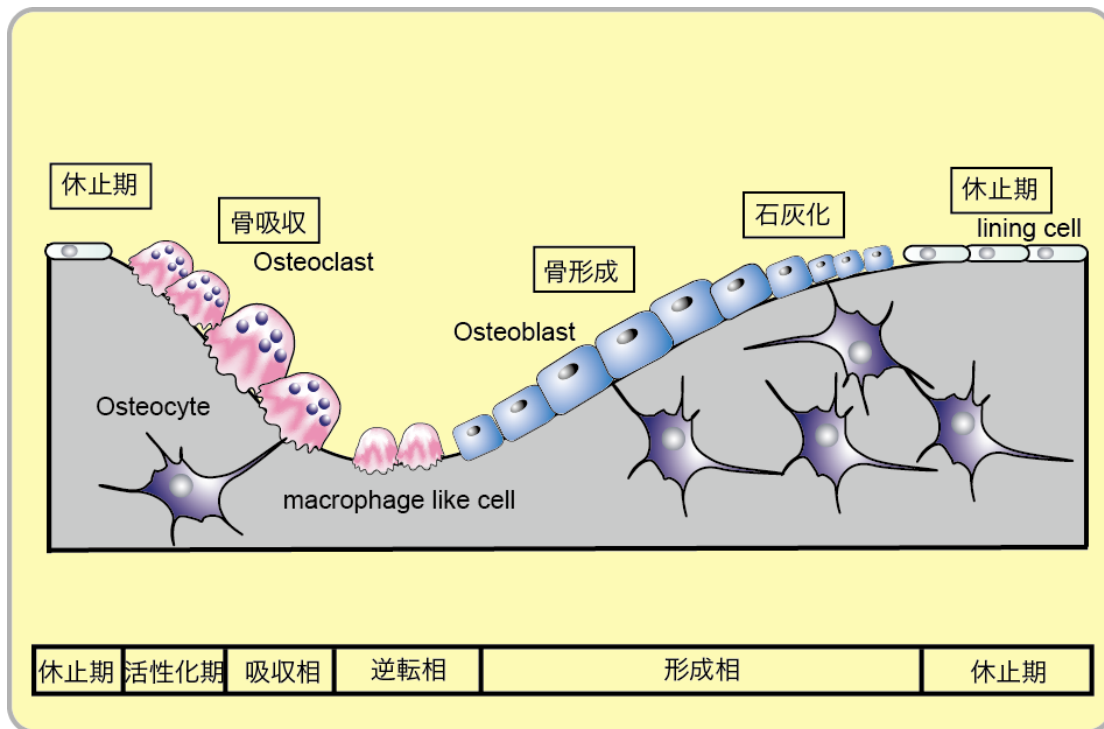


Fig 1-2 骨リモデリングのサイクル

リモデリングの過程は、静止相・活性化相・吸収相・逆転相・形成相で構成されており、ヒトでは1サイクルが120-150日程度である。

リモデリングは骨基質を破骨細胞が吸収することで始まり、その後骨芽細胞が吸収面に類骨を形成し、石灰化を行なうことで骨が形成される。正常な骨量はこの破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の均衡(カップリング)により維持されており、均衡の破綻(アンカップリング)は、骨粗鬆症に代表されるような骨代謝疾患を招く。

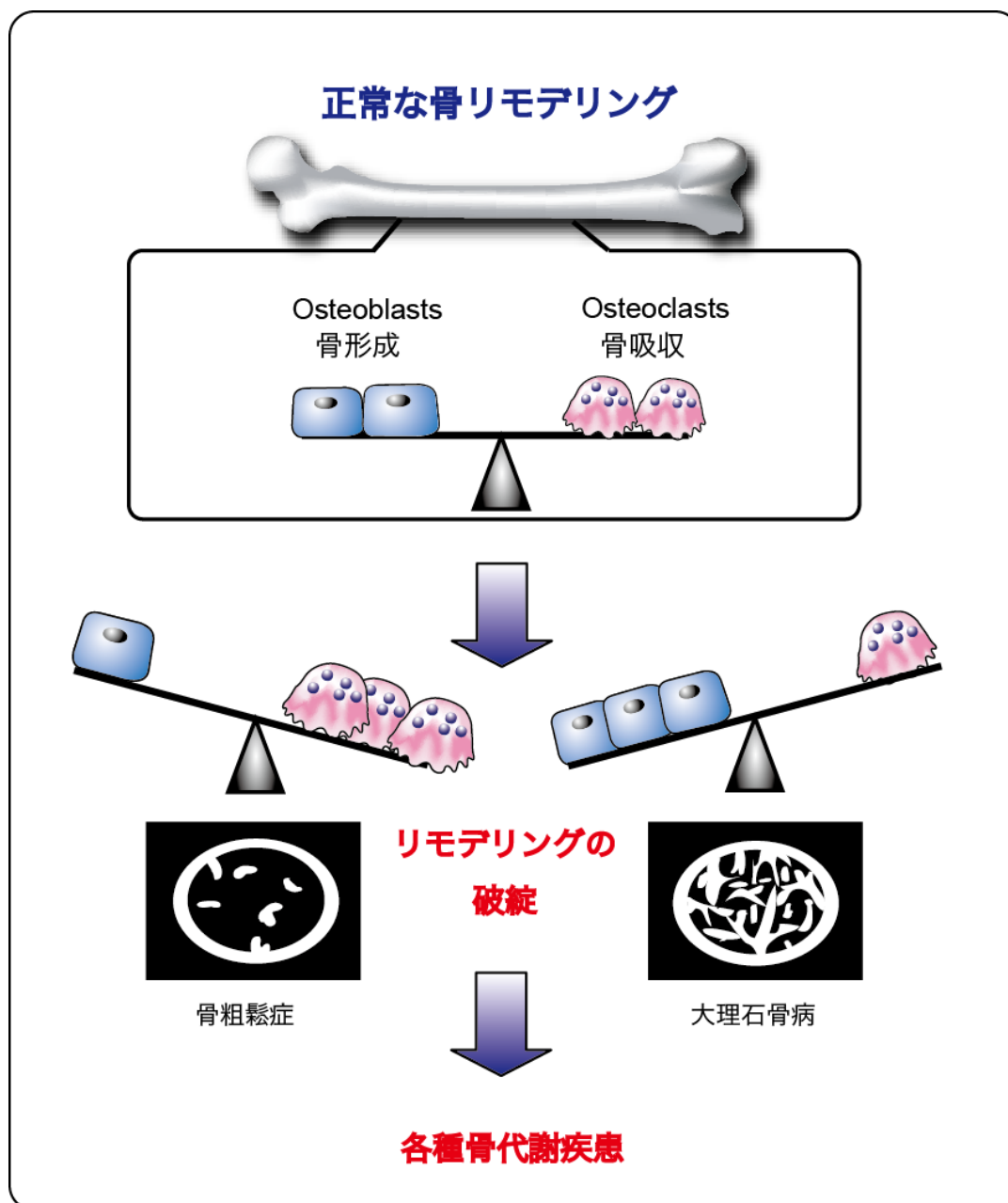


Fig 1-3 リモデリングの破綻と骨代謝疾患

正常な骨組織の維持には骨リモデリングのバランス維持が不可欠である。
骨吸収と骨形成のバランスが崩れると、骨粗鬆症や大理石骨病といった骨代謝疾患を発症する。
いずれの病態においても骨折しやすくなり、リモデリングのバランスは非常に重要である。

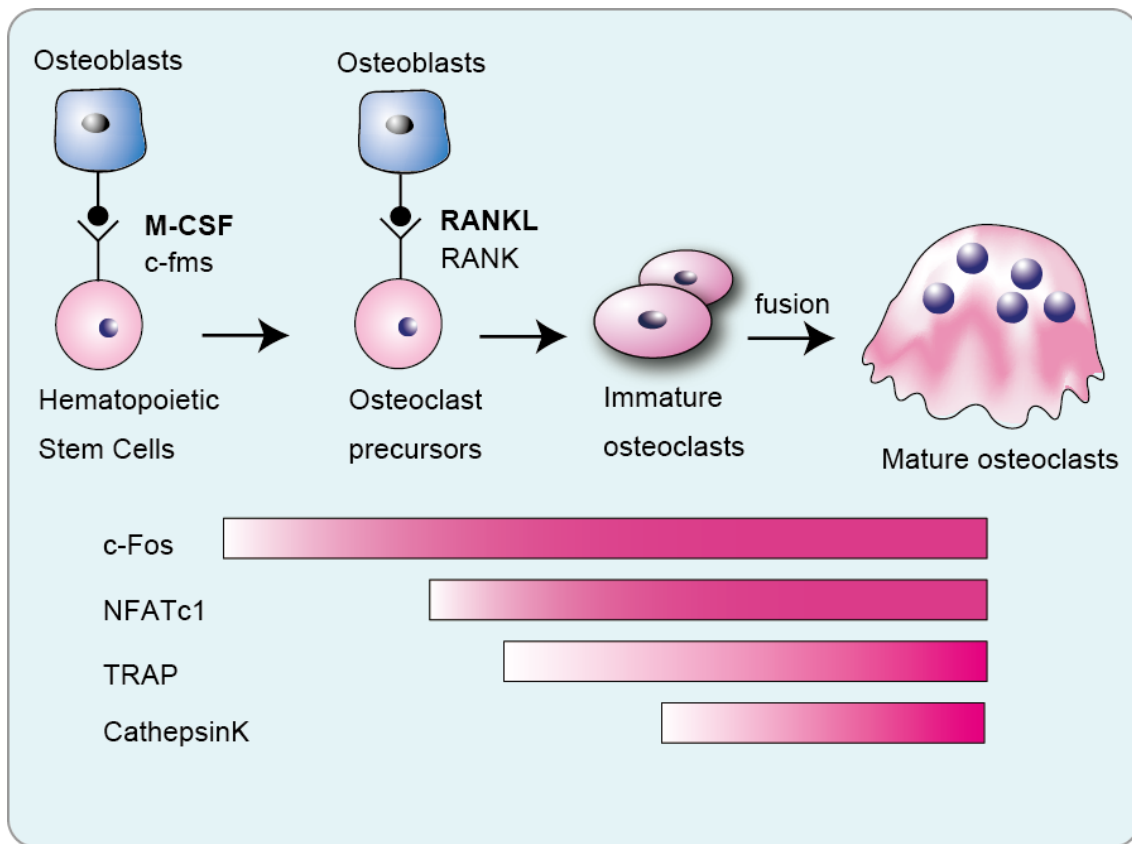


Fig.1-4 破骨細胞の分化制御因子

破骨細胞は、骨芽細胞の発現する M-CSF, RANKL 刺激を受容することで分化する。その過程で、様々な転写因子 (c-Fos, NFATc1) や酒石酸ホスファターゼ (TRAP), Cathepsin K などのプロテアーゼを発現する。TRAP や Cathepsin K などは成熟破骨細胞のマーカーとして使用される。

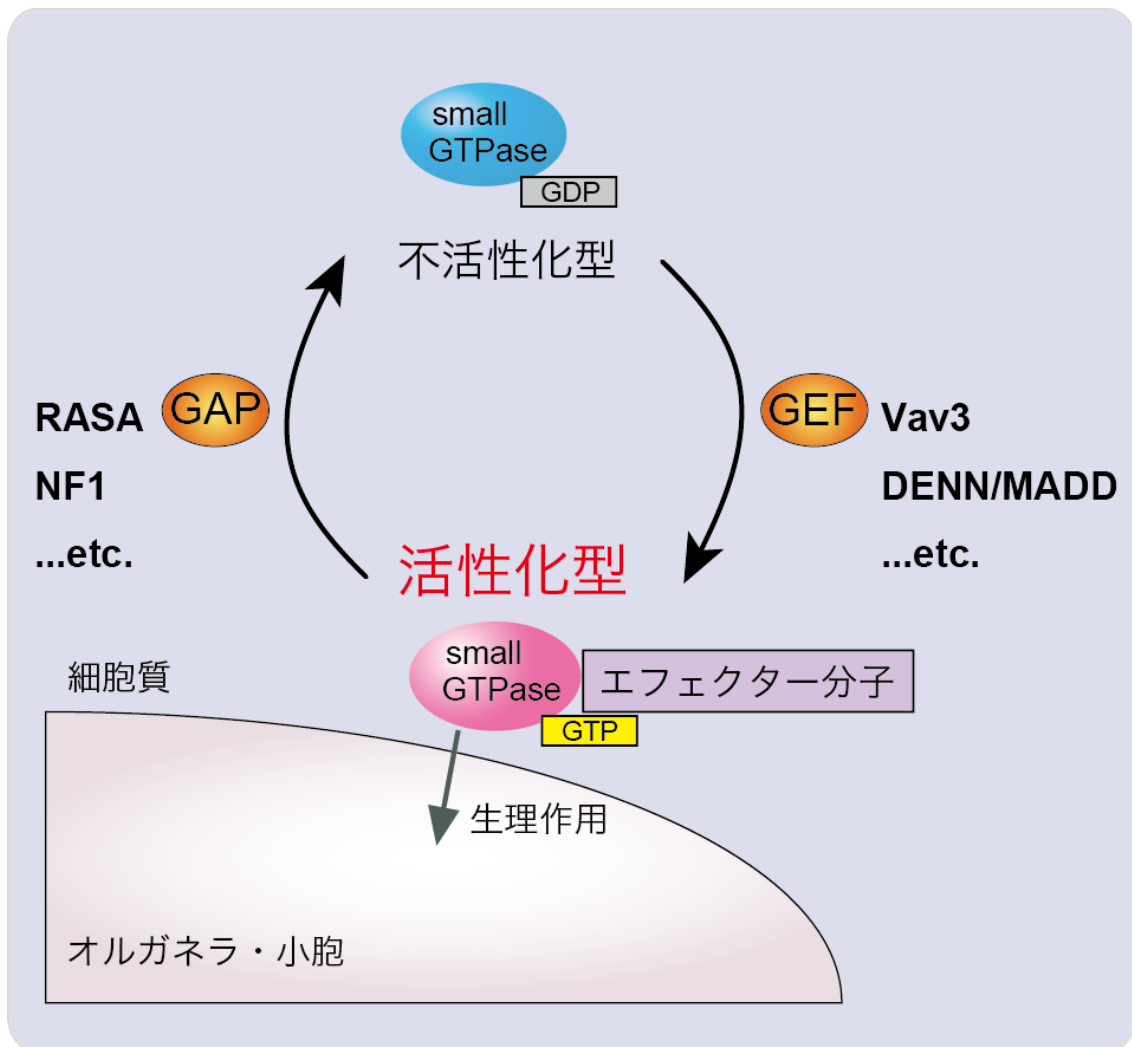


Fig.1-5 Small GTPase family と GEF の作用機序

Small GTPase family は GDP 結合型が不活性化体, GTP 結合型が活性化体であり, GDP-GTP 交換反応によって細胞内の分子スイッチとして働く。GDP-GTP 交換反応は GEF と GAP によって媒介され, Small GTPase family の種類によってその基質特異性と生理作用は異なる。

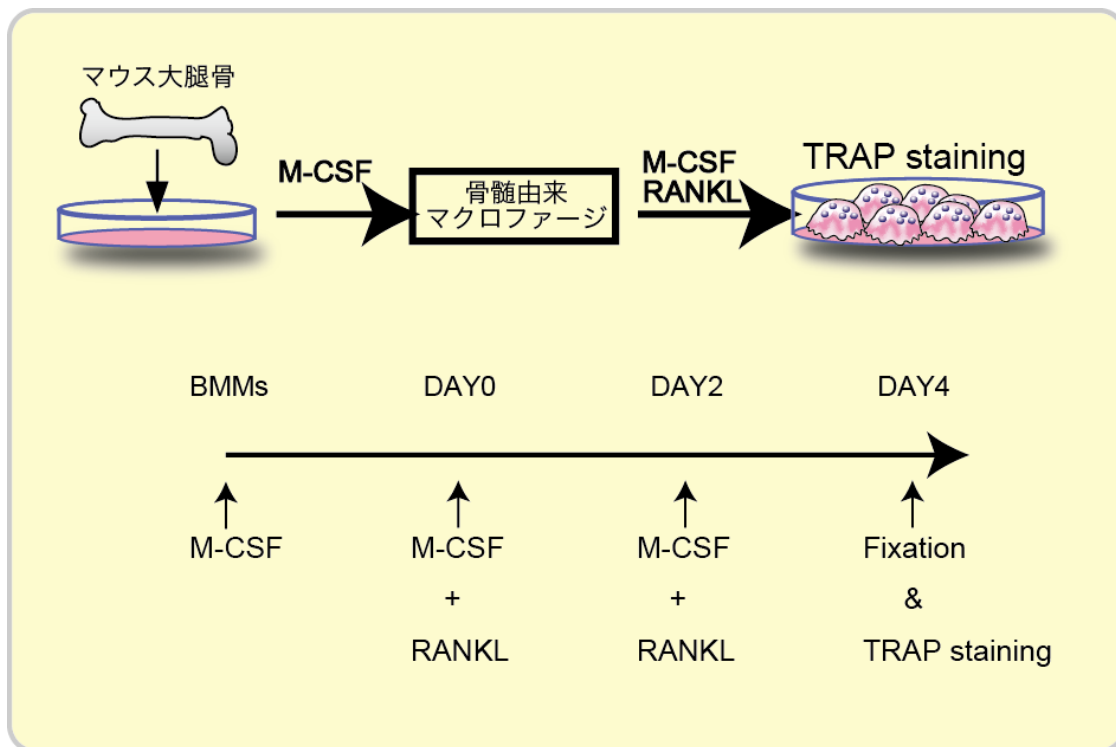
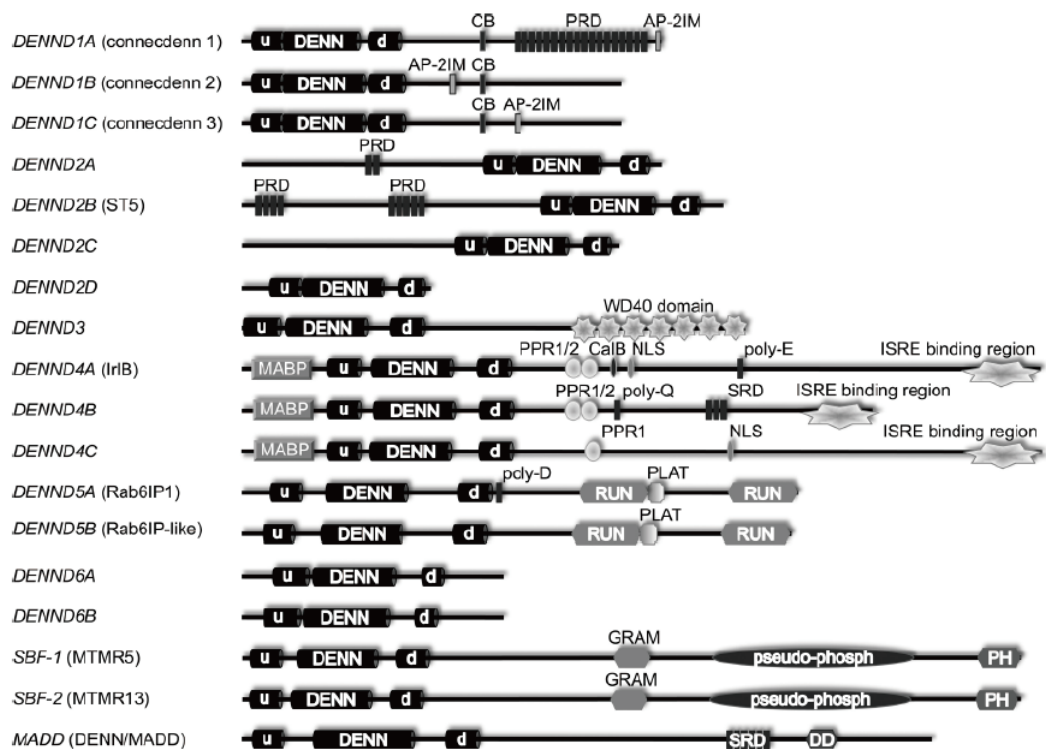


Fig 1-7 破骨初代培養細胞の分化実験の概要

生後 6~8 週齢程度のマウスの骨髓中には、未分化の間葉系幹細胞やマクロファージが豊富に存在し、細胞の増殖分化が盛んに起こっている。大腿骨から骨髓細胞をシャーレに回収し、M-CSF 存在下で培養を続けることで骨髓由来マクロファージ (BMMs) を単離する事が可能で、更に RANKL 刺激を与えると破骨細胞へと分化誘導することができる。通常、RANKL 刺激から 4 日目 ~5 日目で、細胞融合して多核化した破骨細胞が観察できる。分化した破骨細胞は固定後、TRAP 染色を行うと、TRAP 陽性の成熟破骨細胞は赤色に染まる。



[Marat AL et al., J. Biol. Chem. 2011 Apr 22;286(16):13791-800]

Fig 1-6 DENN/MADD family の二次構造

DENN/MADD family に属するタンパク質はヒトで 18 種類存在し、その構造的特徴により DENND1A-C, DENND2A-D, DENND3, DENND4A-C, DENND5A/B, DENND6A/B, MTMR5/13, DENN/MADD の 8 グループに大きく大別される。

DENN domain は上流領域 uDENN(upstream), 中心領域 central DENN, 下流領域 dDENN (downstream) から構成され、領域間は長さの異なるリンカーによって繋がっている。

8 グループのうち、DENND2 を除く 7 グループがタンパク質 N 末端側に DENN domain を有するが、DENND2 グループのみ C 末端側に DENN domain を有することがわかっている。

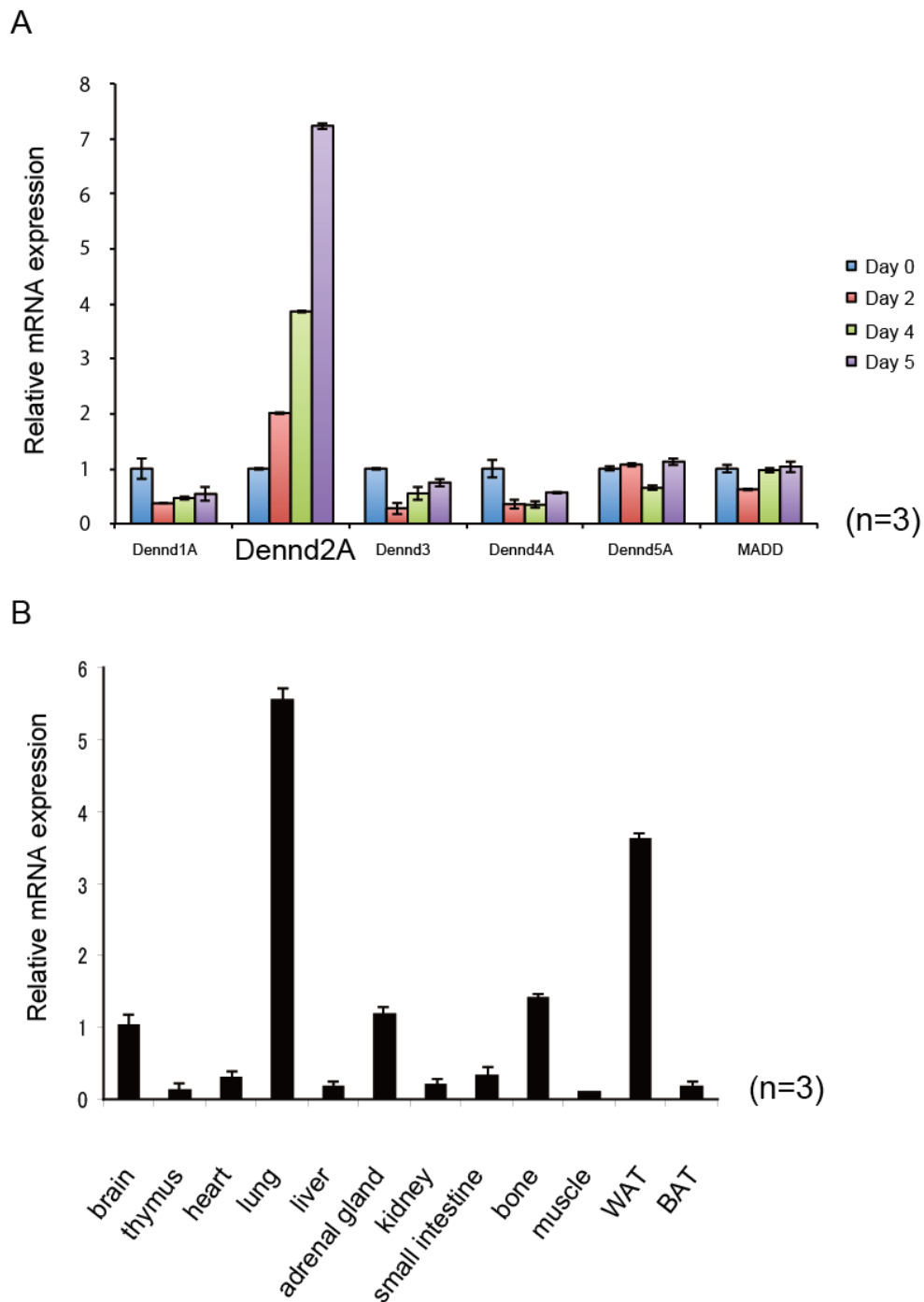


Fig 1-8 破骨細胞における Dennd2A の発現

A. マウス破骨初代培養細胞における Denn family タンパク質の発現 (n=3)

破骨細胞の分化段階に沿って回収し，抽出した RNA を用いて Real-time PCR を行った．

B. マウス組織における Dennd2A 発現パターン (n=3)

マウスの各組織より RNA を抽出し，Dennd2A の発現を Real-time PCR により確認した．

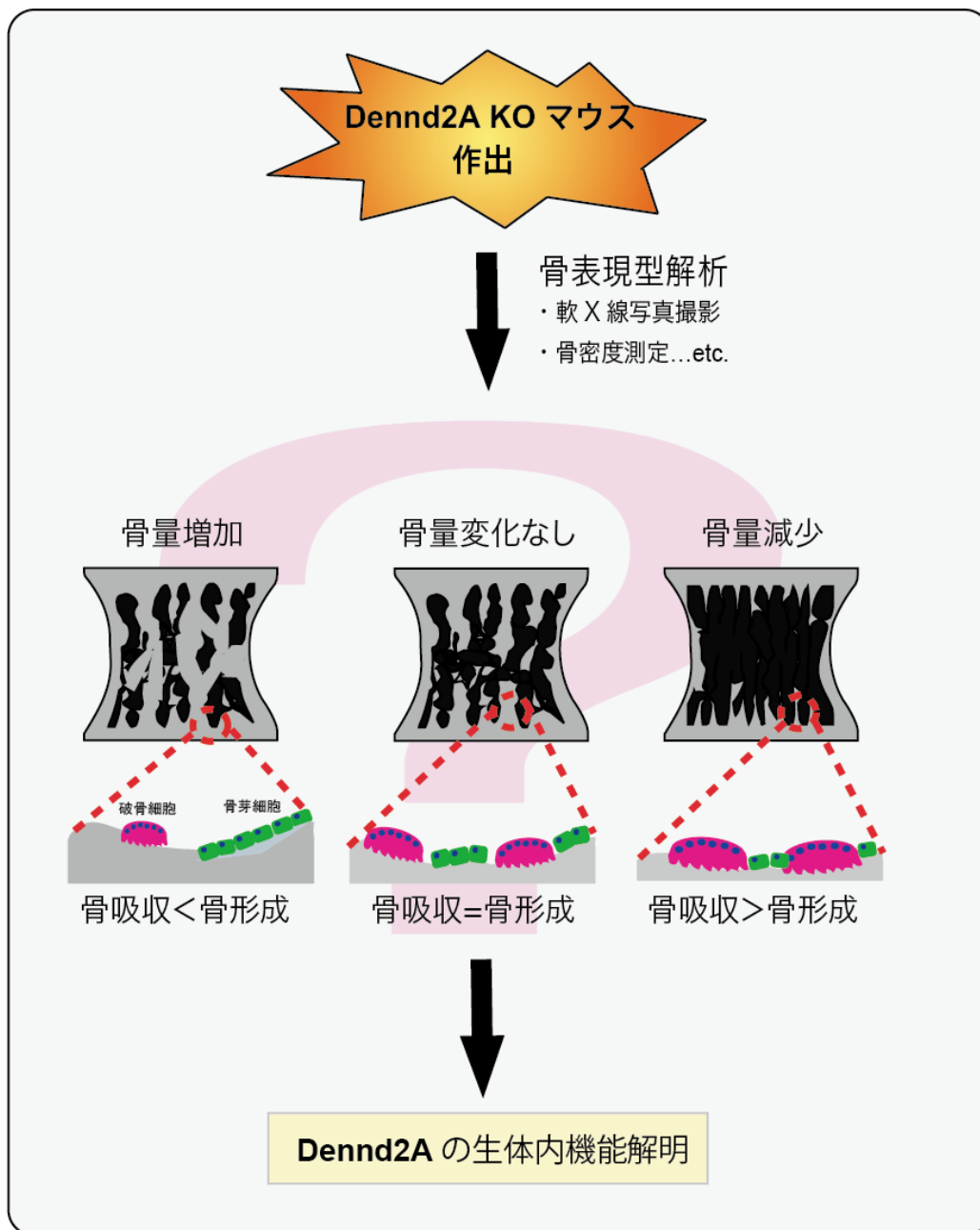


Fig 1-9 本研究の目的

Dennd2A はマウスの破骨初代培養細胞の分化に沿って発現量が顕著に上昇することから、破骨細胞の分化や骨吸収に関与し、骨代謝調節を行っていることが推察された。しかしながら、骨組織に着目した Dennd2A の機能解析を行った例は現在のところなく、特に遺伝子欠損マウスの作出例や個体レベルでの解析報告は皆無である。

そこで本研究では、機能未知因子である Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出を行い、骨組織、特に破骨細胞での機能解析を行うことを目的とした。

第二章 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出

第一節 緒言

ヒトとマウスは生理学的に似ているだけでなく、そのゲノム構成もよく類似しており、**gene targeting** 法によるノックアウトマウスの作出は、特定遺伝子のヒトでの生理的機能を生体レベルで検討する上で非常に有効な手段である。現在までに作出された様々な遺伝子のノックアウトマウスの解析によってもたらされた知見は計り知れない。

一方で、従来の標的遺伝子領域に **Neo** カセットを挿入するというノックアウトマウス作出手法では、その解析には限界がある。一つは標的遺伝子がマウスの発生に不可欠な因子であり、胎性致死に至る場合は成体での機能解析が出来ない。もう一つは、ある組織で見られた表現型の原因が、変異を起こした組織自体によるものなのか、他の組織や細胞を介した二次的作用によるものなのか判別が難しい場合である。この二つの問題を克服するために開発されたのが、**Cre/loxP** システムを用いたコンディショナルターゲティング法である。**Cre/loxP** システムを用いることで、任意の成長段階や組織特異的な遺伝子ノックアウトを容易に行うことが可能となった。

Dennd2A の生体内高次機能解析の為には **Dennd2A** 遺伝子欠損マウスの作出が必須である。第二章では、組織特異的な遺伝子欠損マウスの作出が可能な **Cre/loxP** システムを用いたコンディショナル遺伝子欠損マウスの作出を目的とし、**Dennd2A flox** マウス及び全身性 **Dennd2A** 遺伝子欠損マウスの作出を行った。

第二節 遺伝子欠損マウス作出の概要

第一項 targeting vector による標的遺伝子組換え

gene targeting は大きく分けて 3 段階の過程により行われる。

1. 標的遺伝子の targeting vector の構築
2. 標的遺伝子相同組換え ES 細胞株の樹立
3. 標的遺伝子相同組換え ES 細胞由来キメラマウスの作出

標的遺伝子の targeting vector には相同組換え領域の他に、ES 細胞のポジティブ選択マーカとしてネオマイシン耐性遺伝子を組込んでおく。targeting vector を ES 細胞に導入するには、電気パルスにより細胞膜に孔をあける事で DNA を取り込ませるエレクトロポレーション法を用いるのが一般的である。

ベクター導入後、ネオマイシンのアナログ薬剤である G418 によるポジティブ選択を行い、生き残った ES 細胞のゲノム DNA を用いてサザンブロッティングを行い、相同組換えクローンを同定する。

標的遺伝子相同組換え ES 細胞をアグリゲーション法によってマウスの 8 細胞期胚と共培養することで、ES 細胞を内部細胞塊(ICM)に取り込ませ、キメラマウスを作出する。キメラマウスにおいて、標的遺伝子相同組換え ES 細胞由来の細胞が生殖細胞ラインにコンバートされれば、次世代以降、常に全身で標的遺伝子相同組換えを起こした遺伝子改変マウスの作出に成功したといえる。

第二項 Cre/loxP システム について

Cre/loxP システムは、P1 バクテリオファージ由来の Cre recombinase とその認識配列である loxP サイトによる部位特異的組換え反応を応用したもので、1994 年に Rajewsky らによって初めてマウス個体への応用が報告された⁶⁸。

loxP 配列は 34 bp からなるパリンドローム構造を有した DNA 配列であり、Cre recombinase は 2 か所の loxP 配列を認識し、その間で組換えを起こす。このとき、loxP 配列が同じ方向に並ぶとその間の配列を切断し、逆方向に並んだ場合はその間を反転させる性質を有する⁶⁹⁻⁷³。

Cre/loxP システムを用いた遺伝子改変マウスの作出には、欠損させたい遺伝子領域の両端に loxP 配列を順方向に挿入した *flax* マウスと、標的組織特異的に Cre 遺伝子を発現する Cre マウスが必要となる。これらのマウス同士を交配する事で、任意の組織特異的に目的遺

伝子を欠損したマウス個体ができる。また、Cre と変異型 Estrogen Receptor のリガンド結合部位からなるキメラタンパク質である Cre-ER^{T2} を用いれば、SERM(Selective estrogen-receptor modulator)の一種であるタモキシフェン存在下ではじめて Cre を発現し、標的遺伝子の欠損を起こす事ができる。このシステムによって時期・部位特異的な遺伝子欠損が可能となる。

第三節 targeting vector の構築

第一項 Dennd2A targeting vector の設計

Dennd2A は Exon1~19 から構成され、coding region は Exon2~18 であり、1000 アミノ酸残基からなるタンパク質である。Exon3 を欠損させると Exon2~4 の間でフレームシフトを起こすことができるため、Exon3 の 5'側及び 3'側に loxP 配列を挿入するよう targeting vector の設計を行った。

Dennd2A targeting vector は PCR 法を用いて作製した。Dennd2A の BAC DNA をテンプレートに、相同領域を PCR 増幅し、シーケンスを確認した後に増幅断片を骨格ベクター (pBluescript II SK に、loxP-loxP-FRT-Neo/Kan^R-FRT コンストラクトを挿入したもの)に ligation した(Fig.2-3)。

第二項 材料と方法

マウス Dennd2A 遺伝子ゲノムの取得

遺伝子情報データベースサービス(NCBI および Ensembl)の情報を元に Dennd2A の遺伝子を含む BAC(bacterial artificial chromosome)クローンを購入した(BACPAC Resources Center)。クロラムフェニコール入りプレートに塗布し、生育した BAC クローンを LB 培地で培養した。アルカリプレップ法を用いて BAC DNA を抽出し、PCR によって目的配列挿入クローンをセレクションした。

BAC check 用プライマー

P1: 5'- TGAACACAGGAGGATTGCTG -3'

P2: 5'- TGCCAATCTGATGACTGCTC -3'

Product Size 550 bp

ターゲティングベクターの構築

まず 5'側に対応する制限酵素サイトを付加したプライマーを設計し、BAC DNA をテンプレートに、long arm と short arm の相同領域をそれぞれ PCR で増幅した。増幅断片を pBluescript にサブクローニングし、変異がない事をシーケンスで確認した。

次に、ランダムインテグレーションにより生育した ES クローンのネガティブセクションを行う目的で、pMC1-DTpA ベクターから DTA(diphtheria toxin A)を切出し骨格ベクターに ligation した。

最後にシーケンス確認した long arm と short arm の相同領域 fragment をそれぞれ順番に ligation し、結合領域前後のシーケンスに変異がないか確認して Dennd2A targeting vector を構築した(Fig.2-2).

結果と考察

Dennd2A 遺伝子を含むBAC クローンからPCRにより増幅したlong arm(5.1 kbp), short arm(1.0 kbp)のシーケンスを確認したところ、変異や欠損は認められなかった(Fig2-3 targeting vector MAP 参照).

ligationに使用した制限酵素サイトを用いた挿入断片の確認を行ったところ、long arm(5.1 kbp), short arm(1.0 kbp), DTA カセット(1.4 kbp)の切り出しをすべて確認し、Dennd2A targeting vector (total 12.5 kbp)の構築に成功したと判断した.

第四節 Dennd2A 遺伝子相同組換え ES 細胞クローンの取得

前節で構築した Dennd2A targeting vector を用いて相同組換え ES 細胞クローンの取得を目指した。ES 細胞の培養法および targeting vector の導入、相同組換えクローン同定の手順を以下に示した。

第一項 材料と方法

○ES 細胞

ES 細胞は C57BL/6 系統の雌と 129 系統の雄を交配させた F1 の 4 日目胚(胚盤胞)の内部細胞塊より樹立された M1 細胞〈理化学研究所〉で、生殖系キメラマウスを効率良く作成することが確かめられているものを用いた。

○Feeder 細胞

neo-resistant Primary Cultured Cell 〈オリエンタル酵母〉

○plasmid

loxP-loxP-FRT-Neo-FRT / pBluescript II SK

○試薬調製

○ESM 〈KOHJIN BIO, D-MEM (H), 500 ml, 4°C〉

1. 37°C water bath にて非働化済 FBS (50 ml×2), 200mM L-glutamine (6 ml / 15 ml tube)を解凍する。
2. 15 ml tube に D-PBS 〈Wako〉を 5 ml 入れ, 2-mercaptoethanol を 17.5 ml 加え, tube ごと攪拌する。(→2ME soln.)
3. 15 ml tube に, 200 mM L-glutamine 6 ml, MEM NEAA 〈GIBCO〉 5 ml, 2ME soln. 500 µl を加える。
4. 空の 500 ml ボトル(DMEM stock 用)に DMEM 〈KOHJIN BIO.〉を 100 ml 移す。
5. Filter に 50 ml シリンジをセットし, 調製した 3 と FBS を filtration する。
6. LIF 〈CHEMICON〉の tube を flash 後, 100 ml (50 ml×2)をボトルに加える。
7. 4°C, 一晩静置する。
8. 50 ml tube に 40 ml ずつ分注し, 4°Cにて保存する。(使用期限: 2 週間)

○PFM 〈Wako, D-MEM (High glucose), 500 ml, 4°C〉

1. 37°C water bath にて FBS (75 ml)と penicillin-streptomycin (2.5 ml)を解凍する。
2. 50 ml シリンジに Filter をセットし, Medium へ Filtration する。
3. 4°Cにて保存。(使用期限: 3 週間)

○FBS 非働化 〈JRH, 500 ml, Lot ; 1K0142, -20°C〉

1. FBS を water bath 37°Cにて解凍する.
2. Water bath を 55°Cにセットし, 55°Cになってから 30 min incubation.
3. 室温まで冷却後, 4°Cまで冷却する.
4. 50 ml tube に 50 ml ずつ分注後, パラフィルムを巻いて-20°Cにて保存する.

○LIF 〈白血病阻害因子, CHEMICON, 1 ml, 4°C〉

1. 滅菌済 1.5 ml Tube に 50 ml ずつ分注し, 4°CBOX にて保存する.

○MMC 〈Mitomycin C, SIGMA, 2 mg×3, 4°C〉

1. 18G 針を付けた 5 ml シリンジにて ES 用 PBS から 5 ml 取り, バイアルのゴムキャップに刺して MMC 粉末を攪拌する. (バイアル 1 本につき PBS 5ml)
2. 溶解後の MMC を 3 本分まとめて新しい 50 ml Tube に入れる.
3. 滅菌済 1.5 ml Tube に 750 ml ずつ分注し, 4°CBOX にて保存する.

○G418 〈GENETICIN, NACALAI, 50 mg/ml, 100 ml, 4°C〉

1. 滅菌済 1.5 ml Tube に 1 ml ずつ分注し, BOX にて 4°C保存する.

○Penicillin-Streptomycin 〈GIBCO, 100 ml, -20°C〉

1. 4°Cにて解凍後, 15 ml Tube に 5 ml ずつ分注する.
2. パラフィルムを巻き, -20°Cにて保存する.

○0.3% Gelatin

1. ゼラチン 〈SIGMA〉を 3 g 量り, 1 L スコットビンに入れる.
2. PBS に溶解させる.
3. Autoclaved

○0.05% Trypsin-EDTA 〈GIBCO, 100 ml, -20°C〉

1. 37°C water bath にて解凍する.
2. 15 ml tube に 10 ml ずつ分注する.
3. パラフィルムを巻き, -20°Cにて保存する.
4. 分注した Tube を一度解凍したら 4°Cにて保存する.

○200 mM L-glutamine 〈GIBCO, 100×, 20 ml, -20°C〉

1. 37°C water bath にて解凍する.
2. 15 ml tube に 6 ml ずつ分注する.
3. パラフィルムを巻き, -20°Cにて保存する.

○作業手順

1) Feeder 細胞の準備

ES 細胞を G418 (Neomycin アナログ)で薬剤選別を行なう場合はフィーダー細胞も耐性のものが必要であり, Neomycin 耐性遺伝子のトランスジェニックマウスより調製した fibroblast を購入して用いた. 以下にフィーダー細胞調整の手順を示す.

○ゼラチンコート (Feeder まきの前日に行う)

1. 調製・滅菌済み (4°C保存) の 0.3% Gelatin を nunc 製の dish / plate に入れる. (事前に温めなくてよい) 10 cm→5 ml, 6 cm→2 ml, 24 well→300 μ l, 48 well→200 μ l
2. 37°C, 2 hr~1 day incubation.

○Feeder cell 培養&stock

①Feeder 起こし

1. 前日に 10 cm dish×5 or 10 枚をゼラチンコートする.
2. 15 ml tube に冷 PFM を 9 ml 取り, PFM ボトルを 37°C water bath にて温める.
3. 液体窒素タンクから Feeder を 1 or 2 本取り, 37°C water bath にて解凍する.
4. 2 ml ピペットにて Feeder を 15 ml tube に移し, medium にて共洗いする.
5. 1000rpm, 3 min, 4°C遠心する.
6. Tube の上清を吸引後, tube の底を tapping する.
7. 10 cm dish のゼラチンを完全に吸引し, 温 PFM を 9 ml ずつ入れる.
8. Tube に温 PFM を 5 or 10 ml 入れ suspend 後, dish に 1 ml ずつ加える.
9. 顕微鏡にて確認後, dish を揺らす.
10. 37°C, 3 days culture する.
11. 培養から 3 日目に温 PFM 10 ml にて Medium change する.

②MMC 処理&stock (培養から 4 日目に行う)

1. 50 ml tube に温 PFM 30 ml と MMC 750 ml を入れる.
2. 10 cm dish の medium を吸引後, MMC 入り PFM を 10 ml ずつ入れる.
3. 37°C, 2.5 hr incubation. (正確に)
4. 温 PBS 5 ml にて dish を 2 回 wash する.
5. 温 Trypsin を 1 ml 加え, 室温にて 80 秒程度振とうする.
6. 温 PFM を 4 ml ずつ加え, pipetting しながら 50 ml tube に回収する.
7. 温 PFM 5 ml にて 10 cm×5 枚分を共洗いし, 50 ml tube に加える.
8. 細胞を 30 ml 取り, 細胞数をカウントする.
9. 1000rpm, 3 min, 4°C遠心する.
10. 上清を吸引後, tube の底を tapping する.

11. 0.5×10^7 cells / ml / tube となるようにセルバンカーを加え, 1 ml ずつ serum tube に入れる.

12. Freeze box に入れ, -80°C にて保存する. (使用期限: 1~2 ヶ月)

○Feeder cell まき (MMC 済 Feeder 使用, ES まきの前日に行う)

1. Feeder まきに必要な量を計算する.

1×10^6 cells / 3 ml / 6 cm, 7.2×10^4 cells / 200 ml / well (48 well plate)

3.5×10^4 cells / 200 ml / well (48 well plate, for southern)

7×10^4 cells / 400 ml / well (24 well plate, for southern)

2. 15 ml tube に PFM を 8~9 ml 入れ, PFM のボトルを 37°C water bath にて温める.

3. -80°C stock の MMC 済 Feeder (0.5×10^7 cells / vial) を取り出し, 37°C water bath にて解凍する.

4. 2 ml ピペットにて Feeder を 15 ml tube に移し, 共洗いする.

5. 1000rpm, 3 min, 4°C で遠心する.

6. Dish / plate のゼラチンを完全に吸引する.

7. 15 ml tube の上清を吸引後, tube の底を tapping する.

8. 6 cm dish には温 PFM を 2 ml ずつ加える.

9. 温 PFM を 15 ml tube に加え, suspend 後, dish / plate にまく (6 cm dish には 1 ml ずつ入れる. total : 3 ml PFM / 6 cm dish)

10. Dish / plate に日付を記入し, 軽く攪拌後, 顕微鏡にて確認する.

11. Dish を上下左右斜めに 10 回ずつ揺らし, 細胞が均一になるようにする.

12. 37°C , 1 day culture する.

2) ES 細胞の培養

通常使用する ES 細胞は 6 cm dish 上で植え継ぐ. 培地は 5 ml 使用する. 培地交換は毎日, 植え継ぎは 2 日ごとに行なう. 以下に ES 細胞培養の手順を示す.

○ES (M1, WT)の培養開始

1. 冷 ESM 9 ml を 15 ml tube に入れる.

2. 液体窒素内の BOX から serum tube を 1 本取り出し, 37°C water bath にて解凍.

3. 2 ml ピペットにて ES cell を 15 ml tube に移し, 軽く共洗いする.

4. 1000rpm, 3 min, 4°C で遠心.

5. 遠心中に Feeder をまいた 6 cm \times 1 枚を温 ESM 2 ml にて Medium change する. (PFM を

吸引後, ESM を 2 ml 加え, CO₂ incubator に入れる)

6. Tube 内の上清を吸引後, tube の底を tapping し, ESM 5 ml にて suspend する.

7. Feeder dish の ESM を吸引後, ES cell を全量まく.

8. 顕微鏡にて細胞を check し, dish を上下左右に揺らす.

9. 37°C, 1 day culture する.

10. 2 日目に植え継ぎを行う場合のみ Medium change を行う.

(dish 内の medium を吸引後, 温めた ESM を 5 ml 入れる. PBS での wash なし)

11. コロニーの大きさを確認し, 翌日又は 2 日目に植え継ぎを行う.

○植え継ぎ① (6 cm×1 枚→6 cm×3-4 枚, 2×10^5 cells / 6 cm dish)

1. Feeder をまいた 6 cm×3-4 枚の medium を吸引後, 温 ESM 2 ml にて wash する.

2. Medium を吸引後, 温 ESM を 2 ml 加え, CO₂ incubator に入れる.

3. ES を温 PBS 2 ml にて 2 回 wash する.

4. 温 Trypsin を 1 ml 加え, dish を揺らし側面を軽く叩きながら 60-80 sec 処理する.

5. 温 ESM を 2 ml 加え, dish 底にかけながら suspend 後, 15 ml tube に移す.

6. 1000rpm, 3 min, 4°C遠心.

7. 上清吸引後フタを閉め, tube の底を tapping する.

8. Tube 中下を持ち, tube ラックの奥から手前に強くあてる.

同方向で 4 回行い, tube を反対側に向けさらに 4 回行う. (single cell にするため)

9. 温 ESM を 12 ml 加え懸濁後, Medium change した Feeder dish に 3 ml ずつ加える.

10. 顕微鏡にて細胞を check し, dish を上下左右に揺らす.

11. 37°C, 1 day culture する.

12. 翌日に 6 cm×2 枚→6 cm×11-12 枚に植え継ぐ.

○植え継ぎ② (6 cm×4 枚→6 cm×12 枚)

1. Feeder をまいた 6 cm×11-12 枚を温 ESM 2 ml にて wash する.

2. Medium 吸引後, 温 ESM を 4 ml 加え, CO₂ incubator に入れる.

3. ES を温 PBS 2 ml にて 2 回 wash する.

4. 温 Trypsin を 1 ml ずつ加え, dish を~80 sec 揺らして細胞を剥がす.

5. 温 ESM を 2 ml ずつ加え, pipetting 後 15 ml tube に移す.

6. 1000rpm, 3 min, 4°C遠心.

7. 上清を吸引後, tube の底を tapping する.

8. Tube をラックに 4 回ずつあてる.

9. 温 ESM を 12 ml 加え懸濁後, Medium change した Feeder dish に 1 ml ずつ加える.

10. 顕微鏡にて細胞を check 後, dish を上下左右に揺らす.
11. 37°C, 1 day culture する.
12. 翌日, 温 ESM 5 ml にて Medium change する.

3) Electroporation および selection

targeting vector は, QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi kit を用いて精製しておく.

targeting vector は制限酵素で linearize し, 精製してから Electroporation に用いる.

○制限酵素処理

1. 以下の組成で混合液を作り, 37°Cで一晩処理を行った.

DNA	500 μ l (550 μ g)
10×NEB 4 buffer	140 μ l
100×BSA	14 μ l
AhdI	50 μ l (5 U/ μ l)
MilliQ	696 μ l
Total	1400 μ l

2. フェノール-クロロホルム処理 2 回, クロロホルム 1 回, エタノール沈殿を行った.
3. targeting vector を HBS に懸濁しておき, 濃度を測定した.

○Electroporation & Selection

1. Feeder をまいた 6 cm×16 枚を温 ESM 2 ml にて wash 後, 温 ESM 4 ml を加え CO₂ incubator に入れる.
2. 15 ml tube に PBS を分注し, 氷中保存する.
3. キュベットに DNA を 20~25 μ g 分入れる.
4. ES を温 PBS 2 ml にて 2 回 wash する.
5. 温 Trypsin 1 ml 加え, 60-80 sec 細胞をはがす. (5-6 枚ずつ持って揺らす)
6. 温 ESM 1 ml 加え, suspend しながら 15 ml tube に回収する. (5.5~6 枚/tube)
7. 温 ESM 2 ml にて 6 cm×6 枚を共洗いし, 15 ml tube に入れる.
8. Tube 内を suspend 後, 30 ml 取り, 細胞数をカウントする.
(total : 2×10^7 cells / EP あると良い)
9. 1000rpm, 3 min, 4°Cで遠心.

10. 上清を吸引し, tube の底を tapping する.
11. 冷 PBS 5 ml にて suspend する.
12. 1000rpm, 3 min, 4°Cで遠心.
13. 上清を吸引し, tube の底を tapping する.
14. 11-13 を 2 回繰り返す.
15. 2×10^7 cells / キュベット (total : 800 μ l)となるように冷 PBS にて suspend し, キュベットに加える.
16. RT, 5 min 静置する.
17. キュベットをキムワイプで拭き, EP の機械〈メーカー〉にセットする.
18. Set volts (kv)を押し, 240 V (.240)にセットする.
19. Set high cap (μ F \times 1000)を押し, (.500)にセットする.
20. Capacitance (μ F)を High にまわす.
21. 赤いボタンを同時に押し, ブザーの 2-3 sec 後に離す.
22. RT, 10 min 静置する.
23. 15 ml tube に温 ESM を 8 ml 入れる.
24. 1 ml ピペットにてキュベット内の ES を tube に移し, キュベット内を共洗いする.
25. 軽く suspend 後, medium change した Feeder dish \times 各 8 枚に 1 ml ずつ加える. (total : 5 ml / 6 cm dish)
26. 37°C, 1 day culture する. (18 hr 以上 culture する)
27. Selection for 1 week (7-8 days, G418 150 μ g/ml ESM, G418 30 μ l / ESM 40 ml)

4) Colony pick up

セレクション開始後 1 週間頃, G418 耐性コロニーが現れ始めたら pick up を行う.

1. 顕微鏡を 70% Et-OH にて拭いた後, ベンチ内に入れ, UV 灯を 10 min 程点ける.
2. 96well plate に Trypsin (温めなくてよい) を 100 ml ずつ入れる (1 日目に 5 or 4 colony ずつ取り, 1 colony につき Trypsin を 2 well 使用する).
3. Feeder をまいた 48well plate を G418 入り温 ESM 100 ml にて wash する.
4. Medium を吸引後, G418 入り温 ESM を 250 μ l ずつ入れ, CO₂ incubator に入れる.
5. P10 (5 μ l にセット), P200 (80 μ l にセット)ピペットを用意する.
6. 顕微鏡にて ES colony の形・大きさ・色・輪郭の良いものを check する.
7. P10 ピペットにて colony を medium ごと吸い取り, 1 つ目の Trypsin well に入れる.
8. 6 cm \times 2 枚分 (8-10 colony) を pick up する.
9. 顕微鏡にて 96 well に入れた ES colony を確認後, plate の底を見ながら P10 ピペットに

て colony を 2 つ目の Trypsin well に移す.

10. 顕微鏡にて移動した ES colony を確認する.

11. 80 ml に合わせたピペットにて 25 回 / well pipetting 後, 全量 48 well plate に移す.

12. Plate を揺らし, CO₂ incubator に入れる.

13. 6-11 を 6 cm×8 枚分繰り返す. (total : 4 回)

14. 1 日目の Pick up が終了したら, 6 cm×8 枚を G418 入り ESM にて medium change.

15. 2 日目に残りの ES colony を pick up する.

16. Pick up の翌日から stock するまで G418 入り ESM にて medium change を行う.

5) Stock および ES cell culture for southern blotting

colony pick up 後, 3~4 日後に sub-confluent となったものから順次 stock を行った.

○Stock & cell culture for southern blotting

1. DMEM 〈Wako〉 40 ml, FBS 10 ml, Glutamine 600 ml を 50 ml tube に調製する.

(→DMSO (-), Filtration なし, 1 回の EP で使用)

2. 新しい 50 ml tube に 1 で調製した medium を 18 ml 入れ, DMSO (1 アンプル分を 15 ml tube に移す) を 4.5 ml 加える. (→DMSO (+), stock 用 medium)

3. stock 本数分の serum tube を用意し, クローン名, 通し番号を記入する.

4. Feeder をまいた 24 well plate を温 ESM 500 ml にて medium change 後, CO₂ incubator に入れる.

5. ES を温 PBS 200 µl にて 2 回 wash する.

6. Trypsin を 100 µl ずつ加え, 20 sec ほど plate 側面を叩きながら細胞をはがす.

7. DMSO (-)の medium を 300 µl ずつ加える.

8. Serum tube のフタを取り, medium change した Feeder plate を用意する.

9. 1000 µl ピペットを 200 µl に合わせ, ES を 8 回 pipetting する.

10. 200 µl を serum tube に移し, 残り 200 µl を 24 well plate に入れる.

11. Serum tube に DMSO (+)を 200 µl ずつ加える.

12. フタを閉め, tube を軽く揺らす.

13. Freezing container に入れ, -80°Cにて保存する.

14. Plate を軽く揺らし, 37°C, 2-3 days culture. (medium change なし)

15. medium が酸性になり黄色になったらゲノム抽出を行う.

6) ES 細胞からのゲノム抽出

ターゲティングが成功したかどうかは Southern Blotting により確認する.

そのために electroporation 後の ES 細胞よりゲノムを抽出した.

1. サザンブロット用に用意した 24 well plate の ES 細胞を PBS で洗い, lysis buffer を 1 well 当り 500 μ l 入れた.
2. plate の周囲をビニールテープで巻き, 隙間をふさいだ.
3. この plate を 55°C の気層のインキュベーターで一晩処理した.
4. フェノール・クロロホルムを等量加え, ローテーターで混合した.
5. 12000 rpm, 10 分遠心分離し上清を先切れチップで別のチューブに移した.
6. クロロホルムを等量加えローテーターで混合した.
7. 12000 rpm, 10 分遠心分離し上清を先切れチップで別のチューブに移した.
8. これに等量の isopropanol を加え, 混合すると白いひも状の DNA が得られた.
9. これを 12000 rpm, 10 分遠心し 70%エタノールで洗い, 30 μ l の dH₂O を加え 37°Cで一晩 DNA を溶解した.

7) Southern Blotting

○試薬調整

・ 50×TAE 1 L

・ TS Buffer (未滅菌)

NaCl 105.18 g

NaOH 48 g

→Water up to 3 L

・ DIG Hybridization Buffer

1M Na-Pi 250 ml

0.5M EDTA 1 ml

SDS 35 g

→Water up to 500 ml

・ DIG wash Buffer

1M Na-Pi 120 ml

10% SDS 300 ml

→Water up to 3 L

• NS Buffer

NaCl 175.32 g

Tris base 181.71 g

→Water up to 3 L(pH7.0 に調整)

• DIG I

1M Tris-HCl (pH7.5) 300 ml

5M NaCl 90 ml

→Water up to 3 L(pH7.0 に調整)

○制限酵素処理

DNA を適当な制限酵素でダイジェストした.

以下の組成で混合液を作り, 37°C, 一晩処理した.

Long arm (Probe A)

DNA	10 µl
10×H buffer	2.5 µl
EcoRV	1.5 µl
Water up to	25 µl

Short arm (Probe B)

DNA	10 µl
10×H buffer	2.5 µl
EcoRI	1.5 µl
Water up to	25 µl

○電気泳動

制限酵素処理したゲノムを電気泳動した.

1. 400 ml の 0.7% Seakem ME アガロース in 1xTAE でゲルを作製し, エチジウムブロマイド(10 mg/ml) を 2 µl 添加した.
2. ゲルが 50°C くらいに冷えてから, 型に流し込んだ.
3. 固まったら, 前日にダイジェストしたサンプルを全量アプライした.
4. 20V の定電圧をかけて 1xTAE 中で一晩泳動した.
5. 泳動終了後, UV トランスイルミネーターでゲルの写真を取った.
6. 泳動パターンを注意深く観察し, サテライトバンドがあることを確認した.

○トランスファー

1. 目的のバンド付近以外の余分なゲルを切って取り除き (目的のバンド付近のゲルを定規の幅に切る), ゲルを Transfer Solution (TS) に 30 分浸し, DNA をゲル中で変性させた.
2. ブロッキング装置を組み立てた. 下から順にペーパータオル (半束くらい), 3MMC 濾紙 (Whatmann) 2 枚 (ゲルより少し大きめ), メンブレン (Pall Corporation) 1 枚 (ゲルと同じ大きさ), ゲル, 3MMC 濾紙 2 枚 (ゲルと同じ大きさ) をおいた. メンブレンとゲルの間に空気が入らないように注意した.
3. 30 分おきに上から少量の TS をかけ, 4 時間以上トランスファーを行った.
4. トランスファー終了後, メンブレンを Neutralization Solution (NS) に 15 分間浸した.
5. UV staratalinker (STRATAGENE) を用いて UV クロスリンクし, メンブレン上の DNA を固定した.

○ハイブリダイゼーション

DIG-ラベルプローブを用いて検出を行った.

①プローブの作製

1. BAC DNA を用いて template DNA を PCR により増幅した.
2. 続いて, 得られた template DNA フラグメントを用いて DIG-ラベリングを行った.
3. DIG-ラベリングは PCR により行った.

以下の組成で混合液を作製した.

template DNA	300 ng
10×PCR buffer	10 µl
10×DIG DNA Labeling Mix(Roche)	4 µl
10 mM Forward Primer	10 µl
10 mM Reverse Primer	10 µl
rTaq (TAKARA)	1 µl
Water up to	100 µl

4. PCR の cycle は以下のようにして行った.

1st cycle	denature	94°C	3min	} ×28 cycles
2nd cycle	denature	94°C	1min	
	annealing	47°C	2min	
	extension	72°C	3min	
3rd cycle	last extension	72°C	5min	

②プライマー配列

probe 作製に用いたプライマーは以下の通りである.

Probe A-5': 5'- GTGTGTCATGGTTGGACAGG -3'

Probe A-3': 5'- GATTGGCCCCGTGAAATACAG -3'

Probe B-3': 5'- AGCATTTCTGTGAGGGAAGC -3'

Probe B-3': 5'- ACTGAGGCAGCTGACATGG -3'

○ハイブリダイゼーション

1. メンブレンをハイブリバッグに入れ, ポリシーラーで一部開けたままにして閉じた.
2. 1.5 ml チューブにプローブ 3 μ l と MilliQ 水 500 μ l を加え, 100°Cで 5 分煮沸した.
3. 煮沸後, すぐに氷上に 3 分置いた.
4. 上記のプローブを 65°Cに温めたハイブリバッファーに加えた.
5. このハイブリバッファーをハイブリバッグに加えてシールをし, 65°C一晩インキュベートした.

○洗いと検出反応

1. DIG 洗い Buffer にメンブレンを移し, 激しく振とうしながら 20 分×2 回の洗浄を 65°Cで行った.
2. DIG Buffer 1 で室温で 5 分×2 回 振とうしながら洗い, SDS を除去した.
3. DIG Buffer 2 に室温で振とうしながら 30 分浸した.
4. メンブレンをラップの上にのせ, Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments(Roche)溶液(ハイブリバッファーと等量)をかけ, パラフィルムをかぶせ, 1 時間室温で抗体反応を行った.
5. DIG Buffer 1 で室温, 15 分×2 回, 振とうしながら洗い, 余分な抗体を落とした.
6. DIG Buffer 3 に室温で 5 分間浸した.
7. メンブレンの水分をよくきってサランラップの上に並べ, assay 溶液をかけて, 更にその上にラップをかけて 5 分間置いた.
8. DIG Buffer 3 でリンスした.
9. メンブレンの水分をキムタオルでよくとり, サランラップではさんで, 暗室で, そのうえに X 線フィルムをカセットにセットし感光を開始した.
10. 20 分後~1 時間後に現像した.

第二項 Dennd2A 遺伝子相同組換え ES 細胞の同定

ターゲティングによる相同組換えの当たりクローンを確認するために、DIG ラベリングしたプローブを用いて、long arm 側と short arm 側二ヶ所で Southern Blotting を行った。

結果と考察

Dennd2A ターゲティングベクターを用いた Electroporation の結果、58 個の G418 耐性 ES クローンを取得した。サザンブロッティングにより、Probe B を用いて short arm 側の相同組換えを確認したところ、17 クローンの相同組換え体を取得した。そのうち、Probe A を用いて long arm 側で loxP 持ち込み型相同組換えクローンの有無を確認したところ、16 クローンの loxP 陽性相同組換え体の取得に成功した(Fig.2-4)。

第五節 キメラマウスおよび Dennd2A flox マウスの作出

第四節で取得に成功した Dennd2A の ES 相同組換えクローンを用いて, Aggregation 法によるキメラマウスの作出を行った. 当研究室で用いている M1 ES 細胞株ではマウス 8 細胞期胚と Aggregation することでキメラマウスを作出することができる. Aggregation 法は Injection 法に比べ, 操作が簡便で多量の胚を処理することができる利点がある. 以下に Aggregation 法と子宮胚移植法の概要を示す.

第一項 材料と方法

○マウスの準備

1) 精管結紮マウス

ICR CD-1 8 週令雄マウスを購入〈日本クレア〉し, 以下の手順で結紮手術する.

1. 雄マウスをネンブタールで麻酔し, 腹部を 70%エタノールで湿らせる.
2. 恥骨から 1.5 cm 上部の外皮を 1 cm 切開する. 切開口を右又は左にずらして筋層を切開する.
3. 陰嚢に降りている精巣を押し上げ, 腹腔内に移動させる.
4. 精巣および精管を引き出し, 精巣上体の下の精管を左右とも熱したピンセットで焼き切る.
5. 精巣を腹腔に戻し, 外皮をミヘル針で止める.
6. 外皮をミヘル針で止め, 精巣の位置を整える.
7. 麻酔が覚めるまで 37°C のホットプレート上で保温する.

※術後二週間で使用可能になるが, その際交配試験を行い, プラグ陽性の交尾が成立した雌マウスが妊娠しないことを確認する必要がある.

2) ドナー交配用雄マウス

BDF1 8 週令雄マウスを購入〈日本クレア〉し, 環境に慣らせるために 2 週間飼育する. 各ケージに一匹ずつ飼育し, 雌マウスとの交配は週に一度, 半年に一度交換する. 一回の Aggregation に 20 匹使用した.

3) ドナー用雌マウス

BDF1 6 週令雌マウスを購入〈日本クレア〉し, 環境に慣らせるために 1 週間以上飼育する. 一回の Aggregation に 20 匹使用した.

4) レシピエント用雌マウス

ICR CD-1 8 週令以降の雌マウスを用いた. これは未交配ドナー用またはレシピエント用

雌マウスをクリーニングしたものを用いた。不足分は ICR CD-1 8 週令以降の雌マウスを購入して用いた。

5) 里親用雌マウス

ドナー用雌マウスの残りをを用いた。

○作業手順・タイムスケジュール

1) 注射・交配

手順

1. 午後 5 時にドナー用雌マウスに 5 IU の PMSG(妊馬血清性ゴナドトロピン)を腹腔内注射する。これは FSH(性腺刺激ホルモン)として用いる排卵誘発剤である。
2. PMSG を注射した 48 時間後に、5 IU の hCG(人絨毛性性腺刺激ホルモン)を腹腔内注射し、ドナー交配用雄マウスと交配させる。hCG は LH(黄体形成ホルモン)として用いている。これら 2 つの性腺刺激ホルモンで過剰排卵を誘起することによって、自然排卵に比べて約 2 倍の卵を採取できる。
3. 交配の翌日の午前中に、膣栓の検査によって交尾の成立有無を確認する。交尾が成立した雌には、黄白色でワックス状の膣栓(vaginal plug)が形成される。膣栓のないマウスは、ホルモン注射の影響がなくなる 3 週間後までクリーニングし、レシピエント用の交配に使用した。

2) 採卵

8 細胞期胚を回収するためには、交配の 3 日後の午前中に採卵を行う。

手順

1. 準備した M16 Medium <SIGMA> に FCS を 10%になるように加え(以下 Medium と表記)、フィルター滅菌してから 30G の灌流用針を付けた注射器に入れる。35 mm プラスチックシャーレに培養液の液滴(ドロップ)を作り、ミネラルオイルで覆う。これを 5% CO₂ インキュベーター内に置いておく。
2. 採卵に用いるマウスを頸椎脱臼法により屠殺する。腹部を 70%エタノールで湿らせ開腹し、左右の卵管及び子宮を 5 mm 程度切り出す。
3. 切り出した卵管を新しい 35 mm プラスチックシャーレに乗せ、実体顕微鏡下で 30G の灌流用針を付けた注射器を卵管采に挿入し、卵管及び子宮を灌流する。培養液と共に流出した卵をキャピラリーマウスピペットで回収し、準備しておいたドロップに入れる。1 匹当たり、10~20 個程度の 8 細胞期胚が回収できる。

3) 透明帯除去

手順

1. 35 mm プラスチックシャーレに 100 μ l の Tyrode 溶液と 100 μ l の Medium(中和用)を 2 ドロップ入れ, ミネラルオイルで覆う.
2. 採取した 8 細胞期胚を 30 個程度キャピラリーマウスピペットで回収し Tyrode 溶液の中に入れて軽く馴染ませる.
3. 透明帯が溶けた卵から順に素早く回収し, 中和用の Medium 中で馴染ませ, またすぐにもう一箇所につめた Medium に移す.
4. 5% CO₂ インキュベーター内で ES 細胞の準備ができるまで培養しておく.

4) ES 細胞の準備

ストックしておいた当たりクローンを融解し, Aggregation の当日に 6 cm ディッシュに sub-confluent になるよう 2~3 回植え継ぎしながら培養し, Aggregation 直前に回収する.

○手順

1. Trypsin (50 ml tube), PBS (Wako, 500 ml), ESM (50 ml tube)を 37°C water bath にて温める.
2. 前日に植え継ぎした ES (6 cm \times 2)を温 PBS 2 ml にて 2 回 wash する.
3. 温 Trypsin 1 ml を加え, RT にて 50-80sec 処理する (dish を揺らし, 側面を軽く叩きながら細胞をはがす. 全体的に剥がれたのが目視できたら終了)
4. 温 ESM を 2 ml 加える.
5. Dish を傾け, 5 ml ピペットにて底にかけながら 5-6 回 suspend する.
6. 15 ml tube に全量を移す.
7. Tube の蓋をパラフィルムでまき, 側面にクローン名を記入後, セロテープを貼る.
8. 水中保存し, 動物室に持っていく.

5) Aggregation

従来のキメラマウスの作成には, 胚盤腔内や 8 細胞期胚に ES 細胞を注入する Injection 法が用いられてきたが, ここではより簡便で多量の胚処理が可能な Aggregation 法を用いて行った. また Aggregation 法には“Darning Needle”(かがり針) Aggregation プレートを用いた. 採卵の前日に“Darning Needle”Aggregation 用プレートを準備しておく. プレート 1 枚あたり 20 の穴があり, 20 個の胚を培養可能である. 一回の Aggregation に約 10 枚使用する.

○手順

①Darning Needle Aggregation 用プレート作製(採卵前日に行う)

1. 35 mm プラスチックシャーレに 20 μ l の Medium を 4 ヶ所と、その真ん中に 40 μ l の Medium を分注する。
2. 20 μ l の Medium の中に、かがり針を用いて直径 0.5 mm 程度のくぼみを 5 個均等に作る。
表面がなるべく滑らかになるように注意する(このくぼみで胚を培養する)
3. 全体をミネラルオイルで覆い、翌日まで 5% CO₂ インキュベーターに入れておく。
(Medium の pH を調整するため必ず採卵前日に作る)

②Aggregation

1. 透明帯を除去した 8 細胞期胚を上記のプレートのくぼみに 1 つずつ入れる。
2. 4)で準備した ES 細胞を 35 mm プラスチックシャーレに 100 μ l とり、ミネラルオイルで覆う。
3. Feeder 細胞が混ざらないようにキャピラリーピペットで ES 細胞を取り、8 細胞期胚 1 つあたり 5~10 個となるように ES 細胞を上からかける。
4. 翌日まで 37°C, 5% CO₂ インキュベーターで培養する。

6) 胚の子宮移植

体外培養した胚を個体にまで発生させるためには、雌の生殖器内に再び移植しなければならない。移植する部位は胚の発生段階により異なるが、今回用いた 8 細胞期胚は子宮内へ移植する。

マウスは不完全性周期型であり、形成された黄体は、交尾などによる子宮頸管への刺激がないと消失してしまう。そのため、移植用レシピエントの子宮内を着床できる環境にするため、あらかじめ擬妊娠状態のマウスを作成する必要がある。今回、PMSG の腹腔内注射により発情状態にした雌を、48 時間後に精管結紮した雄マウスと不妊交配させることによりレシピエントマウスを作成した。その後、擬妊娠 2.5 日目のマウスの子宮に、5)で得た胚盤胞を移植した。左右の子宮に 10 個ずつ、1 匹あたり 10~20 個の胚盤胞を移植する。

手順

1. レシピエントマウスをネンブタールで麻酔し、背部を 70%エタノールで湿らせる。
2. 背部外皮を 1 cm 程度切開し、卵巢周囲に白く見える脂肪組織を目安に筋層を切開する。
3. キャピラリーピペットに Medium でストッパーを作り、更にマーカーとして 1 mm 以下の気泡を作る。マーカーに続いて 5 μ l 以下の Medium とともに胚を吸引する。
4. 脂肪組織をつまんで卵巢及び子宮を体外に引き出す。

5. 実体顕微鏡下で子宮の卵管接合部に近い部位をつまみ、26G の注射針で子宮腔まで穴を開ける。この穴に、ピペットの先端を子宮腔まで挿し込み、胚を静かに注入する。この時、マーカの気泡を目印とする。
6. 筋層の両側をつまみ上げ、子宮及び卵管を腹腔内に戻し、ミヘル針で止める。
7. 左右とも同じ操作で移植を行う。
8. 麻酔が覚めるまで 37°C ホットプレートで保温する。

7) 帝王切開

自然分娩の場合の産仔数は、ICR で 15 匹程度であるが、移植の場合は胚の状態に左右される。通常産仔数は 1~5 匹程度と少なく、また分娩予定日に自然分娩せず過熟仔となる可能性がある。このため、分娩予定日に帝王切開し、自然分娩したマウスに里子に出す方法を取った。

○手順

1. 里親用マウスが自然分娩していることを確認する。
2. 移植 17 日目にレシピエントマウスを頸椎脱臼で屠殺、開腹する。
3. 子宮を取り出し、仔の数を確認する。子宮壁をつまみ、傷つけないように切開し、胎仔を取り出す。
4. ピンセットで臍帯を強くつまんで止血し、胎盤側の臍帯を切る。
5. 取り出した仔マウスは、キムワイプで体液をふきとり、ピンセットで尾を軽くつまんで自発呼吸を促す。羊水が詰まっている場合はピンセットでうまく吐かせる。
6. 完全に蘇生し赤みを帯びるまで根気よく蘇生する(キメラマウスは死にやすい)
7. 里親の仔を含め、5~10 匹程度になるように里子につける。

8) genotyping

生後 10~14 日後に尻尾を 1 cm 切断し、後肢の指を切断してナンバリングし個体識別する。切断した尻尾から NaOH 法によりゲノム DNA を抽出し、PCR で遺伝子型を確認した。

手順

1. インキュベーターを 95°C に設定しておく。
2. 0.05N NaOH を 500 μ l 加える。
3. 95°C で 30~40 min インキュベートする。
4. よくボルテックスし、組織を破碎する。
5. Tris HCl(pH7.6)を 200 μ l 加え、12000rpm, 5 min 遠心する。
6. 上清を 1 μ l 用いて PCR を行った。

用いたプライマーは以下の通りである.

Dennd2A genotyping primer

F: 5'-TTGATGTTAACCCTCCAGCTTT-3' floxed allele 221bp

R: 5'-AACATATGAGGCATGCTTTGC-3' WT allele 150bp

第二項 キメラマウスおよび Dennd2A *fl*ox マウスの出生確認

合計 2 度の Aggregation で, Dennd2A(1-18)クローンからキメラ率 60%の雄を 1 匹, Dennd2A(2-7)クローンからキメラ率 100%, 90%, 80%の雄各 1 匹, 100%の雌 1 匹を得た. このうち Dennd2A(2-7)クローンから生まれたキメラマウス 4 匹を, 8 週令で C57BL/6J と交配させた. 得られた F1 の遺伝子型を PCR にて確認したところ, キメラ率 100%の雌から生まれた 5 匹の仔のうち, 4 匹の Dennd2A floxed allele ヘテロ組換え体を確認し, キメラマウスの germ line transmission に成功した(Fig.2-5 A). 以上の結果より, Dennd2A *fl*ox マウスの作出に成功したと判断した.

今回用いた M1 ES 細胞と BDF1 系統 8 細胞胚による Aggregation では, 得られたキメラマウスはアグーチ色と黒のモザイクとなる(Fig.2-5 B). また, M1 ES 細胞は雄由来の為, 通常高率キメラマウスは雄になることが多い. しかし, 今回雌のキメラマウスで germ line transmission を確認したことから, Aggregation に用いた Dennd2A(2-7)クローンは培養中に Y 染色体を欠損していた可能性が考えられる.

第六節 全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウス(*Dennd2A*^{-/-})の作出

前節より、キメラマウスの germ line transmission が確認され、*Dennd2A flox* マウスが作出されたことを確認した。そこで、*Dennd2A flox* マウスと C57BL/6J を交配させ 7 世代にわたりバッククロスを行った後、全身に Cre recombinase を発現する CMV-Cre マウスとを交配させることで、全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウス(*Dennd2A*^{-/-})の作出を行った。

作出された *Dennd2A*^{-/-} において *Dennd2A* 遺伝子が欠損しているかどうかゲノム PCR と Real-time PCR により確認をおこなった。

第一項 材料と方法

○ゲノム PCR

生後 10~14 日後に尻尾を 1 cm 切断し、後肢の指を切断してナンバリングし個体識別する。切断した尻尾から NaOH 法によりゲノム DNA を抽出し、PCR で遺伝子型を確認した。

手順

1. インキュベーターを 95°C に設定しておく。
2. 0.05N NaOH を 500 µl 加える。
3. 95°C で 30~40 min インキュベートする。
4. よくボルテックスし、組織を破砕する。
5. Tris HCl(pH7.6)を 200 µl 加え、12000rpm, 5 min 遠心する。
6. 上清を 1 µl 用いて PCR を行った。

用いたプライマーは以下の通りである。

Dennd2A genotyping primer

F: 5'-TTGATGTAAACCCTCCAGCTTT-3'

R1: 5'-AACATATGAGGCATGCTTTGC-3' WT allele 150 bp

R2: 5'-CTAAAGCGCATGCTCCAGAC-3' L- allele 280 bp

○RNA 抽出

1. マウスの尻尾を 1cm 程度切断し、ISOGEN(日本ジェネティクス)を 500 µl 加えてホモジエナイズした後、500 µl のクロロホルムを加えて振とうする。
2. 12000rpm, 4°C, 20min 遠心。
3. 上清を回収し等量のイソプロパノールを加える。

4. 12000rpm, 4°C, 15min 遠心.
5. 上清を除き, 沈殿に DEPC 処理済みの 70%エタノールを加える.
6. 12000rpm, 4°C, 5min 遠心.
7. 上清を捨て, 沈殿を風乾させた後, DEPC 処理した MilliQ 水を加えて溶解させる.
8. 完全に融解したものを total RNA として RT 反応に用いる.

○Real-time PCR

1. 抽出した RNA は DNase I 処理後, PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio. Inc.)を用いて逆転写させる. プライマーには Kit 中の Random 6mer primer を用いた.

○逆転写反応液組成

5×Buffer	5 µl
Enzyme Mix	0.5 µl
Oligo DT	0.5 µl
Random 6mer	0.5 µl
RNA	500 ng

2. 37°C, 15min.→85°C, 5sec.
3. 調製した cDNA を 1µl と SYBR Premix EX Taq II (Takara Bio. Inc.)を用いて反応液を調製.
4. Thermal Cycler Dice (Takara Bio. Inc.)を用いて検出.

検量線は cDNA を 5 倍ずつ希釈し 3 点で作製した試料の測定値が検量線上の 3 点間の平均となるように濃度と量を検討した. 内部標準遺伝子として Gapdh を用いて補正した.

プライマーは第一章/第五節の Dennd2A の発現パターンの検出に用いたものと同様のものをを用いた.

第二項 Dennd2A^{-/-}の出生確認

Dennd2A flox マウスと C57BL/6J を交配させ 7 世代にわたりバッククロスを行った後, 全身に Cre recombinase を発現する CMV-Cre マウスとを交配させ得られた F1 世代の尻尾からゲノム DNA と RNA を抽出し, ゲノム PCR と Real-time PCR により Dennd2A 遺伝子の欠損を確認した.

まずゲノム DNA を用いた PCR を行ったところ, 150bp の WT allele のみもつ WT 群 (Dennd2A^{+/+})と 280bp の L- allele のみをもつ KO 群 (Dennd2A^{-/-}), それぞれのバンドを一本

ずつもつヘテロ群(*Dennd2A*^{+/-})を確認した(Fig.2-6-A).

次に WT, ヘテロ, KO 群のマウス尻尾から抽出した RNA を鋳型に Real-time PCR をおこなったところ, WT 群の *Dennd2A* の発現量を 100%として, ヘテロ群では約 50%に, KO 群ではほぼ 100% *Dennd2A* の発現が消失していることが確認された(Fig.2-6-B).

以上の結果より, ゲノム DNA レベルおよび mRNA レベルにおいて *Dennd2A*^{-/-}では *Dennd2A* 遺伝子が欠損していることが確認された. よって *Dennd2A*^{-/-}マウスの作出に成功したと判断し, 続く第三章において *Dennd2A*^{+/+}を WT 群(対照群), *Dennd2A*^{-/-}マウスを KO 群として表現型解析を行なうこととした.

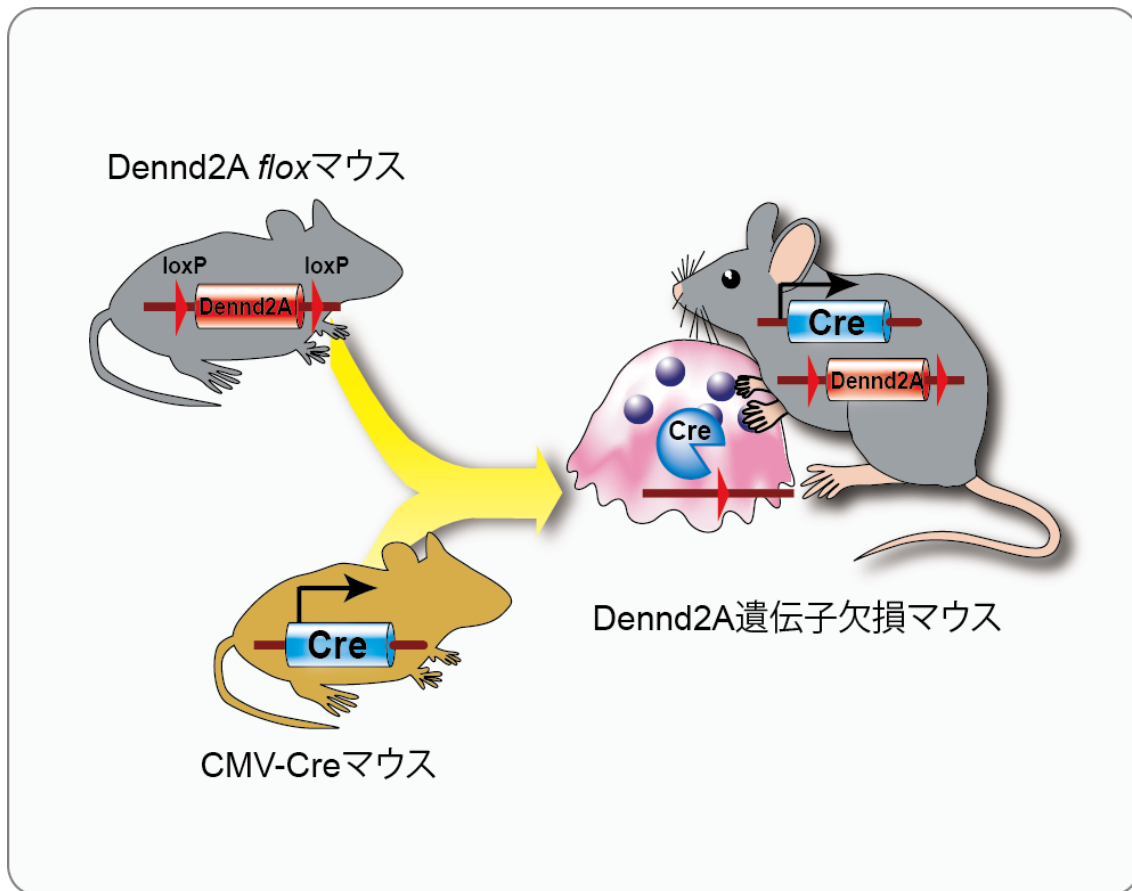


Fig.2-1 Cre/loxP システムを用いた Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出の概要

標的遺伝子を loxP 配列で挟み込んだ *flox* マウスと、組織特異的に Cre recombinase を発現する Cre マウスとの交配により、Cre を発現する組織でのみ標的遺伝子が切り出される。
今回は Dennd2A *flox* マウスを作出し、全身で Cre を発現する CMV-Cre マウスと交配させる事で、全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出を目指した。

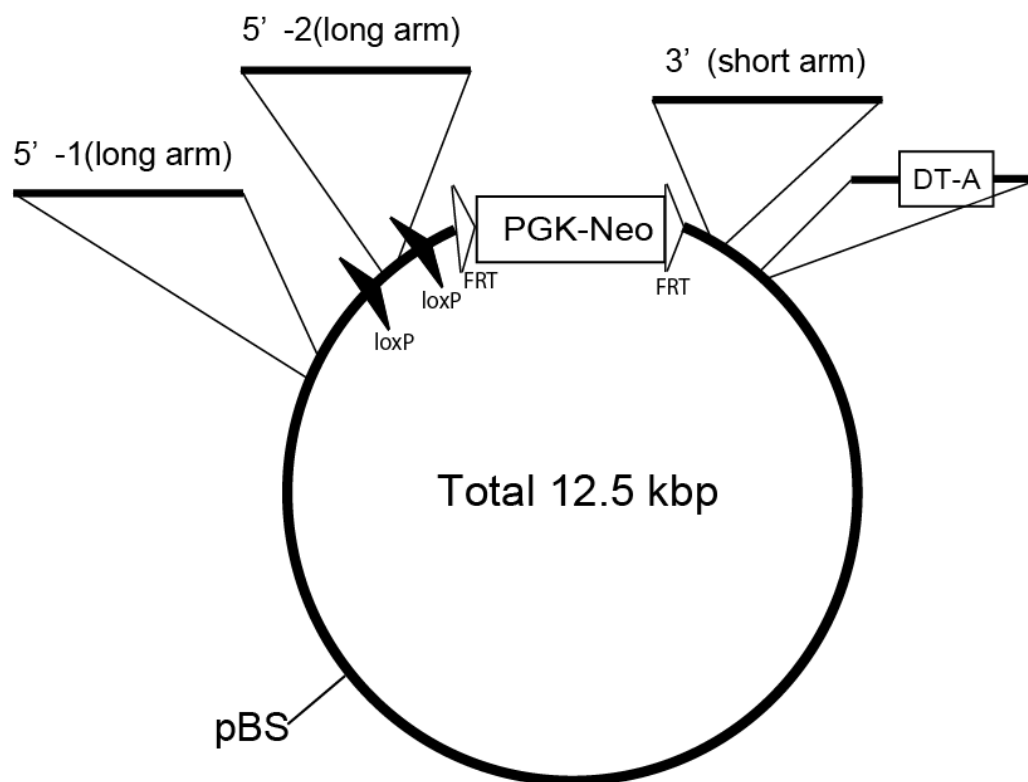


Fig.2-2 Dennd2A ターゲティングベクター作製スキーム

1. BAC から long arm の loxP より上流領域 , loxP より下流領域 , short arm 領域を PCR 増幅する .
- ↓
2. 骨格ベクター (loxP 配列と FRT/Neo/FRT が予めサブクローニングされた pBluescript) と PCR 増幅したフラグメントを対応する制限酵素で cut.
- ↓
3. PCR 増幅したフラグメントを精製し , 各フラグメントを pBluescript にサブクローニング .
- ↓
4. PCR 増幅した領域のシーケンスを確認する .
- ↓
5. DT-A カセットを ligation 後 , long arm, short arm のフラグメント を cut & ligation.
- ↓
6. ligation したつなぎ目のシーケンスをチェックし , 1cut して全長の長さ確かめる .

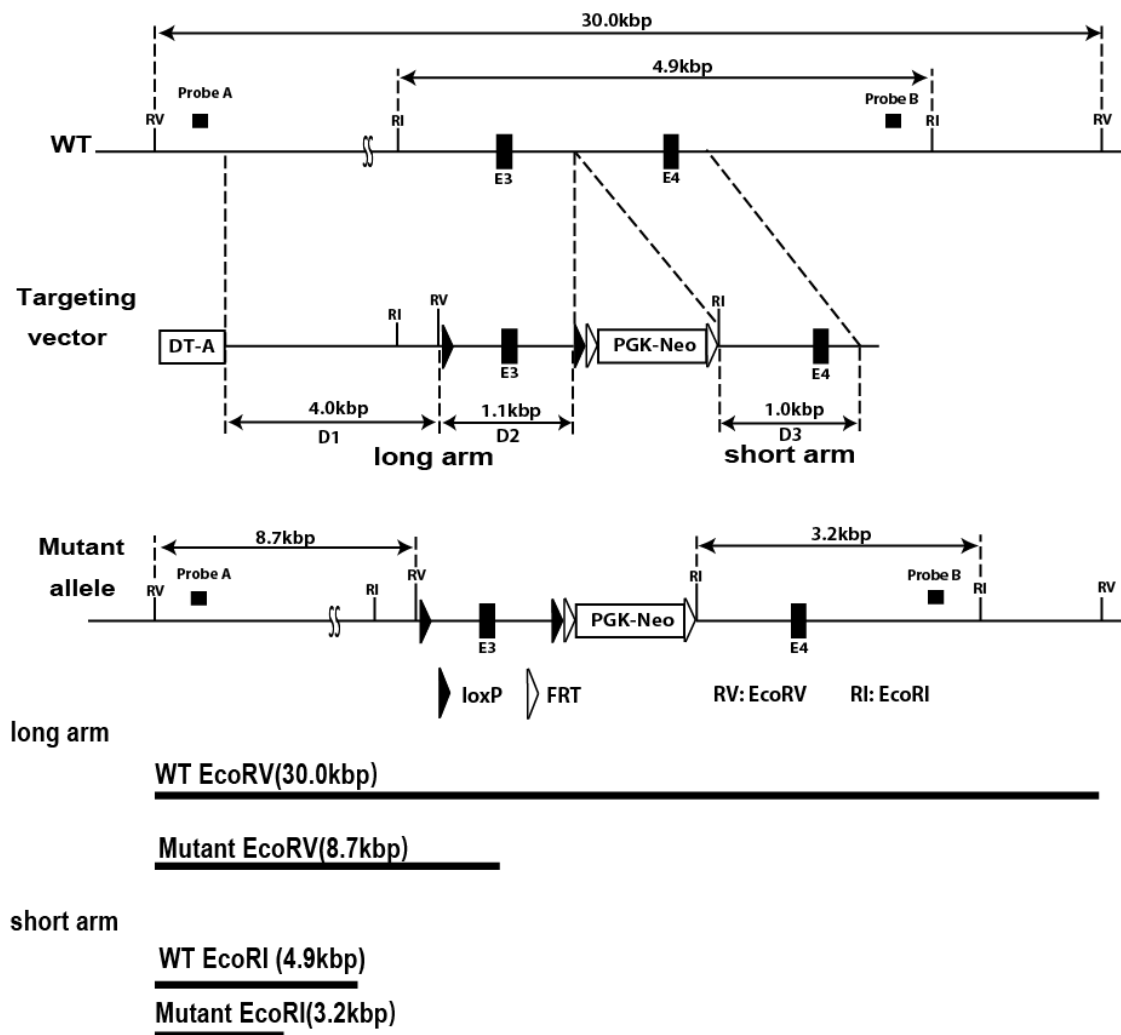


Fig.2-3 Dennd2A targeting vector MAP

Dennd2A targeting vector の構造と遺伝子座周辺領域を示した。

WT：野生型マウス Dennd2A 遺伝子座周辺領域。

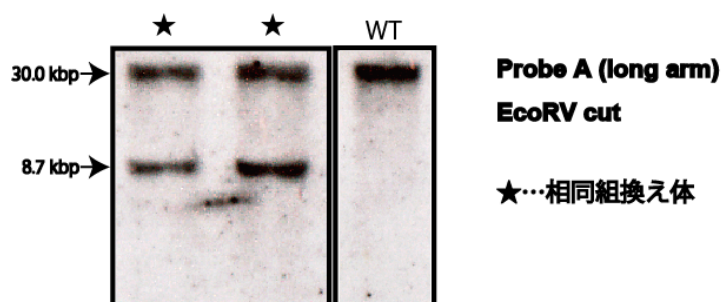
Targeting Vector：Dennd2A ターゲティングベクターの構造。

Mutant allele：相同組み換え後の Dennd2A 遺伝子座周辺領域。

A

	WT	KO
probe A	30.0 kb	8.7 kb
probe B	4.9 kb	3.2 kb

B



C

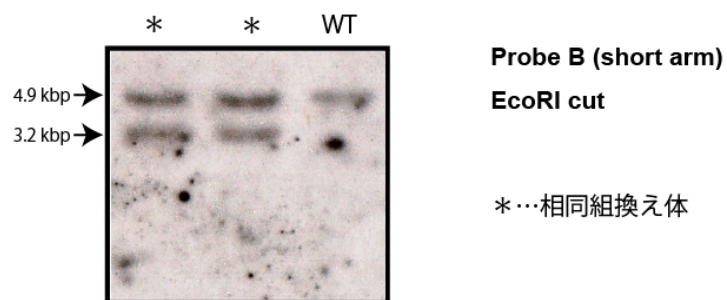


Fig.2-4 Dennd2A 相同組換え ES 細胞クローンのスクリーニング

ES 細胞を G418 でセレクションし、生き残った ES 細胞からゲノム抽出し、サザンブロッティングをおこなった。

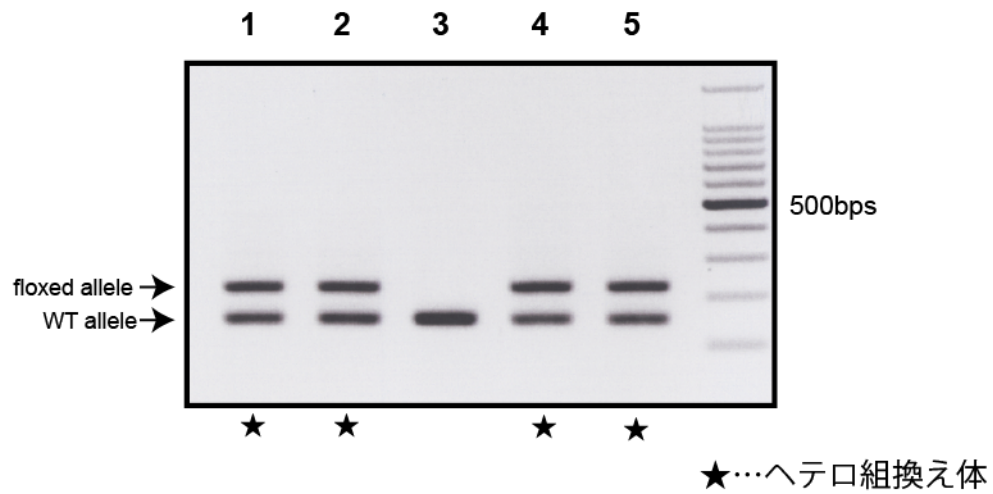
A. Probe の種類と野生型・相同組換え型のバンドサイズをそれぞれ示した。

野生型はシングルバンド、相同組換え型は WT と mutant の 2 本バンドが現れる。

B. Probe A (long arm 側) でのサザンブロッティング。

C. Probe B (short arm 側) でのサザンブロッティング。

A



B

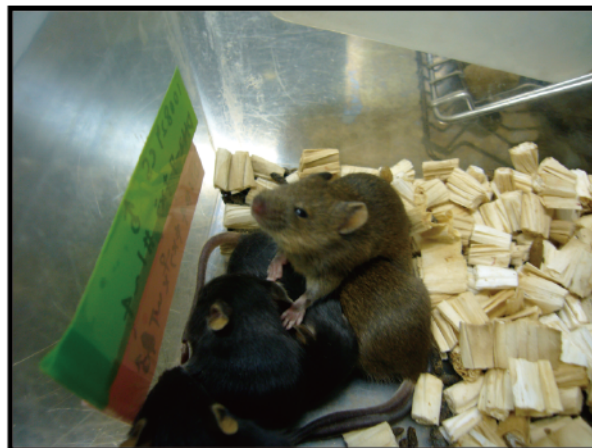


Fig.2-5 Dennd2A flox マウスの germline transmission 確認

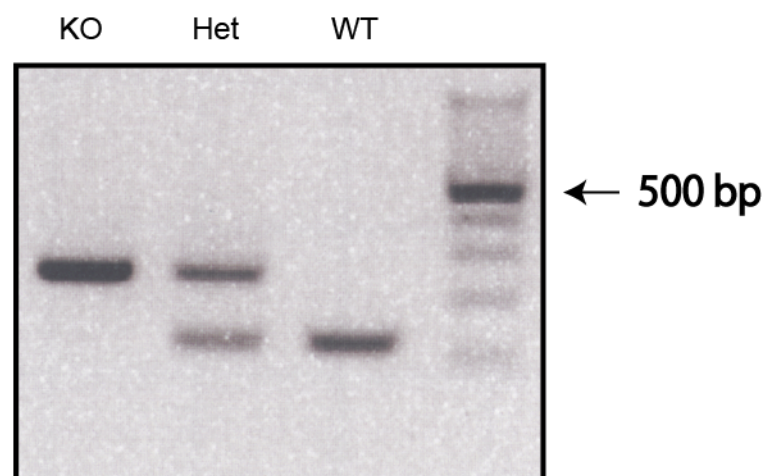
A. genotyping PCR

10 日齢のマウスの尻尾からゲノム DNA を抽出し , Dennd2A floxed allele を PCR で確認した . floxed allele は 221bp, WT allele は 150bp の位置にバンドが見える .

★はヘテロ組換え体を示す .

B. Dennd2A flox mice の誕生 (生後約 14 日頃撮影)

A



B

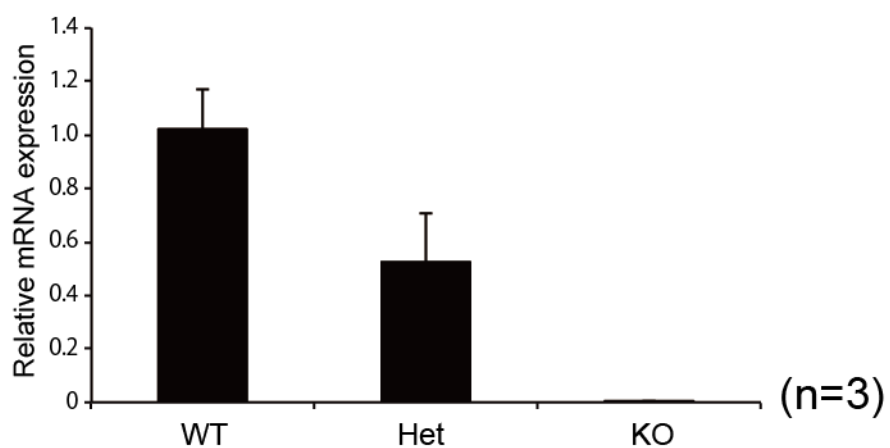


Fig 2-6 Dennd2A 遺伝子欠損の確認

- A. 生後 10 日後の仔マウスの尻尾からゲノム DNA を抽出し , PCR をおこなった .
 L- allele は 280 bp, WT allele は 150 bp の位置にバンドが確認できる .
- B. genotype を確認したマウスの尻尾より RNA を抽出し , Dennd2A の発現を Real-time PCR により確認した . (各マウスともに n=3)

第三章 全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの表現型解析

第一節 緒言

第二章において、全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウス(以下 *Dennd2A*^{-/-})の作出に成功した。続く本章では、*Dennd2A*^{-/-}の表現型解析を行う。第一章で示したとおり、*Dennd2A* は全身にユビキタスに発現しており、GEF 活性を持つその他の分子が様々な生理機能を有することからも、*Dennd2A* の生体内での機能は多岐にわたると考えられる。しかしながら、現在までに *Dennd2A*^{-/-}マウスの作出・機能解析の報告はなく、その生理機能は未知のままである。

そこでまず第二節では、*Dennd2A* 遺伝子欠損による全身的影響の有無を確認するため、外観上の特徴や臓器の重量などに着目した、全身的な表現型解析を行った。

続く第三節では、*Dennd2A* の発現が破骨細胞の分化に伴って上昇すること、骨芽細胞よりも破骨細胞で強く発現していることなどから、骨組織において何らかの機能を有する可能性を確かめるために、骨表現型を中心とした解析をおこなった。

さらに第四節で、破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析を行うことで、*Dennd2A* の骨代謝制御機構における作用機序の一端を明らかにすることを試みた。

第二節 全身的表現型解析

Dennd2A *flox* マウスと、全身で Cre recombinase を発現する CMV-Cre トランスジェニックマウスを掛け合わせることで、全身で Dennd2A 遺伝子を欠損する *Dennd2A*^{-/-} を作出したが、Dennd2A 遺伝子が全身で欠損していることによる全身的影響の有無を確認するため、体重や体長、外観上の特徴や臓器の重量などに着目した、全身的表現型解析を行った。

第一項 材料と方法

ゲノム PCR

マウスの遺伝子型は第二章と同様にマウスの尻尾からゲノム抽出を行い、同様のプライマーで PCR 反応を行いアガロースゲル電気泳動により検出した。

成長曲線

マウスの体重を 2 週齢から 16 週齢まで測定し、成長曲線を作製した。

臓器重量

16 週齢マウスをエチルエーテル(昭和エーテル株式会社)により麻酔後、開腹し、各臓器を丁寧に切除し、重量を測定した。臓器重量はそれぞれ体重補正重量比を算出し、WT 群を 1 としたときの KO 群の相対値を示した。

心臓採血と血中骨代謝パラメータの測定

16 週齢マウスをエチルエーテル(昭和エーテル株式会社)により麻酔後、開腹し、横隔膜を開いてから直接心臓にインシュリン皮下投与用針付注射筒(テルモ株式会社)を刺し心臓採血した。13000rpm で 5 分間遠心分離し、血清画分を採取し、-80℃で保存した。血中骨代謝パラメータの測定については、受託臨床検査機関の SRL 株式会社に委託した。

統計学的解析

それぞれの実験から得られた結果は、エクセルによりデータ処理をし、グラフは平均値±標準偏差として表記した。有意差は TTEST を用いて算出した。

第二項 *Dennd2A*^{-/-}の生育と臓器

まず, *Dennd2A* が発生過程に寄与しているかどうか検討するため, *Dennd2A*^{-/-}の出生確率を調べた. *Dennd2A* ヘテロ欠損マウス(*Dennd2A*^{+/-})同士を掛け合わせ, 生後約 10 日の新生仔マウスの尻尾からゲノム DNA を抽出し, ゲノム PCR により遺伝子型を調べた. その結果, 雌雄ともにメンデルの法則に従い WT: ヘテロ: KO = 1 : 2 : 1 の割合で出現することがわかった. よって *Dennd2A*^{-/-} マウスは lethality を示さず, 発生過程に異常を示さないことがわかった(Fig.3-1). また, *Dennd2A*^{-/-} マウスを C57BL/6J と交配させた結果, 雌雄ともに正常に妊娠・出産することから, 生殖能力にも特に問題がないことがわかった.

次に, 2 週齢から 16 週齢までマウスの体重を測定した結果, *Dennd2A*^{-/-} マウスは対照群と比較して体重に差を認めず, 正常な生育を確認した(Fig.3-3). 外観上の異常や行動にも特に異常は見られず, 体長にも差はなかった.

また, 16 週令において各臓器の重量を測定した結果, *Dennd2A*^{-/-} マウスは対照群と比較して臓器重量にも有意な差を認めなかった. 特に *Dennd2A* の発現が高かった肺においても外観上異常は見られず, 重量に関しても対照群と大差がなかった(Fig.3-4).

以上の結果から, *Dennd2A*^{-/-} マウスは対照群と比較して生殖能力に異常はなく, 体重や臓器重量も正常で, 成長異常を示さないことが明らかになった.

第三節 骨組織における表現型解析

前節において *Dennd2A*^{-/-} マウスの全身的な表現型解析を行ったが、*Dennd2A*^{-/-} マウスは成長に異常を認めず、外観上の表現型は対照群と差がないように見えた。

そこで第三節では、*Dennd2A* の発現パターンから、骨組織で何らかの生理機能をもつという予測のもと、骨組織における詳細な表現型解析を行う。

第一項 材料と方法

軟 X 線撮影

16 週齢マウスをエチルエーテルにより麻酔し、採血の後、大腿骨・脛骨を摘出した。摘出した骨は 70% EtOH 中に保存した。摘出した骨をフィルムの上に一定方向に配置し、X 線撮影装置を用いて撮影した。X 線撮影は株式会社クレハ分析センターに外部委託して行った。

骨密度測定

軟 X 線写真で撮影したのと同じ骨を用いて骨密度測定を行った。測定には、骨塩量測定装置(ALOKA:DCS-600EX)を用い測定した。骨全体の骨密度と同時に、近位から遠位にかけて 20 分割し、それぞれの分画骨密度も測定した。脛骨においては、近位は膝関節側を、遠位は足首の関節側を示す。大腿骨においては、近位は股関節側を、遠位は膝関節側を示す。

マイクロ CT 解析

軟 X 線撮影と骨密度測定に用いたのと同じ骨サンプルを使って測定を行った。測定には SCANCO MEDICAL 社製 μ CT 35 を用い、同社の簡易測定マニュアルの手順に従い測定後、統計学的解析手法に従ってデータ処理した。

骨形態計測

○試薬調製

・ Calcein buffer

5N NaCl 1.5 ml

NaHCO₃ 1.0 g

MilliQ 48.5 ml

溶解後、4°Cで保存する。

• Calcein Solution

Calcein (Sigma C0875-5G) 2.5 mg

Calcein buffer 1 ml

Calcein Solution の長期保管はできない。冷蔵保管などをしても約 1 週間で沈着しなくなる。注射する都度、投与する直前に調和する必要がある。

• 4% paraformaldehyde (PFA)

A 液 PFA (Wako 162-16065) 40 g

5N NaOH 750 μ l

MilliQ 960 ml

B 液 25 \times PBS 40 ml

A 液を 60°C で溶解後、氷で冷却し B 液を加える。

• MMA 樹脂浸透液

destabilized MMA モノマー

MMA モノマー (Wako 139-02726-500ML) 500 ml

Al(OH)₃ XH₂O (MERCK 1.01091.1000G) 50 g

混和後、4°C で 12 時間以上、静置させた。

上清を利用する。

• MMA 樹脂浸透液 A 液

destabilized MMA モノマー 200 ml

NPG (Sigma 74432-250ML) 14 ml

BPO (nacalai tesque 04422-02-25G) 0.66 g

室温で 10 分間混和させた。通常 4-5 回使用できる。

• MMA 樹脂浸透液 B 液

作製は MMA 樹脂浸透液 A 液と同様であるが、より新鮮なものが好ましい。通常 1 回だけ使用し、A 液として再利用する。

• MMA 樹脂包埋液

destabilized MMA モノマー	100 ml
NPG	7 ml
BPO	0.55 g
DMPD (Wako 046-03323-25ML)	0.5 ml

室温で 30 分間ゆっくり混和する.

• Cutting solution

70% EtOH	10 ml
ddH ₂ O	90 ml
Liquid soap	8-10 drops

• Stretching solution

70% EtOH	50 ml
2-Butoxyethanol(Wako 053-02636-500ML)	50 ml

• 1% AgNO₃

AgNO ₃ (Sigma S-0139)	2 g
distilled water	200 ml

完全に融解するまで室温で混和する.

• Sodafomol

Sodium carbonate (Sigma 2127)	10 g
distilled water	150 ml
formaldehyde	50 ml

• 5% Na Thiosulfate

Sodium Thiosulfate (Sigma 1648)	10 g
distilled water	200 ml

完全に融解するまで室温で混和する.

4°Cで遮光保存する.

• Von Gieson

ワンギーソン液 F (Wako 221-01415)	25 ml
Nitric acid 70% (Wako 143-01326)	1 ml
Glycerol (Wako 075-00616)	20 ml
ワンギーソン液 P (Wako 224-01405)	155 ml

室温で保存する.

• Toluidin blue 染色液

Toluidin blue (Sigma T 3260)	0.1 g
Fisher Scientific (BP 169-500)	0.2 g
100% EtOH	30 ml
ddH ₂ O	70 ml

室温で保存する.

• Basic Solution

無水酢酸ナトリウム (Wako 192-01075)	9.2 g
酒石酸ナトリウム二水和物 (Wako 190-03455)	11.4 g
MilliQ	950 ml
Acetic acid Glacial (Sigma A-6283)	3.1 ml

5M Sodium Hydroxide で pH 4.7-5.0 に調節し, 最終的に MilliQ で 1L にフィルアップする.
室温で 6 カ月間保存可能.

• Naphthol AS-BI Phosphate Substrate

Naphthol AS -BI Phosphate (Sigma N2125-1G)	0.05 g
Ethylene Glycol (Wako 058-00986)	2.5 ml

十分に Vortex し, 完全に融解させる.
4°C で 3 週間保存可能.

• Sodium Nitrite Solution

Sodium Nitrite (Sigma S2252-500G)	0.16 g
ddH ₂ O	4 ml

十分に Vortex し, 完全に融解させる.
4°C で 4 日間保存可能.

・ Pararosaniline Dye

Pararosanilin hydrochloride (Sigma P3750-10G) 0.2 g

2N HCl (事前 60°Cで 20 分間静置) 4 ml

十分に Vortex し, 完全に融解後, filtration する.

4°Cで 2 週間保存可能.

○作業手順

標識剤投与

マウスを屠殺する 48 時間前と, さらにその 72 時間前の 2 回, 10 g 体重あたり 0.1 ml 量の Calcein Solution を注射した.

手のひらで仰向けに固定し, 背中を反らせると注射しやすい. 血流の多い腹部に皮下投与した. 針を刺した後にピストンを軽く引き, 血管を刺していないかどうかを確認した後, 全量注入する.

マウスの屠殺と脊椎伸展位固定

マウスをエチルエーテルで過麻酔し, 犠牲死させた. 脊椎を損傷しないように皮膚・内臓を除去し, 筋肉・骨格系のみを残して腰椎前面の筋肉を可能な限り除去する. 血液を流水で洗浄する. 発泡スチロール板に両手を 25G 針で張り付け, 尻尾を引っ張ることで脊椎を伸展させ, この状態で尻尾の付け根に 25G 針を刺して固定した. 適切なプラスチック製容器に 4% PFA を入れ, 固定したマウスが液に浸るように逆向きに発泡スチロール板を入れる. 蓋をして, 4°Cで 12-16 時間固定する. その後, PFA を捨て 70% EtOH に置換し, 4°Cで 48 時間以上浸透させる.

腰椎の切り出し

70% EtOH 中のマウスを取り出し, 腰椎を切り出した. 両腸骨上縁を結んだラインにかかっている脊椎椎体が第五腰椎である. 第五腰椎を目印とし, 頭側に向かって脊椎を数え, 第一腰椎の頭側の椎間板部分をメスにて切り離した. 尾側は第六腰椎と仙骨の間の椎間板で切り離す. 脊椎周囲の筋組織をはさみでトリミングした. あらかじめサンプル名を記入したプラスチック製カセットに切り出した腰椎を入れる.

腰椎の脱水

腰椎の入ったカセットを、4℃で 24 時間ずつ、80%→96%→100%EtOH に順次置換し、脱水する。

腰椎の MMA 樹脂浸透

脱水した腰椎を、4℃で 24 時間ずつ、MMA 樹脂浸透液 A 液→MMA 樹脂浸透液 B 液に順次置換し、MMA 樹脂を浸透させる。

腰椎の MMA 樹脂包埋

包埋とは、薄切切片を作成する際、骨を均質で適度な硬さのある包埋剤の中に埋める操作である。ドラフト換気下で包埋用ガラス容器(スクリー管瓶 ASONE 9-852-06 13.5ml)に 10 ml ずつ包埋液を入れ、MMA 樹脂浸透処理した腰椎を脊椎前面がビンの底側になるように浸す。

蓋にサンプル名を明記し、大きめの発泡スチロール容器中にビンを並べ、十分に冷やした氷水を包埋液面が少し超える程度に入れ、4℃でおよそ 5 日間静置させた。

5 日後、樹脂が固まっていることを確認し、木槌を使ってガラス容器を割り、サンプルを取り出す。サンプルに油性ペンで直接サンプル名を記入した。

薄切と切片作製

固めた樹脂ブロックの余分な部分を電気ノコギリなどで削った後、ミクロトーム(Leica RM2255)を用いて薄切する。

ブロックをミクロトームのステージにセットし、Cutting solution を適宜つけながら、第三、第四腰椎の左右の横突起がそれぞれの椎体に同時につながるよう薄切する。椎体と横突起が繋がったら、その時点から、7 μm の切片を 3 枚、その後 1 枚捨て、4 μm の切片を 4 枚、その後 1 枚捨て、7 μm の切片を 3 枚取った。

薄切した切片はスライドガラスに載せ、Stretching solution を適宜つけ、ビニールカバーを被せ、指で押し付けるようにしながら十分に伸展させる。

さらに万力でスライドガラスを挟み、そのまま 55℃インキュベータ中に 12 時間放置し、試料とスライドガラスを密着させる。7 μm の切片 2 枚を Von Kossa 染色、4 μm の切片 1 枚を TRAP 染色、1 枚を Toluidine blue 染色に用いる。

脱樹脂処理

7 μm の切片を 2 枚, 染色籠に入れる. 室温で AME (Wako 011-10585) に 30 分間浸した. その後, 2 分間ずつ 100%→80%→70% EtOH→ddH₂O に順次浸透させる.

Von Kossa 染色

脱樹脂した切片を 1% AgNO₃ に 5 分間→ddH₂O に 10 分間→Sodaformol に 5 分間→流水に 10 分間→Sodium Thiosulfate 5% に 7 分間→流水に 10 分間→Von Gieson に 3 分間順次浸させた. その後, 流水→70%→80%→96% EtOH に順次 3 回浸し, 100% EtOH に 2 分間→キシレンに 3 分間浸し, DPX で封入した. ドラフトの下で一晩置き, よく乾燥させる.

Toluidin blue 染色

脱樹脂処理までの操作は Von Kossa 染色と同様に行う.
脱樹脂処理後の 4 μm の切片を, Toluidin blue 染色液に 1 分間→ddH₂O に 2 回→50%→70%→80%→96% EtOH にそれぞれ 3 回ずつ浸させた. その後, 100% EtOH に 5 分間→新しい 100% EtOH に 2 分間浸し, キシレンに 3 分間 3 回ずつ浸し, DPX で封入した. ドラフトの下で一晩置き, よく乾燥させる.

TRAP 染色

脱樹脂処理までの操作は Von Kossa 染色と同様に行う.
脱樹脂処理後の切片を Basic Solution 150 ml (事前に 37°C で 40 分間インキュベートしておく) に入れ, 37°C で 30 分間インキュベートする.
切片を取り出し, Naphthol AS-BI Phosphate Substrate 1.5 ml をかけ, もう一度 37°C で 30 分間インキュベートする. その間に, Sodium Nitrite Solution 3 ml と Pararosaniline Dye 3 ml を 30 秒倒混合後, 2 分間静置しておく. 混合液を別の 150 ml Basic Solution に加えて混合する. 切片を移入し, 室温で 12 分間程度インキュベートする.
顕微鏡で観察しながら, 適当な時点で MilliQ に 3-5 分間浸し, 発色を止める.
その後, Mayer's Hematoxylin Solution (Wako 131-09665) に 1 分間, 流水に 5 分間浸す. MilliQ で乾燥しないようにしながら quatex (Mount Quick Aqueous) で封入する. ドラフトの下で一晩置き, よく乾燥させる.

骨石灰化計測前の切片処理

脱樹脂処理までの操作は Von Kossa 染色と同様に行う。

脱樹脂処理後、キシレンに 3 分間 3 回ずつ浸し、DPX で封入する。ドラフトの下で一晩置き、よく乾燥させる。

骨形態計測解析

骨形態計測専用の解析ソフト Osteo Measure を用いて、各計測操作によって第三、四腰椎の二次海綿骨部分を計測し、各パラメータを算出した。

統計学的解析

それぞれの実験から得られた結果は、エクセルによりデータ処理をし、グラフは平均値±標準偏差として表記した。有意差は TTEST を用いて算出した。

第二項 X 線学的手法を用いた解析

骨組織のミネラルは X 線不透過性であるため、X 線撮影を行うと石灰化部位は白く、未石灰化部位は黒く撮影される。そのため軟 X 線撮影は、石灰化物の有無の確認及び石灰化物の概形観察に用いられることが多い。DXA 法は、組織の光子 (X 線) の吸収量の差により骨と軟組織を区別するため、2 種類の異なる波長をもつ単波長 X 線を用いる。2 つのエネルギーピークを持った X 線は骨を透過し検出器によって検出される。パルス高の解析によって、骨と軟組織が区別されることで骨量が測定される。さらに、X 線を照射した方向からみた骨の投影面積を計測することで骨密度を算出することができる。

Dennd2A^{-/-} マウスと対照群の骨サンプルを、軟 X 線撮影及び DXA 法による骨密度測定を行ったところ、*Dennd2A*^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して X 線透過性の低下を認め (Fig.3-5)、大腿骨骨密度は 108.5% の高値を示した (Fig.3-6)。また、骨全体の長軸 20 分割による骨塩量測定においても、骨端の海面骨領域での増加が認められた。さらに、マイクロ CT を用いた大腿骨海綿骨領域の 3D 画像解析においても、*Dennd2A*^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して有意な骨量増加を認めた (Fig.3-7)。

以上の結果より、生体内において *Dennd2A* が骨量を抑制する因子である可能性が示唆された。

第三項 骨形態計測を用いた解析

軟 X 線撮影と DXA 法による骨密度測定により, *Dennd2A*^{-/-}雌マウスの骨は対照群と比較して有意な骨量増加を示すことが明らかとなった. この骨量増加の原因が破骨細胞による骨吸収にあるのか, 骨芽細胞による骨形成にあるのかを調べるために, 骨形態計測を用いて実際の骨組織における骨代謝パラメータを測定した(Fig.3-8,9).

その結果, *Dennd2A*^{-/-}雌マウスの骨は対照群と比較して破骨細胞数及び破骨細胞面の減少を認めた(Fig.3-9). また, 骨芽細胞の骨形成パラメータには差を認めなかった. この結果から, *Dennd2A*^{-/-}雌マウスの骨量変化は, 破骨細胞による骨吸収と関係する可能性が考えられた.

第四項 血中骨代謝マーカーの解析

軟 X 線撮影と DXA 法による骨密度測定により, *Dennd2A*^{-/-}雌マウスの骨は対照群と比較して有意な骨量増加を示すことが明らかになった. この骨量増加の原因は骨形態計測により, 破骨細胞数の減少による骨吸収不全であることが推察された.

実際に *Dennd2A*^{-/-}マウスの骨吸収が抑制されているかどうかを調べるために, 血中の骨吸収マーカーを測定した. 骨吸収マーカーには骨吸収時に破骨細胞が分泌する酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ TRACP5b (tartrate-resistant acid phosphatase from 5b) を用いた.

前節で採取した血清を受託臨床検査機関の SRL 株式会社に委託して, 血清中の TRACP5b およびカルシウム(Ca), リン(P)の濃度を測定した. その結果, *Dennd2A*^{-/-}雌マウスの血清サンプルは対照群と比較して TRACP5b 濃度が有意に低下していることがわかった(Fig.3-10). 全身的な影響による骨量変化の可能性を確かめるために, 血清 Ca, P 濃度も同時に測定したが, 両者ともに有意な差は認められなかった.

以上の結果から, *Dennd2A*^{-/-}マウスの骨量増加は, 破骨細胞数の減少に伴う骨吸収不全が原因の一つであることが明らかとなった.

第四節 破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析

第一項 材料と方法

骨髓由来初代破骨細胞培養

8 週令の *Dennd2A*^{-/-} マウスと対照群(*Dennd2A*^{+/+})の大腿骨を採取し, 骨髓細胞を回収し M-CSF 存在下で培養を続けることで骨髓由来マクロファージを単離し, RANKL 刺激を与え破骨細胞への分化誘導を試みた.

手順・試薬等は第一章第五節に従って同様に行った.

細胞からの RNA 抽出

手順・試薬等は第一章第五節に従って同様に行った.

Real-time PCR

手順・試薬等は第一章第五節に従って同様に行った.

各遺伝子の発現確認は以下のプライマーを用いて行った.

・ NFATc1

P1: 5'- GGGACCAACCGTATTTCCACAC -3'

P2: 5'- TCGGTAGCCAGCCAGGAATC -3' Product Size 113 bp

・ DC-STAMP

P1: 5'- AAACGATCAAAGCAGCCATTGAG -3'

P2: 5'- ATCATCTTCATTTGCAGGGATTGTC -3' Product Size 129 bp

・ TRAP

P1: 5'- TTGCGACCATTGTTAGCCACATA -3'

P2: 5'- TCAGATCCATAGTGAAACCGCAAG -3' Product Size 188 bp

・ Cathepsin K

P1: 5'- CAGCAGAACGGAGGCATTGA -3'

P2: 5'- CTTTGCCGTGGCGTTATACATACA -3' Product Size 84 bp

TRAP 染色

○試薬調整

- ・ 固定液(para-formaldehyde)

PFA 〈Wako〉 2 g

2N NaOH 27.5 ml

PBS 50 ml

→65°Cで完全に溶解し、室温に冷まして使用する

- ・ 染色液

TRAP Buffer 50 ml

NAPHTHOL AS-MX PHOSPHATE 〈SIGMA〉 5 mg

N,N-DIMETHYLFORMAMIDE 〈SIGMA〉 0.5 ml

Fast Red Violet LB Salt 〈SIGMA〉 30 mg

→完全に溶解し Filtration してから用いる

○手順

1. 細胞 dish の Medium をすて、PBS で 2 回 wash する.
2. 固定液を well に添加し、15 分間細胞を固定する.
3. PBS で 2 回 wash する.
4. 細胞に Acetone : Ethanol = 1 : 1 を添加し、permeabilize する.
5. 染色液を入れ、多核の細胞が染まるまで染色する.
6. PBS で 2 回 wash し、倒立型顕微鏡で観察する.

第二項 初代培養細胞における破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現

生後 6~8 週齢程度のマウスの骨髄中には、未分化の間葉系幹細胞やマクロファージが豊富に存在し、細胞の増殖分化が盛んに起こっている。大腿骨から骨髄細胞をシャーレに回収し、M-CSF 存在下で培養を続けることで骨髄由来マクロファージ(BMMs)を単離する事が可能で、更に RANKL 刺激を与えると破骨細胞へと分化誘導することができる。通常、RANKL 刺激から 4 日目~5 日目で、細胞融合して多核化した破骨細胞が観察できる。分化した破骨細胞は固定後、TRAP 染色を行うと、TRAP 陽性の成熟破骨細胞は赤色に染まる。

まず、8 週齢の *Dennd2A*^{-/-}マウスと対照群(*Dennd2A*^{+/+})から大腿骨を採取した。大腿骨中から骨髓細胞を回収し、M-CSF 入りの培地で 2 日間培養し、BMMs を増殖させた。2 日後、TRAP 染色用は 24 well プレート、RNA 回収用は 6 well プレートに播きなおし、RANKL を添加する。この時点を生分化 0 日目(DAY0)と定義し、48 時間後の DAY2 にも RANKL 入りの培地で培地交換した。対照群を基準に、DAY4 で多核化した破骨細胞が観察された。

DAY4 の細胞を 4%PFA で固定し、分化を止め、TRAP 染色を行った。TRAP 陽性かつ核数が 3 つ以上の細胞を成熟破骨細胞と定義し、well 中の成熟破骨細胞数を計測した。その結果、対照群と比較して、*Dennd2A*^{-/-} マウスの骨髓中から単離した細胞は成熟破骨細胞の数が顕著に減少しており、骨形態計測の結果とも一致するものであった(Fig.3-11)。

また、分化 DAY0, DAY2, DAY3, DAY4 の 4 点で細胞を回収し、それぞれから抽出した RNA を用いて破骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、対照群と比較して *Dennd2A*^{-/-} マウス由来の破骨細胞は分化初期段階において、分化の master regulator である NFATc1 遺伝子の発現が低下していることがわかった(Fig.3-12)。特に分化初期(DAY0~2)の発現量は 50%以下に低下しており、*Dennd2A* が破骨細胞の分化初期に NFATc1 の転写カスケードに関与し、発現を促進する可能性が示唆された。また、破骨細胞同士の細胞融合に必要な DC-STAMP の発現量に異常を認めなかったことや、*Dennd2A*^{-/-} 由来の細胞からも、成熟破骨細胞が一定数出来ていることから、細胞融合・多核化には影響がないことも推察できる。

以上の結果より、*Dennd2A* は破骨細胞の分化成熟過程において、分化を促進し成熟破骨細胞の数を増加させることで、骨量を負に調節する因子であることが明らかになった。

第五節 小括

本章では、*Dennd2A* の骨代謝における生体内機能を明らかにするために、作出した全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスの表現型解析を行った。

まず全身的な影響の有無を確認するため、全身的な表現型解析を行った。*Dennd2A*^{-/-} マウスはメンデルの法則比に従って出生することから、*Dennd2A*^{-/-} マウスは lethality を示さず、発生過程に異常を示さないことがわかった(Fig.3-1)。また体重や体長、臓器重量にも差を認めず、外観上の異常や行動にも特に異常は見られなかった。*Dennd2A*^{-/-} マウスは対照群と比較して生殖能力に異常はなく、体重や臓器重量も正常で、成長異常を示さないことが明らかになった(Fig.3-3)。

次に、*Dennd2A* の発現量が高かった骨組織に着目して表現型解析を行った結果、軟 X 線撮影と DXA 法による骨密度測定により、*Dennd2A*^{-/-} 雌マウスの骨は対照群と比較して有意な骨量増加を示すことが明らかとなった(Fig.3-6)。骨形態計測と血清中の骨吸収パラメータの測定により、KO マウスの骨量増加は、成熟破骨細胞数の減少による骨吸収不全によることが明らかになった(Fig.3-9,10)。

さらに、破骨初代培養細胞を用いた実験から、*Dennd2A*^{-/-} マウスの骨髓中から単離した細胞は成熟破骨細胞の数が顕著に減少しており、分化初期段階の NFATc1 の発現量が低下していることが明らかとなった(Fig.3-11,12)。今後は、実際に *Dennd2A* が NFATc1 転写調節に関与しているかなど、骨量調節の分子メカニズムの詳細な検討が必要である。

♂			
WT	Het	KO	Total
9	15	6	30
30%	50%	20%	

♀			
WT	Het	KO	Total
6	16	10	32
19%	50%	31%	

♂ + ♀			
WT	Het	KO	Total
15	31	16	62
24%	50%	26%	

Fig.3-1 全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスは lethality を示さない

Dennd2A flox マウスと CMV-Cre マウスを交配させ、得られた *Dennd2A* ヘテロマウス同士の交配から生まれた仔を生後 10 日で genotyping した。

WT: *Dennd2A*^{+/+}, Het: *Dennd2A*^{+/-}, KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す。

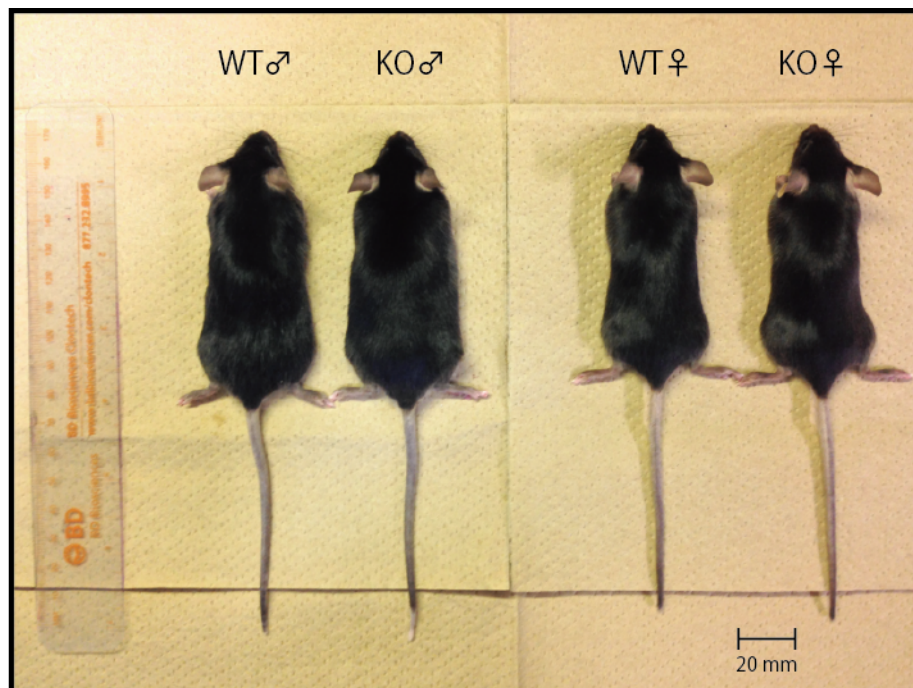


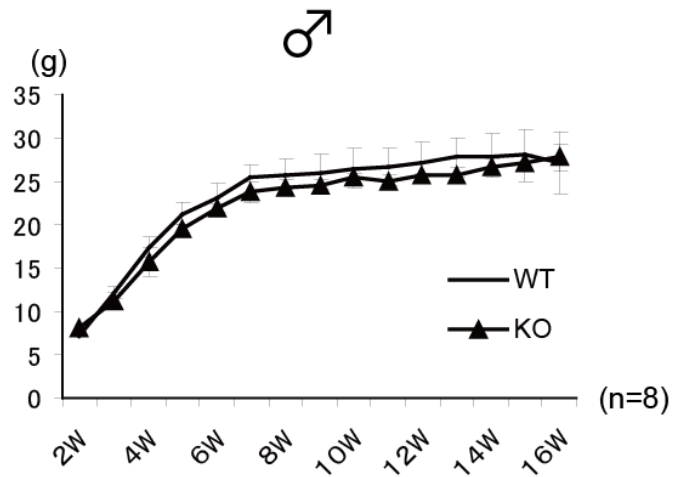
Fig.3-2 全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスの外観写真

生後 16 週齢の *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスの外観。

体重 1g あたり 0.05mg の Pentobarbital Sodium で麻酔後撮影した。

WT: *Dennd2A*^{+/+}, KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す。

A



B

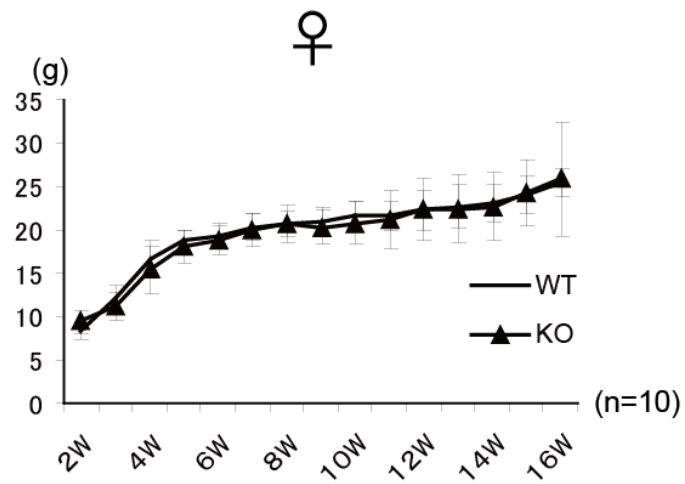


Fig.3-3 全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスは成長異常を示さない

Dennd2A マウスを生後 10 日で genotyping し, 2 週齢から 16 週齢まで同時刻に体重測定した.

A. 雄 (n=8), B. 雌 (n=10) の平均値に対して統計学的処理を行った.

WT: *Dennd2A*^{+/+}, KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す.

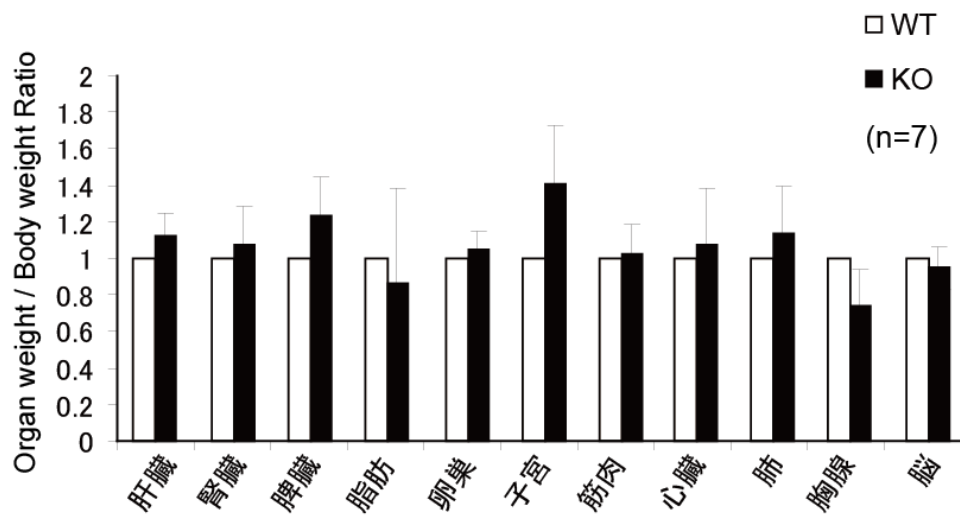


Fig.3-4 全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスは臓器重量に異常を示さない

16 週齢の *Dennd2A* マウスから各臓器を摘出し、重量を測定した。測定値は体重で補正し、WT マウスの値を 1 としたときの相対値を示した。n=7 の平均値に対して統計学的処理を行った。

WT: *Dennd2A*^{+/+}, KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す。

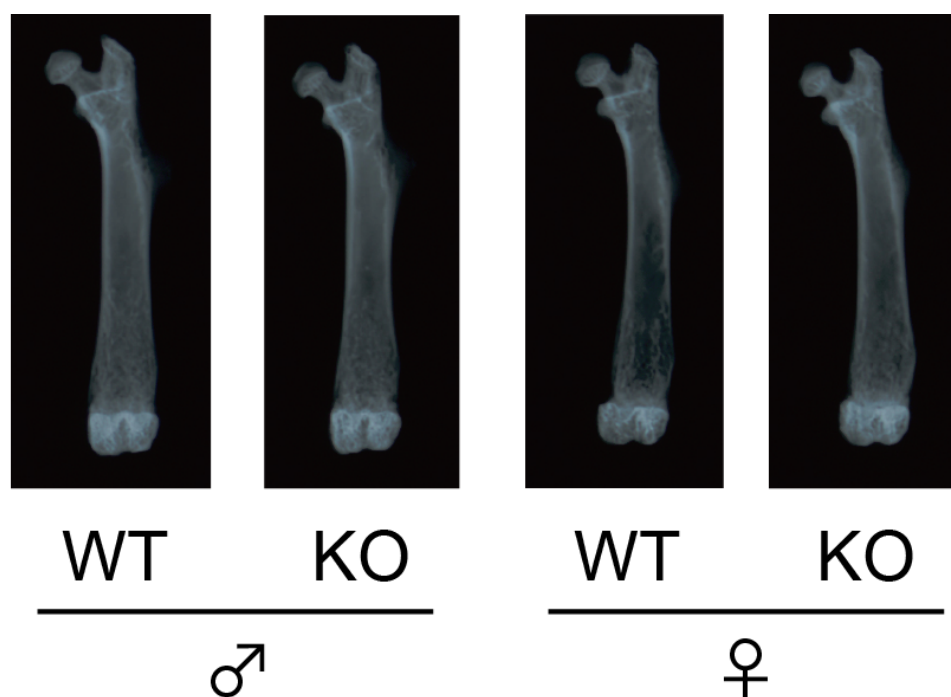


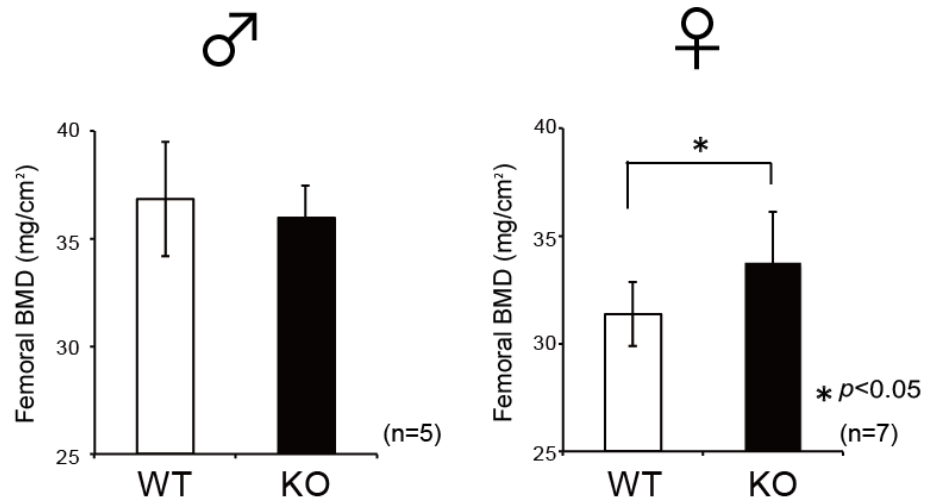
Fig.3-5 全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスの大腿骨軟 X 線写真

16 週齢の *Dennd2A* マウスから大腿骨を摘出し，軟 X 線写真撮影を行った．

骨組織のミネラルは X 線不透過性であるため，X 線撮影を行うと石灰化部位は白く，未石灰化部位は黒く撮影される．

WT: *Dennd2A*^{+/+}，KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す．

A



B

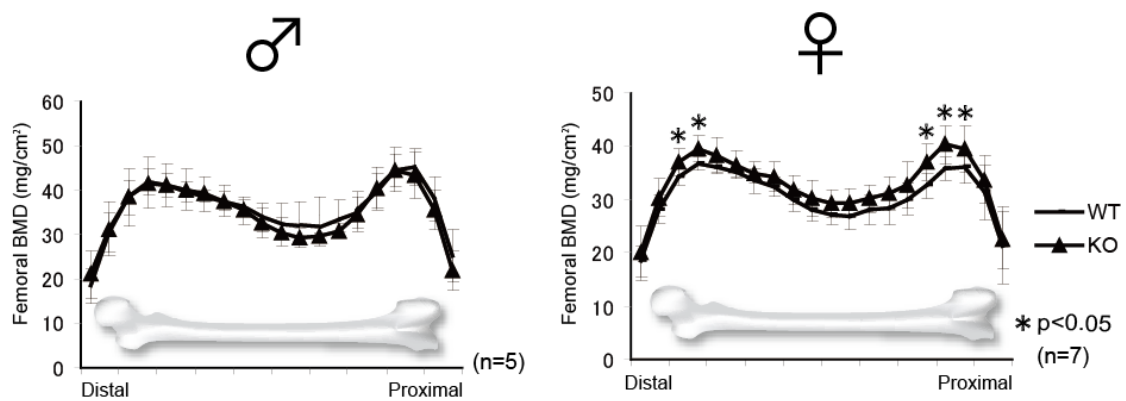


Fig.3-6 全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスの大腿骨骨密度

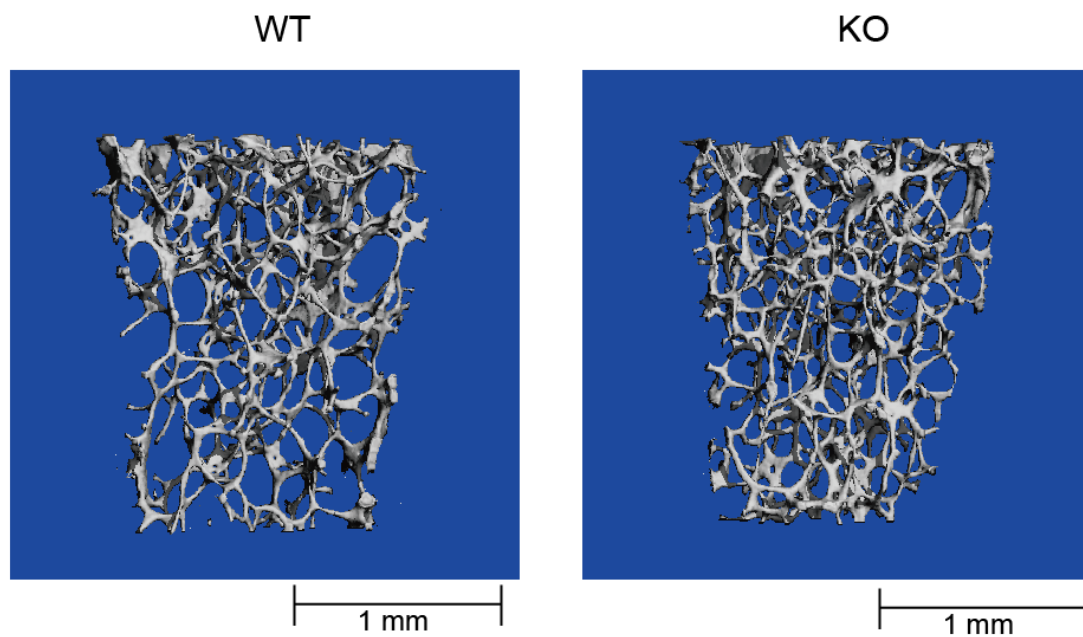
16 週齢の *Dennd2A* マウスから大腿骨を摘出し、DXA 法にて骨密度を測定した。

A は総骨密度、B は総骨密度を近位部から遠位部にかけて長軸方向に 20 分割して算出した。

雄は n=5, 雌は n=7 の平均値に対して統計学的処理を行った。* $p < 0.05$

WT: *Dennd2A*^{+/+}, KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す。

A



B

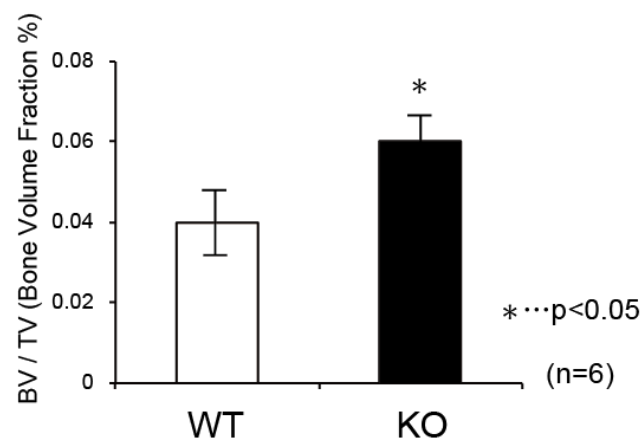


Fig.3-7 全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスの大腿骨のマイクロ CT 画像

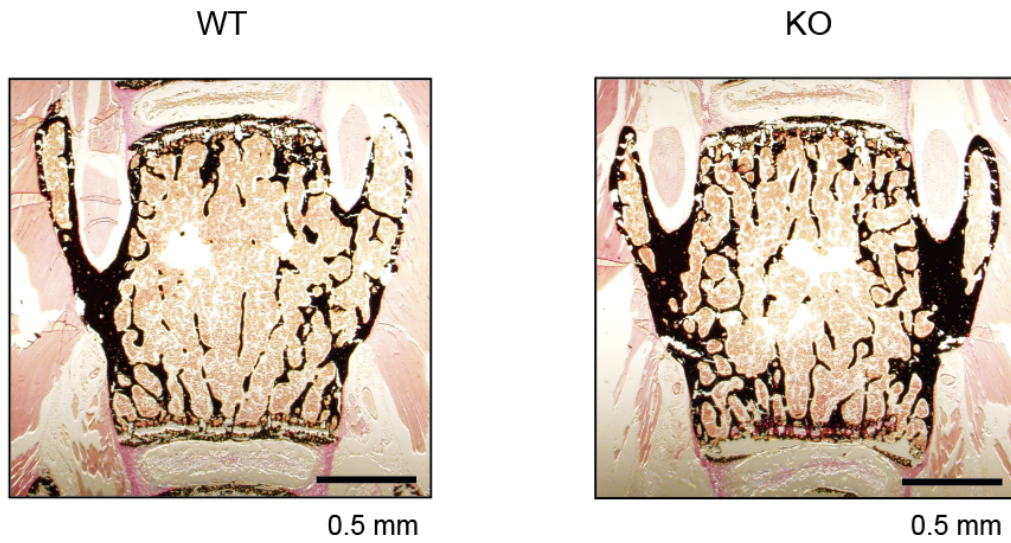
A. 16 週齢の *Dennd2A* マウスから大腿骨を摘出し、マイクロ CT による 3D 画像解析を行った。

B. 骨密度：BV/TV(Bone Volume Fraction, %)

n=6 の平均値に対して統計学的処理を行った。*p<0.05

WT: *Dennd2A*^{+/+}, KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す。

A



B

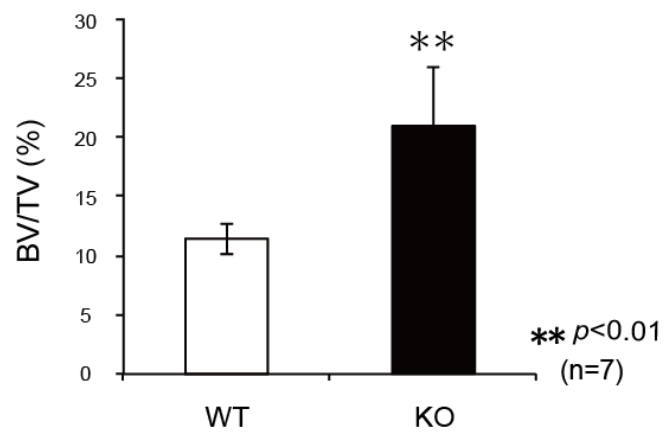


Fig.3-8 骨形態計測を用いた骨構造パラメータ (1)

A. Von Kossa 染色による 16 週齢雌マウス第四腰椎の染色画像．黒く網目状に染まっている部分が海面骨を表す．スケールは右下のバーが 0.5 mm を示す．

B. 骨構造パラメータを示す．

海面骨骨量 BV/TV(Bone Volume Fraction, %)

n=7 の平均値に対して統計学的処理を行った．**p<0.01

WT: *Dennd2A*^{+/+} , KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す．

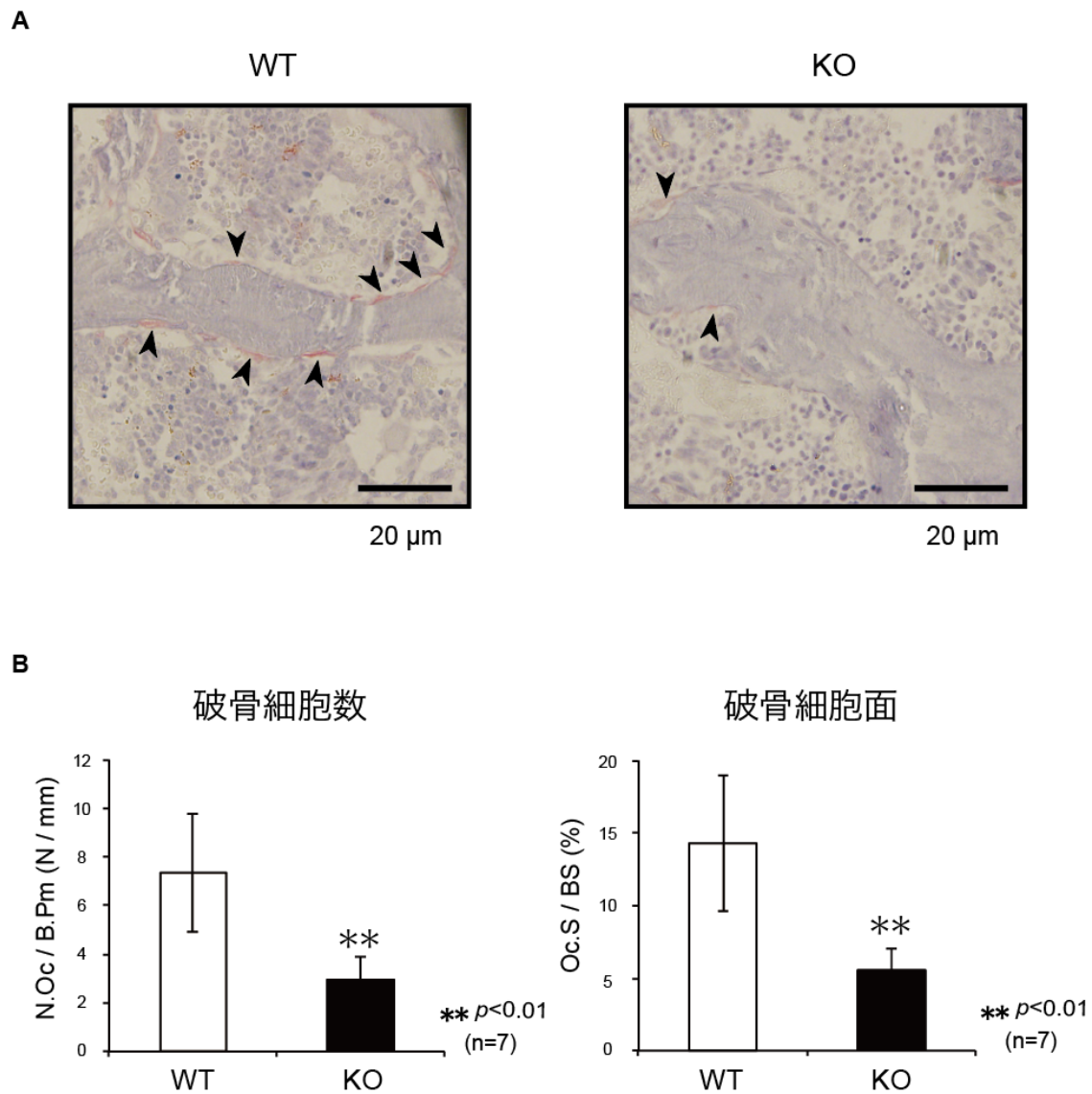


Fig.3-9 骨形態計測を用いた骨構造パラメータ (2)

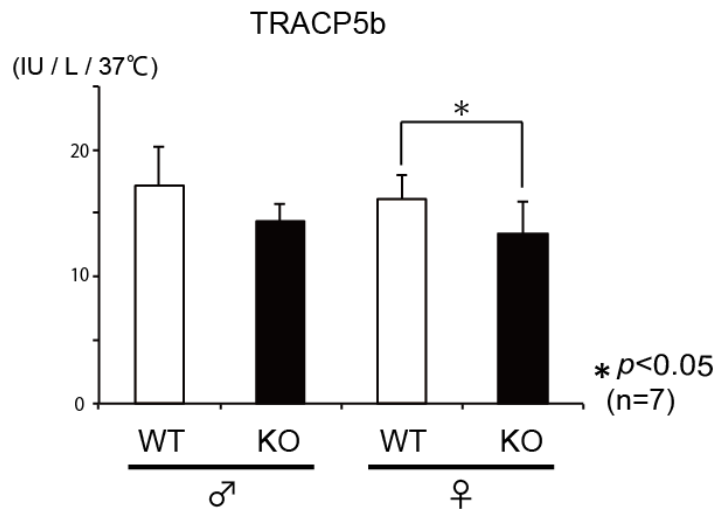
A. TRAP 染色による 16 週齢雌マウスの第四腰椎の染色画像 . TRAP 陽性の赤い部分 (矢印で図示) が破骨細胞を表す . スケールは右下のバーが 20 μm を示す .

B. 骨構造パラメータを示す .

左 : 破骨細胞数 N.Oc/B.Pm(Osteoclast Number), 右 : 破骨細胞面 Oc.S/BS(Osteoclast/Bone surface) n=7 の平均値に対して統計学的処理を行った . **p<0.01

WT: *Dennd2A*^{+/+} , KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す .

A



B

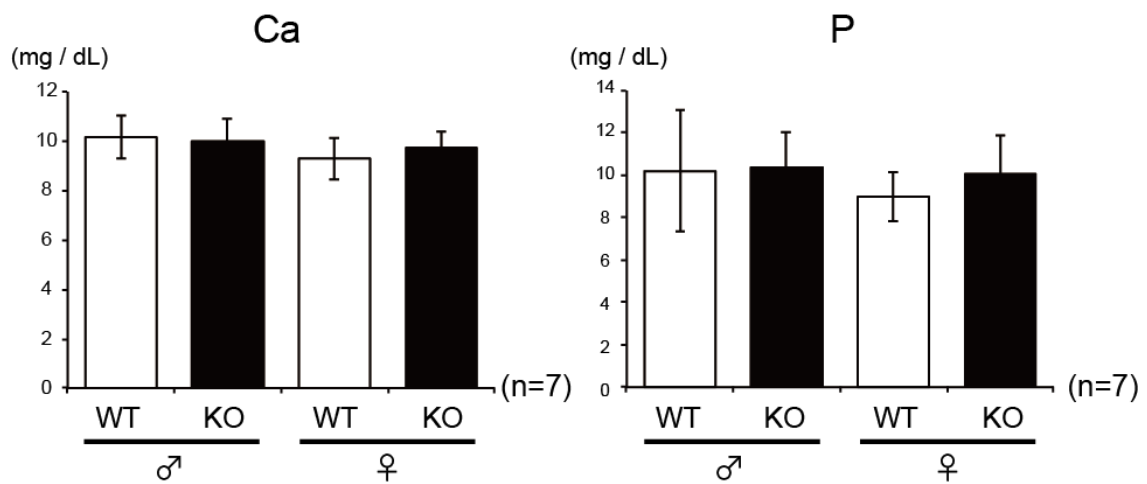


Fig.3-10 血中骨代謝マーカー濃度の解析

A. 骨吸収マーカーには骨吸収時に破骨細胞が分泌する酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ TRACP5b (tartrate-resistant acid phosphatase from 5b) を用いた .37°Cにおけるユニットあたりの酵素量 .

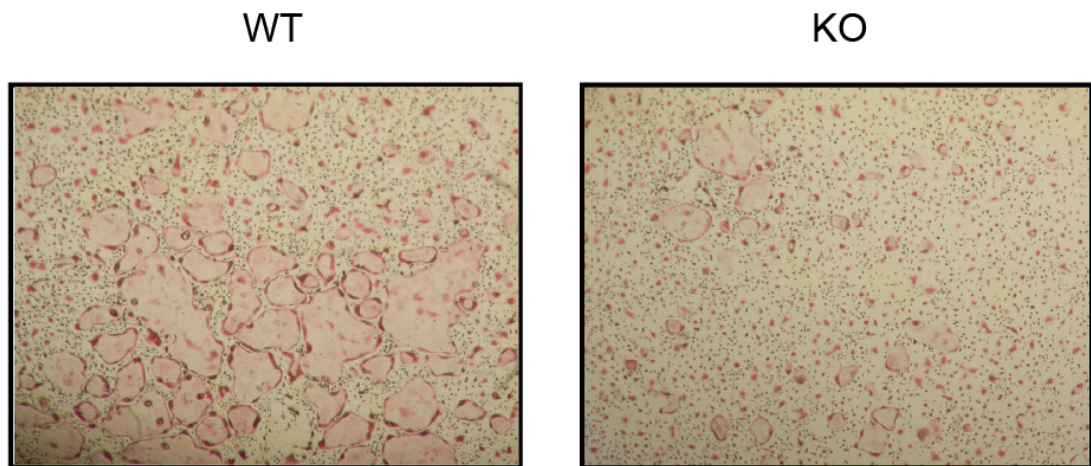
B. 骨代謝マーカーの血中濃度 .

左 : Ca(カルシウム) mg/dL, 右 :P(リン) mg/dL

n=7 の平均値に対して統計学的処理を行った . * $p < 0.05$

WT: *Dennd2A*^{+/+}, KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す .

A



B

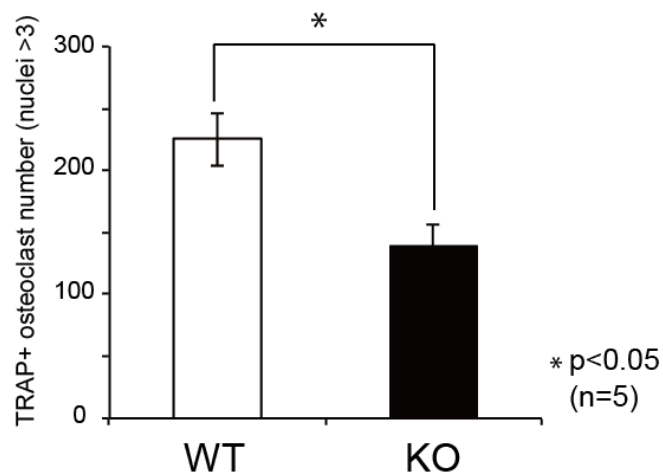


Fig.3-11 破骨初代培養細胞の分化能の検討

A. 8 週齢 *Dennd2A* マウス大腿骨から骨髓細胞をシャーレに回収し, M-CSF, RANKL 刺激を与え破骨細胞へと分化誘導した. RANKL 刺激から 4 日目に固定後, TRAP 染色を行い写真撮影した.

B. TRAP 陽性の成熟破骨細胞は TRAP 染色により赤色に染まる. TRAP 陽性かつ核が 3 つ以上の細胞を成熟破骨細胞として, well 内の細胞をすべて計測した. マウス 1 匹につき 6 well 分の平均値を $n=1$ とし, $n=5$ に対して統計学的処理を行った. * $p<0.05$

WT: *Dennd2A*^{+/+}, KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す.

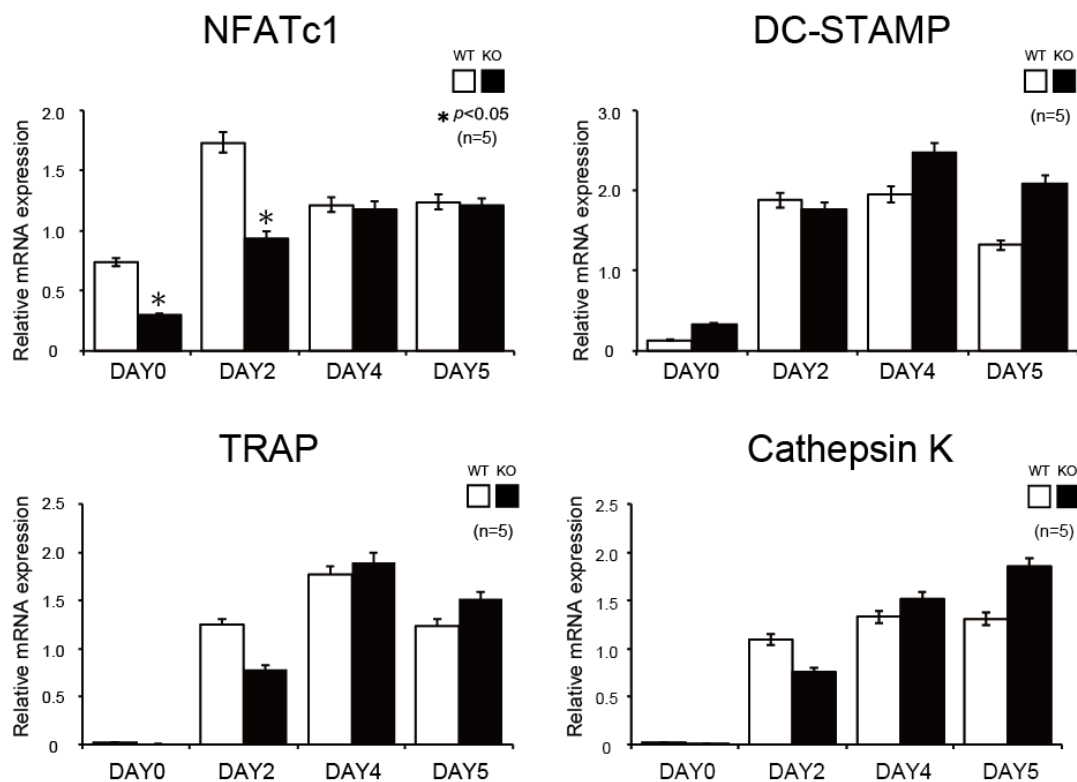


Fig.3-12 破骨初代培養細胞分化マーカーの発現解析

破骨初代培養細胞に RANKL 刺激した時点を DAY0 とし，分化 DAY0, DAY2, DAY3, DAY4 の 4 点で細胞を回収し，それぞれから抽出した RNA を用いて破骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を調べた．n=5 の平均値に対して統計学的処理を行った．*p<0.05

WT: *Dennd2A*^{+/+}，KO: *Dennd2A*^{-/-} を示す．

第四章 総合討論

はじめに

本研究では、破骨細胞の分化・成熟に伴って *Dennd2A* の発現が上昇することに着目し、機能未知因子 *Dennd2A* の遺伝子欠損マウスの作出と、その表現型解析を試みた。

その結果, *Dennd2A flox* マウスの作出に成功し, *Dennd2A* が骨代謝調節機構において破骨細胞の分化を促進し, 骨吸収を正に制御することで骨量減少に寄与する新規骨量調節因子であることを明らかにできた(Fig.4-1).

本章では、本研究の成果と、今後の課題・展望について述べる。

第一節 本研究の成果 I. *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスの作出

本研究では、Cre/loxP システムを用いることでより汎用性の高い *flox* マウスの作出に成功した。今後は *Dennd2A flox* マウスと、目的の組織でのみ Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスを掛け合わせることで、組織特異的な *Dennd2A* マウスの作出を簡単に行うことができる。

従来の標的遺伝子領域に Neo カセットを挿入するというノックアウトマウス作出手法では、その解析には主に二つの問題点がある。一つは標的遺伝子がマウスの発生に不可欠な因子であり、胎性致死に至る場合、成体での機能解析が出来ない点である。この場合、胎性致死の原因を特定するのは非常に困難である。もう一つは、ある組織で見られた表現型の原因が、変異を起こした組織自体によるものなのか、他の組織や細胞を介した二次的作用によるものなのか判別が難しい場合である。この場合もより詳細な変異のメカニズムを探るためには、組織特異的な遺伝子欠損マウスが不可欠となる。

本研究では、作出した *Dennd2A flox* マウスと、全身で Cre recombinase を発現する CMV-Cre トランスジェニックマウスを掛け合わせることで、全身で *Dennd2A* 遺伝子を欠損する *Dennd2A*^{-/-} を作出したが、*Dennd2A* のターゲットとして知られる Rab 9 は様々な細胞で生理機能を有する事から、他の組織からの二次的作用の影響が十分に考えられる。

今後は全身だけでなく、骨組織特異的な *Dennd2A* 欠損マウスや、骨以外の様々な組織特異的 *Dennd2A* 欠損マウスを作出することで、より詳細な *Dennd2A* および Small GTPase family の生理機能の解明につながることを期待される。

第二節 本研究の成果 II. Dennd2A の骨代謝制御機構における生体内機能の解明

近年, Small GTPase や酵素反応を媒介する GEF, GAP の様々な生理機能が明らかにされている. Small GTPase は哺乳類において約 150 種類が同定されており, 構造と機能によって大きく 5 つのグループに分類される. Rho GTPase は細胞骨格制御, Ras GTPase は細胞増殖制御, Rab GTPase と Arf GTPase は小胞輸送の制御, Ran GTPase は核内輸送を制御することがわかってきた.

なかでも骨代謝領域において, Rac 1 をターゲットとする GEF タンパク質の一種である Vav 3 が骨量調節に関与している事が, KO マウスの解析により明らかにされた. Vav 3 遺伝子欠損マウスは, 破骨細胞の走化性やアクチンリングの形成に異常を認め, 多核成熟化破骨細胞の減少による骨吸収不全を主原因とする, 骨量増加の表現型を呈することが明らかにされた. Vav 3 の KO マウスの解析結果により, Vav 3 と同様に GEF 活性をもつ他の分子が, 骨代謝制御機構のなかでも, 破骨細胞の分化・機能発現を調節する役割を担っている可能性が示唆された. われわれは, GEF 活性を有するタンパク質ドメインを持ち, 破骨細胞で発現の高い因子をスクリーニングした結果, DENN/MADD family に属する Dennd2A の発現量が, 破骨細胞の分化・成熟に伴って上昇する事を見いだした.

Dennd2A は Vav 3 と同様に GEF 活性をもつ DENN/MADD ドメインを有するタンパク質であり, 成熟破骨細胞に強く発現していることから, 破骨細胞において重要な機能をもつ因子であることが示唆された. 実際に全身性 Dennd2A 欠損マウスの骨表現型解析により, Vav 3 KO マウスとよく似た骨表現型を呈することが明らかになった.

本研究で明らかにした *Dennd2A*^{-/-} の表現型は以下の四点である.

1. *Dennd2A*^{-/-} は胎性致死を示さず, 生殖能力も正常である.
2. *Dennd2A*^{-/-} は成長異常を示さず, 臓器重量にも変化がない.
3. *Dennd2A*^{-/-} は骨密度の上昇を示す.
4. *Dennd2A*^{-/-} の骨組織では, 破骨細胞形成に異常が見られ, 骨吸収が低下している.

以下, これらの表現型より明らかになった Dennd2A の生体内機能について述べる.

Dennd2A^{-/-}の全身的な表現型解析

まず, Dennd2A が発生過程に寄与しているかどうか検討するため, Dennd2A^{-/-}の出生率を調べた結果, 雌雄ともにメンデルの法則に従い WT: ヘテロ: KO = 1 : 2 : 1 の割合で出現することがわかった. よって Dennd2A^{-/-}は lethality を示さず, 発生過程に異常を示さないと結論づけた. また, Dennd2A^{-/-}を C57BL/6J と交配させた結果, 雌雄ともに正常に妊娠・出産することから, 生殖能力にも特に問題がない.

また, 2 週齢から 16 週齢までマウスの体重を測定した結果, Dennd2A^{-/-}は対照群と比較して体重に差を認めず, 成長異常を示さない. 外観上の異常や行動にも特に異常は見られず, 体長にも差はなかった.

さらに, 16 週令において各臓器の重量を測定した結果, Dennd2A^{-/-}は対照群と比較して臓器重量にも有意な差を認めないことがわかった. 特に Dennd2A の発現が高かった肺においても外観上異常は見られず, 重量に関しても対照群と大差がなかった.

以上の結果から, Dennd2A^{-/-}は対照群と比較して生殖能力に異常はなく, 体重や臓器重量も正常で, 成長異常を示さないことが明らかになった.

Dennd2A^{-/-}の骨組織における表現型解析

全身的な表現型解析により, Dennd2A^{-/-}は外見上, 特に顕著な異常を認めなかった. そこで, もともと骨組織での生理機能が予測されたことから, 骨組織における表現型解析を行った.

16 週齢の Dennd2A^{-/-}と対照群の大腿骨を摘出し, 軟 X 線撮影及び DXA 法による骨密度測定を行ったところ, Dennd2A^{-/-}雌マウスは対照群と比較して X 線透過性の低下を認め, 大腿骨骨密度は 108.5% の高値を示すことがわかった.

軟 X 線写真と DXA 法による骨密度測定により, Dennd2A^{-/-}雌マウスの骨は対照群と比較して有意な骨量増加を示すことが明らかとなった. この骨量増加の原因が破骨細胞による骨吸収にあるのか, 骨芽細胞による骨形成にあるのかを調べるため, 骨形態計測を用いて実際の骨組織における骨代謝パラメータを測定した結果, Dennd2A^{-/-}雌マウスの骨は対照群と比較して破骨細胞数及び破骨細胞面の減少を認めたが, 骨芽細胞の骨形成パラメータには差を認めなかった. Dennd2A^{-/-}雌マウスの血清 TRACP5b 濃度が有意に低下していることから, Dennd2A^{-/-}マウスの骨量増加は, 破骨細胞数の減少に伴う骨吸収不全が原因の一つであることが明らかとなった.

破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析

8 週齢の *Dennd2A*^{-/-} と対照群(*Dennd2A*^{+/+})の大腿骨中から骨髓細胞を回収し, M-CSF 入りの培地で 2 日間培養し, BMMs を増殖させた. RANKL 刺激後約 4 日で多核化した破骨細胞が観察された.

分化した破骨細胞を TRAP 染色し, TRAP 陽性かつ核数が 3 つ以上の細胞を成熟破骨細胞と定義し, well 中の成熟破骨細胞数を計測した結果, 対照群と比較して, *Dennd2A*^{-/-} の骨髓中から単離した細胞は成熟破骨細胞の数が顕著に減少しており, これは骨形態計測の結果とも一致するものであった.

また, 分化の各段階で細胞を回収し, それぞれから抽出した RNA を用いて破骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を調べた結果, 対照群と比較して *Dennd2A*^{-/-} 由来の破骨細胞は分化初期段階において, 分化の master regulator である NFATc1 遺伝子の発現が低下していることが明らかになった. 特に分化初期(DAY0~2)の発現量は 50% 以下に低下しており, *Dennd2A* が破骨細胞の分化初期に NFATc1 の転写カスケードに関与し, 発現を促進する可能性が示唆された. また, 破骨細胞同士の細胞融合に必須な DC-STAMP の発現量に異常を認めなかったことや, *Dennd2A*^{-/-} 由来の細胞からも, 成熟破骨細胞が一定数出来ていることから, 細胞融合・多核化には影響がないことも推察できる.

以上本研究により, *Dennd2A* は破骨細胞の分化成熟過程において, 分化を促進し成熟破骨細胞の数を増加させることで, 骨量を負に調節する因子であること, NFATc1 の発現を正に調節することが示唆された.

しかしながら, *Dennd2A* が直接 NFATc1 の転写制御を行っているのかどうかは明らかではなく, その分子メカニズムはまだまだ不明な点が多い. 今後の課題として *Dennd2A* や GEF の作用メカニズムと分子機能の解明が必須である.

第三節 今後の課題と展望

Dennd2A^{-/-} 雌マウスは対照群と比較して X 線透過性の低下を認め、大腿骨骨密度の有意な増加を示す。この骨量増加は多核成熟破骨細胞の減少による骨吸収不全を主要原因とするものであることが、骨形態計測と破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析から明らかとなった。しかし、その作用機序をはじめ不明な点がありにも多く、*Dennd2A*^{-/-} の詳細な解析とともに、*in vitro* 解析手法を用いた *Dennd2A* の分子メカニズムの解明が待たれる。

課題 1. *Dennd2A* の作用メカニズムの解明

破骨初代培養細胞を用いた *in vitro* 解析から、*Dennd2A*^{-/-} の破骨細胞では、分化初期段階で NFATc1 の発現が低下していることがわかった。しかしながら、*Dennd2A* の細胞局在や相互作用因子は明らかにされておらず、マウスの *Dennd2A* 抗体も作出されていない。今後は *Dennd2A* の抗体作成を行い、*Dennd2A* の分子機能解析が必須である。

まず、*Dennd2A* の破骨細胞内での局在と、破骨細胞内における GEF の基質を、免疫染色やタンパク質 pull-down、免疫沈降法により明らかにする必要がある。また、NFATc1 のプロモータに結合する転写因子群と *Dennd2A* が相互作用するかどうか調べる事で、NFATc1 の発現調節メカニズムも解明したい。

課題 2. 雌雄差の原因解明

Dennd2A^{-/-} の骨量増加の表現型は雌の KO マウスでのみ見られ、雄の KO マウスでは有意な差を認めなかったことから、雄の骨組織においては何らかの代替経路が存在し、*Dennd2A* 欠損による影響が表面化していないことが推察された。Vav 3 の上流に位置する非レセプター型 tyrosine kinase である c-Src は、破骨細胞の分化の際に M-CSF の受容シグナルを PI3 kinase と協調して下流に伝えることで、破骨細胞の分化を促進する因子であることが知られている。c-Src は女性ホルモン受容体である ERα と協調して破骨細胞の Cathepsin K や TRAP の分泌量を調節することや^{74,75}、アポトーシスによって破骨細胞の寿命を調節することも近年明らかにされつつあることから、雌において *Dennd2A* 欠損の影響がより顕著に現れる一因であることも推察される。今後、更に詳細な分子メカニズムとともに、雌雄における骨量調節機構の差異の究明にも期待がかかる。

展望 1. 骨代謝制御機構における Small GTPase と GEF の機能

Small GTPase や GEF の骨代謝領域での生理機能を, Vav 3 に次いで, Dennd2A の KO マウスの表現型からも明らかにすることができた. しかし, Vav 3 と Dennd2A は基質の Small GTPase family が異なり, その作用機序にも隔たりがある. Vav 3 の KO マウスの表現型は, アクチン細胞骨格の再構築不全による多核成熟破骨細胞の減少が原因で骨量が増加していた⁶². これは Vav 3 の基質である Rho GTPase の機能が細胞骨格制御であることと一致する. 一方, *Dennd2A*^{-/-}では破骨細胞の分化初期に何らかの異常をきたし, 成熟破骨細胞数が減少するが, Rab 9 の主な生理機能はリソソーム形成やトランスゴルジネットワークの制御であると言われている⁷⁶⁻⁸⁰.

今後は, Rab 9 の欠損によっても同様の表現型を呈するかどうかなど, 破骨細胞の分化や機能制御機構のなかで, Rab GTPase や GEF がどのような意義をもつかを明らかにしていく必要がある.

展望 2. Dennd2A のその他の生理機能

Small GTPase family と GEF の種類は多岐にわたり, 様々な生理機能に関わる事が予測される. 今回作出した全身性 *Dennd2A* 欠損マウスは, 骨組織以外の組織で詳細な表現型解析を行っていない. 今回の全身的な表現型解析で拾いきれなかった表現型や, 外見上分かりにくい表現型がある可能性は非常に高く, *Dennd2A* の生体内機能の理解には, 骨組織意外での生理機能の解明も必須である. 今回作出した *Dennd2A* *flax* マウスを用いて, 様々な組織特異的 *Dennd2A* 欠損マウスの作出・解析を行う意義は大きい.

以上, 本研究では全身性 *Dennd2A* 遺伝子欠損マウスを作出し, その骨表現型を解析することにより, 骨代謝制御機構における *Dennd2A* の生体内機能の一部が, 破骨細胞が担う骨吸収を正に制御することによる骨量調節への寄与であり, *Dennd2A* が新規骨量調節因子であることを解明することが出来た. 今後, 更に詳細な分子メカニズムが解明されれば, 骨量調節における破骨細胞分化・機能を制御する仕組みの全容が明らかになることが期待できる.

本研究のまとめ

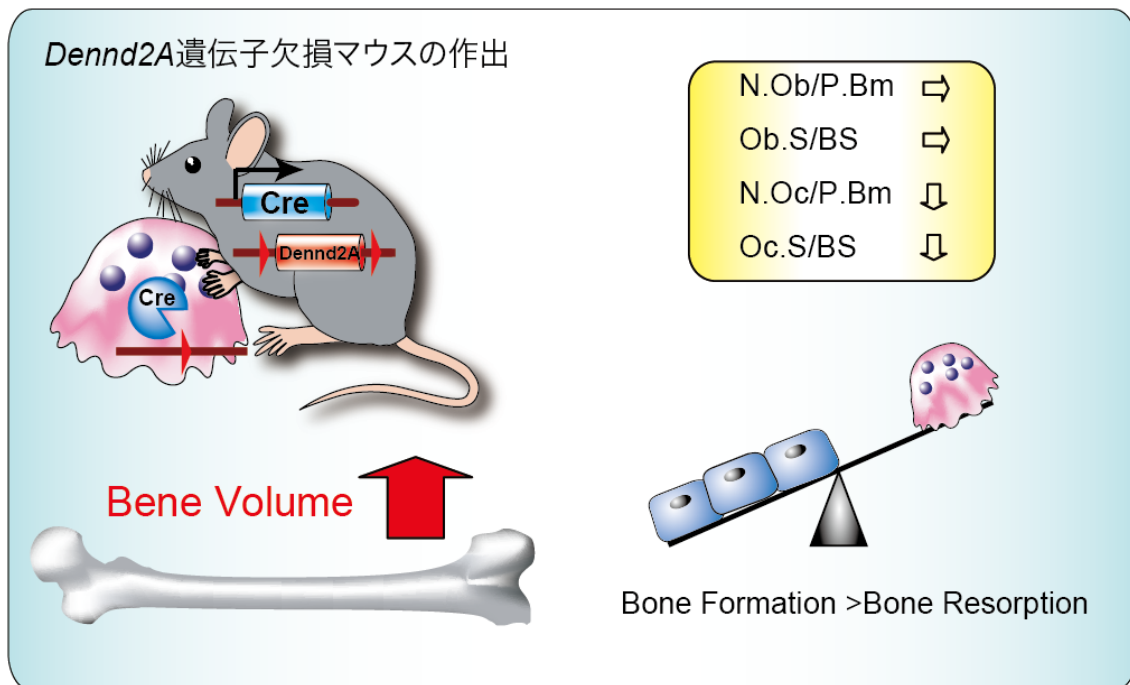


Fig.4-1 本研究のまとめ

本研究では全身性 Dennd2A 遺伝子欠損マウスの作出に成功し、その骨表現型を解析することにより、骨代謝制御機構における Dennd2A の生体内機能の一部が、破骨細胞が担う骨吸収を正に制御することによる骨量調節への寄与であり、Dennd2A が新規骨量調節因子であることを解明することが出来た。今後、更に詳細な分子メカニズムが解明されれば、骨量調節における破骨細胞分化・機能を制御する仕組みの全容が明らかになることが期待できる。

参考文献

1. Karsenty, G. The central regulation of bone remodeling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **11**, 437-439 (2000).
2. Karsenty, G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab* **4**, 341-348 (2006).
3. Takeda, S. & Karsenty, G. Central control of bone formation. *Journal of bone and mineral metabolism* **19**, 195-198 (2001).
4. Takeda, S. & Karsenty, G. Molecular bases of the sympathetic regulation of bone mass. *Bone* **42**, 837-840 (2008).
5. Hamersma, H. Osteopetrosis (Marble bone disease) of the temporal bone. *The Laryngoscope* **80**, 1518-1539 (1970).
6. Haymovits, A. & Rosen, J.F. Calcitonin in metabolic disorders. *Advances in metabolic disorders* **60**, 177-212 (1972).
7. Duong, L.T. & Rodan, G.A. Integrin-mediated signaling in the regulation of osteoclast adhesion and activation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **3**, d757-768 (1998).
8. Russell, R.G. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1068**, 367-401 (2006).
9. Russell, R.G. Bisphosphonates: mode of action and pharmacology. *Pediatrics* **119 Suppl 2**, S150-162 (2007).
10. Russell, R.G. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* **49**, 2-19 (2011).
11. Wada, S., Kamiya, S. & Ono, K. [Bisphosphonates: the molecular targets and mechanisms of action]. *Clinical calcium* **15**, 819-824 (2005).
12. Karsenty, G. & Wagner, E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* **2**, 389-406 (2002).
13. Rodan, G.A. & Martin, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289**, 1508-1514 (2000).
14. Teitelbaum, S.L. & Ross, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* **4**, 638-649 (2003).
15. Lagasse, E. & Weissman, I.L. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in op/op mice. *Cell* **89**, 1021-1031 (1997).
16. Udagawa, N., *et al.* Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable

- of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7260-7264 (1990).
17. Hsu, H., *et al.* Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3540-3545 (1999).
 18. Kong, Y.Y., *et al.* OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* **397**, 315-323 (1999).
 19. Simonet, W.S., *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**, 309-319 (1997).
 20. Franceschi, R.T. & Xiao, G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem* **88**, 446-454 (2003).
 21. Karsenty, G. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology* **142**, 2731-2733 (2001).
 22. Komori, T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *Journal of bone and mineral metabolism* **21**, 193-197 (2003).
 23. Aubin, J.E., Liu, F., Malaval, L. & Gupta, A.K. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone* **17**, 77s-83s (1995).
 24. Rodan, G.A. & Noda, M. Gene expression in osteoblastic cells. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **1**, 85-98 (1991).
 25. Atkins, G.J. & Findlay, D.M. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **23**, 2067-2079 (2012).
 26. Toyosawa, S., Oya, K., Sato, S. & Ishida, K. [Osteocyte and DMP1]. *Clinical calcium* **22**, 713-720 (2012).
 27. Karsenty, G. Transcriptional control of skeletogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**, 183-196 (2008).
 28. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* **99**, 1233-1239 (2006).
 29. Bonewald, L.F. Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell Metab* **5**, 410-411 (2007).
 30. Feng, J.Q., *et al.* Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* **38**, 1310-1315 (2006).

31. Winkler, D.G., *et al.* Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* **22**, 6267-6276 (2003).
32. George, A., Sabsay, B., Simonian, P.A. & Veis, A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization. *The Journal of biological chemistry* **268**, 12624-12630 (1993).
33. Hirst, K.L., Ibaraki-O'Connor, K., Young, M.F. & Dixon, M.J. Cloning and expression analysis of the bovine dentin matrix acidic phosphoprotein gene. *J Dent Res* **76**, 754-760 (1997).
34. MacDougall, M., Gu, T.T., Luan, X., Simmons, D. & Chen, J. Identification of a novel isoform of mouse dentin matrix protein 1: spatial expression in mineralized tissues. *J Bone Miner Res* **13**, 422-431 (1998).
35. Lo Iacono, N., *et al.* RANKL cytokine: from pioneer of the osteoimmunology era to cure for a rare disease. *Clinical & developmental immunology* **2013**, 412768 (2013).
36. Mao, D., Epple, H., Uthgenannt, B., Novack, D.V. & Faccio, R. PLCgamma2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. *J Clin Invest* **116**, 2869-2879 (2006).
37. Troen, B.R. The regulation of cathepsin K gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1068**, 165-172 (2006).
38. Asagiri, M. & Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**, 251-264 (2007).
39. Zhao, Q., Wang, X., Liu, Y., He, A. & Jia, R. NFATc1: functions in osteoclasts. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 576-579 (2010).
40. Miyamoto, T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *The Keio journal of medicine* **60**, 101-105 (2011).
41. Yagi, M., *et al.* DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *The Journal of experimental medicine* **202**, 345-351 (2005).
42. Narumiya, S., Ishizaki, T. & Watanabe, N. Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS letters* **410**, 68-72 (1997).
43. Hall, A. Rho family GTPases. *Biochemical Society transactions* **40**, 1378-1382 (2012).
44. Morii, N., *et al.* A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *The Journal of biological chemistry* **267**, 20921-20926 (1992).
45. Rojas, A.M., Fuentes, G., Rausell, A. & Valencia, A. The Ras protein superfamily:

- evolutionary tree and role of conserved amino acids. *The Journal of cell biology* **196**, 189-201 (2012).
46. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 513-525 (2009).
 47. Simons, K. & Zerial, M. Rab proteins and the road maps for intracellular transport. *Neuron* **11**, 789-799 (1993).
 48. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 107-117 (2001).
 49. Donaldson, J.G. & Jackson, C.L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 362-375 (2011).
 50. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635 (2002).
 51. Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T. & Snyderman, R. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *The Journal of biological chemistry* **264**, 16378-16382 (1989).
 52. Norman, J.C., Price, L.S., Ridley, A.J., Hall, A. & Koffer, A. Actin filament organization in activated mast cells is regulated by heterotrimeric and small GTP-binding proteins. *The Journal of cell biology* **126**, 1005-1015 (1994).
 53. Hall, A. Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Molecular biology of the cell* **3**, 475-479 (1992).
 54. Chang, Z.F. & Lee, H.H. RhoA signaling in phorbol ester-induced apoptosis. *Journal of biomedical science* **13**, 173-180 (2006).
 55. Garcia-Mata, R. & Burridge, K. Catching a GEF by its tail. *Trends in cell biology* **17**, 36-43 (2007).
 56. Sinha, S. & Yang, W. Cellular signaling for activation of Rho GTPase Cdc42. *Cell Signal* **20**, 1927-1934 (2008).
 57. Cote, J.F. & Vuori, K. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends in cell biology* **17**, 383-393 (2007).
 58. Sakai, H., *et al.* Activated c-Fms recruits Vav and Rac during CSF-1-induced cytoskeletal remodeling and spreading in osteoclasts. *Bone* **39**, 1290-1301 (2006).
 59. Bertagnolo, V., *et al.* Association of PI 3-K with tyrosine phosphorylated Vav is essential for its activity in neutrophil-like maturation of myeloid cells. *Cellular Signalling* **16**,

- 423-433 (2004).
60. Teitelbaum, S.L. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1240**, 14-17 (2011).
 61. Fujikawa, K., *et al.* Vav1/2/3-null mice define an essential role for Vav family proteins in lymphocyte development and activation but a differential requirement in MAPK signaling in T and B cells. *The Journal of experimental medicine* **198**, 1595-1608 (2003).
 62. Faccio, R., *et al.* Vav3 regulates osteoclast function and bone mass. *Nature medicine* **11**, 284-290 (2005).
 63. Marat, A.L., Dokainish, H. & McPherson, P.S. DENN domain proteins: regulators of Rab GTPases. *The Journal of biological chemistry* **286**, 13791-13800 (2011).
 64. Yoshimura, S., Gerondopoulos, A., Linford, A., Rigden, D.J. & Barr, F.A. Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *The Journal of cell biology* **191**, 367-381 (2010).
 65. Marat, A.L., Ioannou, M.S. & McPherson, P.S. Connecdenn 3/DENND1C binds actin linking Rab35 activation to the actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell* **23**, 163-175 (2012).
 66. Allaire, P.D., *et al.* The Connecdenn DENN domain: a GEF for Rab35 mediating cargo-specific exit from early endosomes. *Molecular cell* **37**, 370-382 (2010).
 67. Zhang, Y., Zhou, L. & Miller, C.A. A splicing variant of a death domain protein that is regulated by a mitogen-activated kinase is a substrate for c-Jun N-terminal kinase in the human central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2586-2591 (1998).
 68. Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H. & Rajewsky, K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**, 103-106 (1994).
 69. Sternberg, N. Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites. *Journal of molecular biology* **150**, 603-608 (1981).
 70. Sternberg, N. & Hamilton, D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology* **150**, 467-486 (1981).
 71. Sternberg, N., Hamilton, D., Austin, S., Yarmolinsky, M. & Hoess, R. Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **45 Pt 1**, 297-309 (1981).
 72. Sternberg, N., Hamilton, D. & Hoess, R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *Journal of molecular biology*

- 150**, 487-507 (1981).
73. Yu, D., *et al.* An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5978-5983 (2000).
 74. Insogna, K.L., *et al.* Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts. *J Clin Invest* **100**, 2476-2485 (1997).
 75. Nakamura, T., *et al.* Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* **130**, 811-823 (2007).
 76. Chua, C.E., Gan, B.Q. & Tang, B.L. Involvement of members of the Rab family and related small GTPases in autophagosome formation and maturation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**, 3349-3358 (2011).
 77. Ng, E.L., Gan, B.Q., Ng, F. & Tang, B.L. Rab GTPases regulating receptor trafficking at the late endosome-lysosome membranes. *Cell biochemistry and function* **30**, 515-523 (2012).
 78. Pfeffer, S.R., Soldati, T., Geissler, H., Rancano, C. & Dirac-Svejstrup, B. Selective membrane recruitment of Rab GTPases. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **60**, 221-227 (1995).
 79. Sandvig, K., *et al.* Ricin transport into cells: studies of endocytosis and intracellular transport. *International journal of medical microbiology : IJMM* **290**, 415-420 (2000).
 80. Worgall, T.S. Lipid metabolism in cystic fibrosis. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **12**, 105-109 (2009).

謝辞

本研究を行なうにあたり，終始懇切丁寧な御指導，御鞭撻を賜りました東京大学分子細胞生物学研究所教授秋山徹先生に深く感謝申し上げます。

また，本研究を進めるにあたり，終始懇切なる御指導を戴きました元東京大学分子細胞生物学研究所特任講師，現愛媛大学プロテオサイエンスセンター病態生理解析部門教授今井祐記先生に心より感謝申し上げます。

本研究において，多大なる御指導を戴きました徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部准教授 松本高広先生に厚く感謝申し上げます。

本研究において，多大なる御指導，ご助言を戴きました現慶應義塾大学医学部講師高田伊知郎先生に深く感謝申し上げます。また破骨細胞に関する実験，研究の進め方を一から根気よく御指導戴きました元東京大学分子生物学研究所核内情報研究分野 延珉榮博士に心より感謝申し上げます。

本研究を支えるため，日々，貴重な時間を惜しみなく提供して下さいました，元東京大学分子生物学研究所核内情報研究分野のマウスチーム，山本陽子博士，奥野陽亮博士，井上絵里奈氏，井上和樹氏，金藤紫乃氏，于太永氏，司源氏，星野麻衣子氏，近藤剛史氏，吉田智江氏，JAC の西山様に心から感謝申し上げます。

また，研究のために多くの尊い命を捧げてくれた実験用マウスの冥福を心から御祈ります。

最後に，研究を安心して行える環境と暖かい励まし，応援を下さいました両親，兄，妹，友人，柴田麻希に感謝いたします。

平成 25 年 12 月 25 日
東京大学農学生命科学研究科
応用生命工学専攻 博士 3 年

辻 直也