

## 目次

<b>Chapter 1</b> .....	<b>6</b>
はじめに.....	6
1.1. 緒言 .....	6
1.2. データ解析.....	9
1.3. 使用試薬.....	9
1.4. 略語 .....	11
<b>Chapter 2</b> .....	<b>14</b>
培養骨芽細胞及び骨組織における Pax ファミリー の発現解析 .....	14
2.1. 序文 .....	14
2.2. 培養骨芽細胞における Pax ファミリーの発現解析.....	16
2.2.1. 方法 .....	16
2.2.1.1. マウス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞の培養 .....	16
2.2.1.2. Real-time quantitative RT-PCR 法 .....	17
2.2.1.2.1. 逆転写反応.....	17
2.2.1.2.2. Real-time PCR 法 .....	18
2.2.1.3. Western blotting 法 .....	18
2.2.2. 結果 .....	20
2.2.2.1. マウス初代培養骨芽細胞における Pax ファミリー遺伝子の発現.....	20
2.3. 骨組織における Pax5 の発現解析 .....	22
2.3.1. 方法 .....	22
2.3.1.1. マウス脛骨組織切片作製.....	22
2.3.1.2. 免疫組織染色法(Immunohistochemistry) .....	22
2.3.2. 結果 .....	24
2.3.2.1. マウス骨組織における Pax5 の発現.....	24
2.4. 考察 .....	25
<b>Chapter 3</b> .....	<b>26</b>
Pax5 遺伝子ノックダウンを用いた骨芽細胞機	

能解析 .....	26
3.1. 序文 .....	26
3.2. 方法 .....	27
3.2.1. Reverse 法による MC3T3-E1 細胞への一過的 siRNA 導入と分化誘導条件での培養 .....	27
3.2.2. Real-time quantitative RT-PCR 法 .....	27
3.2.2.1. 逆転写反応 .....	27
3.2.2.2. Real-time PCR 法 .....	27
3.2.3. Western blotting 法 .....	28
3.2.4. Alkaline phosphatase staining .....	28
3.2.5. BrdU 取り込みによる細胞増殖 assay .....	28
3.2.6. TUNEL 染色による細胞死 assay .....	29
3.3. 結果 .....	30
3.3.1. MC3T3-E1 細胞への Pax5 siRNA 導入による解析 .....	30
3.3.2. MC3T3-E1 細胞への Pax5 siRNA 導入による細胞増殖、細胞死への影響 .....	32
3.4. 考察 .....	34
Chapter 4 .....	35
骨芽細胞特異的分化マーカー遺伝子、転写制御因子に対する Pax5 の影響 .....	35
4.1. 序文 .....	35
4.2. 方法 .....	35
4.2.1. Pax5 siRNA を用いた Reporter assay .....	35
4.2.2. Pax5 発現ベクターを用いた Reporter assay .....	35
4.2.3. Reporter assay .....	36
4.2.4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay .....	36
4.2.4.1. マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の培養 .....	36
4.2.4.2. ホルマリンによる細胞固定 .....	36
4.2.4.3. Immunoprecipitation .....	37
4.2.4.3. 固定の解除と DNA の回収 .....	37
4.3. 結果 .....	39
4.3.1. Pax5 siRNA に対する骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写因子の転写活性への影響 .....	39

4.3.2. Pax5 過剰発現に対する骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写制御因子の転写活性への影響 .....	39
4.3.3. in silico 解析を用いた骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写制御因子プロモーター領域への Pax5 結合部位の探索 .....	40
4.3.4. deletion construct レポーターベクターを用いた転写活性の解析 .....	41
4.3.5. ChIP assay .....	42
4.4. 考察 .....	43
<b>Chapter 5 .....</b>	<b>45</b>
<b>Pax5 安定発現細胞株を用いた解析 .....</b>	<b>45</b>
5.1. 序文 .....	45
5.2. 方法 .....	45
5.2.1. Pax5 安定発現細胞株の作製 .....	45
5.2.2. Pax5 安定発現細胞株の培養 .....	46
5.2.3. Real-time quantitative RT-PCR 法 .....	46
5.2.3.1. 逆転写反応 .....	46
5.2.3.2. Real-timePCR 法 .....	46
5.2.4. ALP 活性の測定 .....	47
5.2.5. Ca <sup>2+</sup> 蓄積量の測定 .....	47
5.2.5. 細胞の von Kossa 染色 .....	47
5.2.6. Western blotting 法 .....	47
5.3. 結果 .....	48
5.3.1. Pax5 安定発現細胞株の作製 .....	48
5.3.2. Pax5 安定発現細胞株における骨芽細胞分化マーカーの変動解析 .....	48
5.3.3. Pax5 安定発現細胞株における骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写制御因子の発現解析 .....	50
5.4. 考察 .....	52
<b>Chapter 6 .....</b>	<b>53</b>
<b>骨芽細胞特異的 Pax5 トランスジェニックマウスの作製と骨表現型解析 .....</b>	<b>53</b>
6.1. 序文 .....	53
6.2. 方法 .....	53
6.2.1. Pax5 トランスジェニック(Tg)マウスの作製 .....	53

6.2.2. RT-PCR 法.....	54
6.2.2.1. 逆転写反応.....	54
6.2.2.2. PCR 法.....	54
6.2.3. カルセイン投与.....	54
6.2.4. 脊椎と脛骨切片の作製.....	55
6.2.5. von Kossa 染色.....	55
6.2.6. Toluidine blue 染色.....	55
6.2.7. TRAP 染色.....	55
6.2.8. 骨形態計測.....	56
6.2.9. TRAP 染色.....	56
6.3. 結果.....	57
6.3.1. 骨芽細胞特異的 Pax5 Tg マウスの作製.....	57
6.3.2. Pax5 Tg マウスの骨表現型解析.....	57
6.3.3. Pax5 Tg マウスの骨形態計測.....	59
6.4. 考察.....	60

## Chapter 7 ..... 62

### 骨粗鬆症モデル処置を行った Pax5 トランスジェニックマウスの骨表現型解析..... 62

7.1. 序文.....	62
7.2. 方法.....	62
7.2.1. 卵巣摘出術(OVX).....	62
7.2.2. 17β-エストラジオール投与.....	63
7.2.3. カルセイン投与.....	63
7.2.4. 脊椎切片の作製.....	63
7.2.5. von Kossa 染色.....	63
7.2.6. Toluidine blue 染色.....	64
7.2.7. TRAP 染色.....	64
7.2.8. 骨形態計測.....	64
7.2.9. Real-time quantitative RT-PCR 法.....	64
7.2.9.1. 逆転写反応.....	64
7.2.9.2. Real-time PCR 法.....	64
7.3. 結果.....	65
7.3.1. 子宮重量の測定.....	65
7.3.2. 脛骨組織における Pax5 発現変動解析.....	65

7.3.3. OVX 処置を行った Pax5 Tg マウスの骨表現型解析 .....	66
7.3.4. OVX 処置を行った Pax5 Tg マウスの骨形態計測.....	67
7.4. 考察 .....	69
<b>Chapter 8 終わりに .....</b>	<b>70</b>
<b>Chapter 9 結語 .....</b>	<b>72</b>
<b>謝辞 .....</b>	<b>73</b>
<b>引用文献.....</b>	<b>74</b>

# Chapter 1

## はじめに

### 1.1. 緒言

骨格系は、脊椎動物の最も基本的な特徴であり、その構造は力学的にも適応した形態を持ち、器官の保護、生体の支持、運動機能の維持に必須の役割を果たしている。また、その他にも造血機能や、生体のカルシウムの貯蔵庫として血中  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度維持にも不可欠である。骨は軟骨内骨化により新生し、その成長が停止した後も、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が絶えず繰り返され、再構築(リモデリング)を営むことにより骨の形態や機能を維持している(Teitelbaum SL et al., 2003、Harada S et al., 2003)。この骨リモデリングは組織学的にいくつかの相に分類されており活発な骨吸収や骨形成を営んでいない骨表面は、lining cell と呼ばれる扁平な骨芽細胞に覆われている(静止相)。これに骨吸収を促進するホルモン、サイトカインが作用すると、lining cell が活性化される(活性化相)。また、骨芽細胞からは骨細胞系への情報伝達により、破骨細胞の分化と遊走が生じ、骨吸収が起こる(吸収相)。その後、骨吸収が起こった部位にマクロファージが出現する逆転層を経て新たに骨芽細胞による骨形成が行われ、骨形成が完了すると骨表面は再び lining cell に覆われ、静止相に入る(Fig.1.)。また、骨リモデリングは、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、カルシトニンなどのカルシウム調節ホルモンや IL-1、TNF- $\alpha$ 、 $\text{PGE}_2$  などの炎症性サイトカイン、接着分子、また、各細胞内の情報伝達機構や転写因子、そして骨局所内に加わる力学負荷因子などによる調節を介して緻密に制御されると理解される。

通常のリモデリングでは、骨格系の質及び量は骨吸収と骨形成の間に平衡関係が保たれることにより維持されるが、閉経や加齢など様々な要因から、一旦これらのバランスが破綻すると骨粗鬆症に代表される様々な骨代謝性疾患が発症する(Feng X et al., 2011)。骨粗鬆症では、骨吸収が骨形成よりも相対的に優位となることで骨密度の異常な低下が起きる。またこれとは対照的に、大理石骨病では骨形成が骨吸収よりも過剰に亢進し、成長障害、視覚障害、免疫系の障害などが起こる。骨粗鬆症には、骨吸収が亢進した高回転型骨粗鬆症と、骨形成が低下した低回転型骨粗鬆症の二種類がある。女性は閉経後、エストロ

ゲンが低下することで破骨細胞が活性化し、骨吸収が相対的に亢進するため高回転型となり、その結果、骨密度の異常な低下が起きる。一方、老人性骨粗鬆症は低回転型骨粗鬆症であり、骨形成が低下することが主な病因と考えられている。現在、日本における骨粗鬆症患者数は1,100万人を超えると推定されており、超高齢化社会を迎えた我が国においては医療費高騰の大きな原因の一つにもなっている。また、高齢者の骨折は、運動機能の低下のみならず、自発性の運動の低下や、寝たきり状態、さらには鬱、痴呆状態を招く恐れがある。しかしながら、現在の治療方針は予防的、対症的あるいは抑制的な域を出ない。そのため、患者のQOL向上のためにも新規の作用機序を有する治療薬の開発が骨粗鬆症対策の早急な課題である(Rachner TD et al., 2011、Center JR et al., 1999)。

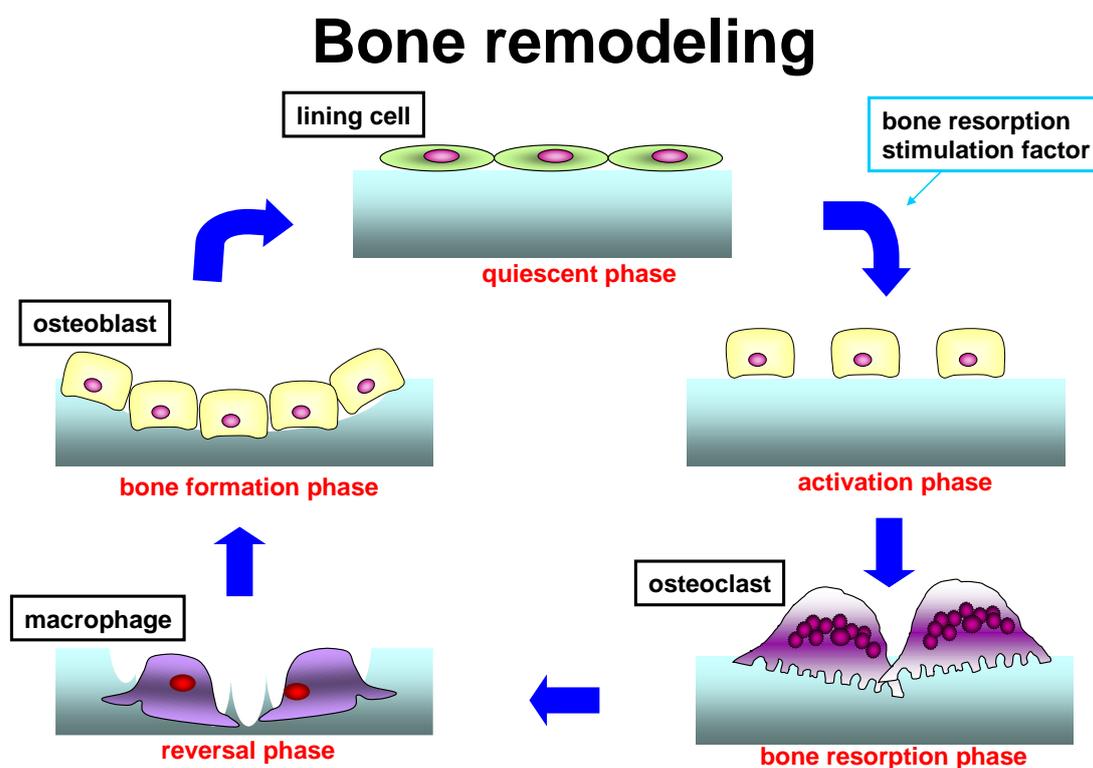


Fig.1. Schematic drawing of the bone remodeling.

一方、我々はこれまで、「骨代謝を調節する新規転写制御因子」の探索を行ってきた。これまでにいくつかの転写制御因子が、骨代謝を担う細胞である骨芽細胞のコミットメント・分化・成熟を調節する重要な因子として同定されている(Karsenty G et al., 2009)。その中でも特に Runt-related transcriptional factor-2(Runx2)や Osterix は骨芽細胞の分化に必須の転写因子としてよく知

られている。**Runx2** は **Runt** 転写因子ファミリーの一つであり、その発現は骨芽細胞の分化に必要不可欠であり、**Osteocalcin** や **Type I Collagen** といった様々な骨芽細胞に特徴的な遺伝子の発現を惹起し骨芽細胞の分化を前期では促進し、分化後期では抑制する。また **Runx2** 全身欠損マウス胎児骨格標本は、完全に硬骨が欠損することも知られている(Ducy P et al., 1997、Komori T et al., 1997、Otto F et al., 1997)。**Osterix** は骨形成及び骨芽細胞分化に必須として比較的新しく同定された転写因子で zinc フィンガードメインを分子内に有しており、骨芽細胞特異的に発現し **Runx2** の下流で作用して骨芽細胞分化を促進することが明らかとなっている(Nakashima K et al., 2002)。また **Osterix** 全身欠損マウス胎児骨格標本は骨組織の顕著な低形成を示し、生後間もなく死亡する。特に頭蓋骨などの膜性骨化部位において石灰化は著しく低下する(Nakashima K et al., 2002)。

今回我々が特に着目したのは **Paired box(Pax)**ファミリー転写制御因子である。**Pax** ファミリーはこれまでに **Pax1** から **Pax9** の 9 種類が同定されておりその分子内には N 末端に存在するペアードドメイン、C 末端に存在するホメオドメイン、そしてオクタペプチドが存在することが知られている。**Pax** ファミリーには、完全な、あるいは C 末端が欠けたホメオドメインを持つものやホメオドメインを持たないものがあり、さらにオクタペプチドの有無、アミノ酸配列の相同性などから、その構造の差異により 4 種類のサブグループに分類されており、これらの **Pax** ファミリータンパク質は胎児期の器官形成に重要な役割を担うという報告がなされている(Balczarek KA et al., 1997、Lang D et al., 2007)(Fig.2.)。これまでに、いくつかの **Pax** ファミリー全身欠損マウスにおいて明らかな骨格異常が見られるという報告がなされてきた。具体的には **Pax1** 全身欠損マウスにおける脊椎の異常(Wilm B et al., 1998)、**Pax5** 全身欠損マウスにおける破骨細胞数の増加と骨量減少(Horowitz MC et al., 2004)、**Pax7** 遺伝子欠損マウスにおける顎の欠損(Mansouri A et al., 1996)、**Pax9** 遺伝子欠損マウスにおける歯の欠損が報告されている(Peters H et al., 1998)。しかしながらこれらの報告においては、骨リモデリングにおける **Pax** ファミリーの詳細な役割についてはほとんど言及されていない。

そこで本研究では *in vitro* と *in vivo* の実験手技を用いて、骨形成と骨リモデリングに関与する骨芽細胞に特に着目し、骨芽細胞における **Pax** ファミリーの詳細な役割を明らかにすることを目的とした。

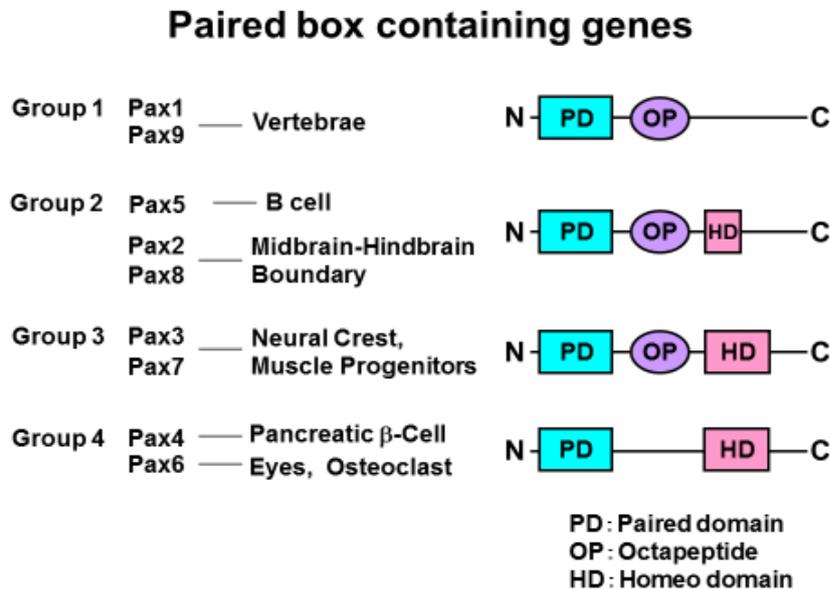


Fig.2. Classification of paired box containing genes.

## 1.2. データ解析

タンパク質定量は、Bradford法により行った。Total RNA量は260 nmの吸光度より算出した。各種解析で得られた値は、平均値±標準誤差で表示した。統計学的有意差は、一元配置分散分析(One-factor ANOVA)後の結果認められた水準間の差を、多重比較検定のうちのBonferroni post hoc testを用いて検定した。また、独立した2群間の差の検定にはStudent's t-testを用いた。

## 1.3. 使用試薬

2.3-kb マウス  $\alpha 1(D)Collagen$  プロモーターベクター(Dacquelin R et al., 2002)は Karsenty 博士(Columbia University, New York, NY, USA)より提供していただいた。 *Osterix* と *Osteocalcin* プロモーターのデリベーションコンストラクトベクター(Lu X et al., 2006、Xiao G et al., 1997)は Nane 博士(Emory University School of medicine, Atlanta, GA, USA)と Franceschi 博士(University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, MI, USA)よりそれぞれ提供していただいた。 *Runx2* プロモーターベクター(Zambotti A et al.,

2002)は Ducey 博士(Columbia University, New York, NY, USA)より提供していただいた。異なる長さの Pax5 発現ベクター(Emelyanov AV et al., 2002)は Birshstein 博士(Albert Einstein College of Medicine, New York, NY, USA)より提供していただいた。Dithiothreitol (DTT)、5×First strand buffer、M-MLV Reverse transcriptase、Ultra-Pure agarose、Plus reagent、Lipofectamine 2000、Lipofectamine LTX、Lipofectamine RNAiMAX、Stealth™ RNAi Negative Control 及び Pax5 RNAi は Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.) より購入した。Pax5 及びβ-actin 抗体は Thermo Scientific(Waltham, MA, USA) と Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)よりそれぞれ購入した。MC3T3-E1 細胞は ATCC(Manassas, VA, USA)より購入した。Cell Proliferation 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) ELISA Kit は Roche Applied Science(Indianapolis, IN, USA)より購入した。Dual luciferase assay system と RNase-free DNase は Promega(Madison, WI, USA)より購入した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix は TOYOBO(大阪)より購入した。Chromatin immunoprecipitation(ChIP) assay kit は Millipore(東京)より購入した。VECTASTAIN Elite ABC Reagent は Vector Laboratories(Burlingame, CA, USA)より購入した。ISOGEN、カルシウム C-TEST、sodium  $\alpha$ -glycerophosphate、ascorbic acid、Methyl methacrylate monomer(MMA)、N,N-Dimethyl-p-toluidine(DMPT) 、 3,3'-diaminobenzidine(DAB) 、 isopropanol、N,N-dimethyl formamide、1-Acetoxy-2-methoxyethane(AME)、10% Formalin はいずれも和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。bovine serum albumin (BSA)、Naphthol AS-MX phosphate、Fast red violet LB salt、Calcein 及び Toluidine blue は Sigma Chemical Company (St.Louis, MO, U.S.A.)より購入した。FBS は、Equitech-Bio (Ingram, TX, U.K.)より購入した。Trypsin は、DIFCO(Detroit, MI, U.S.A.)より購入した。Bio-Rad protein assay reagent 及び Molecular Biology Certified Agarose は、Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, U.S.A.)より購入した。10×Dulbecco's PBS、Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)、Minimum Essential Medium Alpha Medium ( $\alpha$ -MEM)、Opti-MEM Reduced-serum Medium 及び ethidium bromide solution は Gibco BRL(Gaithersburg, MD, U.S.A.)より購入した。ECL™ 検出用試薬、Hybond N<sup>+</sup> positive charged membrane 及び Peroxidase 標識抗 Rabbit IgG 抗体はいずれも Amersham Life Science (Buckinghamshire, England) より購入した。Taq polymerase 及び各種制限酵素は、宝酒造株式会社(滋賀)より購入した。Oligonucleotide はシグマジェノシスジャパン(北海道)より購入した。99% EtOH は日本アルコール販売株式会社(東京)より購入した。Pentobarbital は共立製薬株式会社(東京)より購入し

た。Entellan new 及び Aluminiumoxid 60 は Merck(東京)より購入した。Benzoyl peroxide はナカライテスクより購入した。C57BL/6J 系マウスは三協ラボサービス(東京)より購入した。その他の化合物は市販の特級品を用いた。

## 1.4. 略語

本論文に使用した略語は以下の通りである。

ALP	alkaline phosphatase
AME	1-acetoxy-2-methoxyethane
AML-1	Acute myeloid leukemia-1
AMPSF	(p-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride
$\alpha$ MEM	$\alpha$ -modified eagle medium
$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	$1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin $\text{D}_3$
BFR	bone formation rate
$\beta$ -GP	$\beta$ -glycerophosphoric acid
BMMs	bone marrow macrophages
BMP	bone morphogenetic protein
BMSCs	bone marrow stromal cells
BPB	bromophenol blue
B.Pm	bone perimeter
BrdU	bromodeoxyuridine
BS	bone surface
BSAP	B-Cell lineage specific activator protein
BV	bone volume
ChIP	chromatin immunoprecipitation
Cbfa1	core binding factor alpha-1
cbfb	core binding factor beta
cDNA	complementary DNA
Col I	type I collagen
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DEPC	diethylpyrocarbonate
DIV	day <i>in vitro</i> or days <i>in vitro</i>
DTT	dithiothreitol

EV	empty vector
FBS	fetal bovine serum
GPBS	PBS containing glucose
HD	homeo domein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IL	interleukin
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MMA	methyl methacrylate monomer
MNCs	multinucleated cells
mRNA	messenger RNA
NaF	sodium fluoride
NBT/BCIP	nitro blue tetrazolium chloride/ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
N.Ob	osteoblast number
N.Oc	osteoclast number
Oc.S	osteoclast surface
OP	octapeptide
OPG	osteoprotegerin
OVX	ovariectomy
Pax	paired box
PBS	phospho buffered saline
PD	paired domain
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PPAR <sub>γ</sub>	peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
PTH	parathyroid hormone
PVDF	polyvinylidene difluoride
QOL	quality of life
RANK	receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B
RANKL	RANK ligand
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
Runx2	runt-related transcription factor-2
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	short interfering RNA
Sox	SRY-related HMG box-containing genome
TBS	tris buffered saline

<b>TBST</b>	0.05% Tween 20 in TBS
<b>Tg</b>	transgenic
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor- $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor- $\alpha$
<b>TRAP</b>	tartrate resistant acid phosphatase
<b>Tris</b>	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
<b>TUNEL</b>	transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling
<b>TV</b>	tissue volume
<b>WT</b>	wild type

## Chapter 2

# 培養骨芽細胞及び骨組織における Pax ファミリーの発現解析

## 2.1. 序文

骨リモデリングには主に骨芽細胞と破骨細胞が関与していることについては先にも述べた通りであるが、今回の研究においては骨芽細胞において特に焦点を当てて解析を行った。

骨芽細胞は、軟骨細胞(chondrocyte)、筋芽細胞(myocyte)、脂肪細胞(adipocyte)と共通の前駆細胞である未分化間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)から分化するが(Aubin et al., 1993)、それぞれの細胞の分化調節機構には特異的な転写因子が関与することが知られている。軟骨細胞では Sox5、6、9、脂肪細胞では PPAR $\gamma$ 、筋芽細胞では MyoD、そして骨芽細胞では先にも述べたように、Runx2 や Osterix が常用な役割を担っている(Friedenstein AJ et al., 1987、Yamaguchi A et al., 2000、Weintraub H. 1993)。骨形成誘導タンパク質である BMP は Runx2 への細胞内シグナルの上流に存在し BMP $\rightarrow$ Smad $\rightarrow$ Runx2 というカスケードを介して骨芽細胞分化を誘導する(Ducy P et al., 1997、Tsuji K et al., 1998)。Runx2 は Osteocalcin のプロモーターに結合する転写因子として発見されたが、Osteocalcin 以外にも Type I コラーゲン、オステオポンチン、骨シアロタンパク質の発現を調節している(Harada H et al., 1999、Ducy P et al., 1997)。これらのタンパク質の発現により骨芽細胞は骨形成細胞としての機能を示すようになる。

また骨芽細胞は、培養骨芽細胞を用いた研究によりその分化過程において段階的に骨基質タンパクを発現し、経時的にその表現型が変化することが知られている。未分化間葉系幹細胞は Runx2 の働きにより前骨芽細胞へと分化するが、成熟骨芽細胞へ向かう際にさらに増殖期、分化期(Type I コラーゲンを合成し、盛んに細胞外マトリックスを分泌するとともにアルカリフォスファターゼ(ALP)やオステオポンチンなどを強く発現する)、成熟期(石灰化が亢進し、カルシウムの蓄積が見られ、石灰化に応じて Osteocalcin の発現が見られる)を経る。この各段階で骨芽細胞特異的タンパク質が発現してくることから、これらのタ

ンパク質発現は骨芽細胞の分化マーカーとして用いられている。骨芽細胞の終末期に関しては、成熟骨芽細胞を過ぎると、骨芽細胞の骨基質形成能は次第に低下し、骨芽細胞は骨基質に埋め込まれた骨細胞(osteocyte)、あるいは骨表面を覆う bone lining cell となる(Fig.3.)。

先にも述べたように、Pax ファミリー欠損マウスにおいて骨格異常が見られるマウスがいくらか見られるが、Pax ファミリーがそもそも骨芽細胞において発現しているかどうかといった報告は皆無なことから、今回はまず始めにマウス由来初代培養骨芽細胞を用いて Pax ファミリーの発現解析を行った。

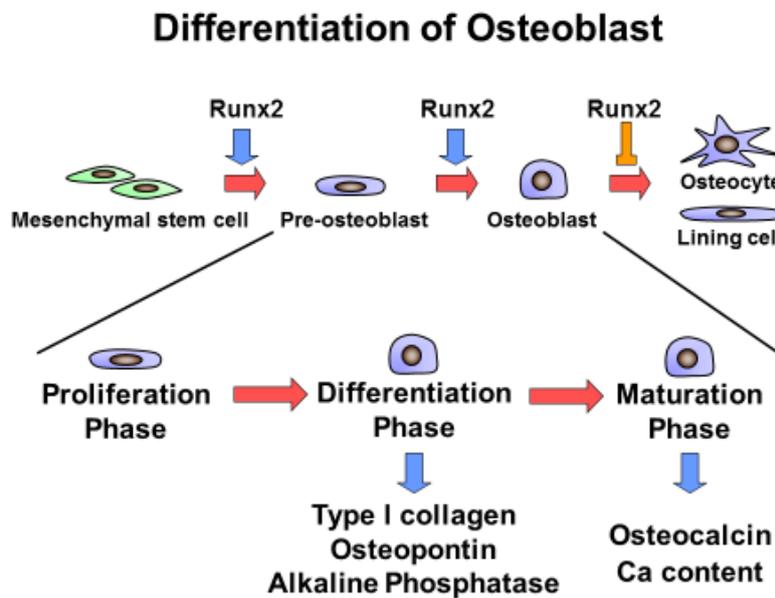


Fig.3. Schematic model of osteoblast differentiation.

## 2.2. 培養骨芽細胞における Pax ファミリーの発現解析

### 2.2.1. 方法

#### 2.2.1.1. マウス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞の培養

生後 2-6 日齢の C57BL/6J 系野生型(WT)新生仔マウスを断頭し、頭蓋骨皮膚を剥離したのち、頭蓋骨前頭部を摘出して phosphate buffered saline (PBS)中に回収した。頭蓋骨に付着した血球や髄膜をきれいに取り除いた後、PBS で洗浄した。頭蓋骨を 4 mM EDTA を含む PBS 中で 10 分間反応させた。さらにこの操作を 2 回繰り返して、EDTA 溶液を PBS で完全に取り除いた。続いて頭蓋骨を酵素溶液(0.2% collagenase を含む $\alpha$ MEM)20 mL 中で 37 °C、15 分間攪拌させ細胞を分散後、細胞浮遊画分を吸引除去した。次いで、新しい酵素溶液 10 mL を添加し 37 °C で 10 分間攪拌後、細胞浮遊画分を 10 % FBS を含む $\alpha$ MEM 中に回収した。同様の攪拌操作をさらに 2 回繰り返して、それぞれの細胞浮遊画分を回収した。回収画分を細胞ろ過用フィルターで濾過し、濾液を 250 g、5 分間遠心分離後、得られた沈渣を $\alpha$ MEM-10 % FBS で懸濁したのち、 $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>の密度で各プレートに播種した。細胞調製の翌日に、メディウムを 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid、5 mM  $\beta$ -glycerophosphate を含む  $\alpha$ MEM-10 % FBS に交換し、この時点を経験 0 日目とした。培養メディウムは 3 日おきに交換し、最大 28 日目まで細胞を培養した(方法は Takahata Y et al ., 2011 に準じている) (Fig.4.)。

また、取り扱う実験動物に関しては、日本薬理学会実験動物倫理規定を順守するとともに、金沢大学動物実験施設において独自に制定された金沢大学宝町地区動物実験指針に則り実験計画を策定した。

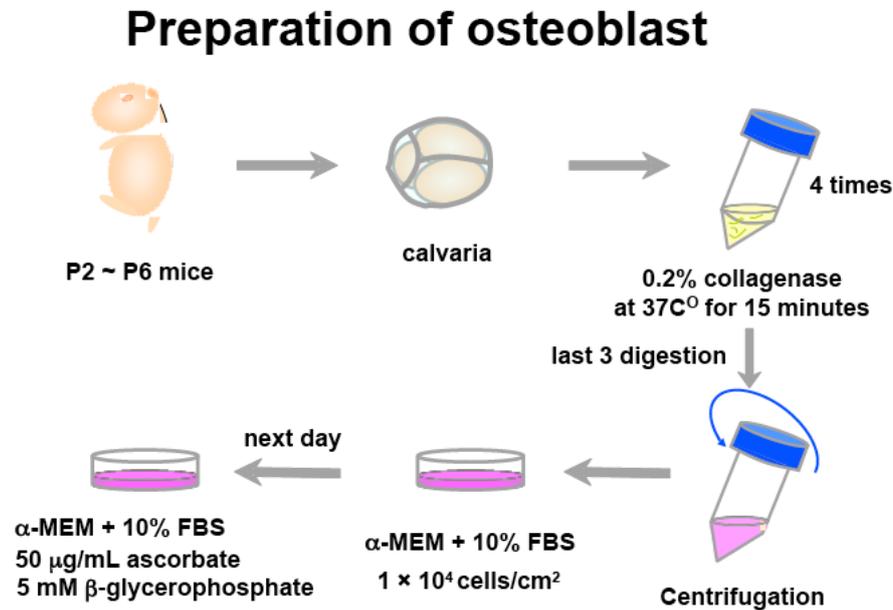


Fig.4. Procedures for preparation of primary cultures of osteoblasts.

## 2.2.1.2. Real-time quantitative RT-PCR 法

### 2.2.1.2.1. 逆転写反応

各日数培養した細胞を、GPBS を用いて 2 回洗浄した。その後 ISOGEN を用いて細胞から total RNA を抽出した。細胞及び組織から抽出した total RNA 1 µg に対し、DNase (1 unit/µL、Promega) 1 µL、10×DNase buffer 1 µL を加え、全量が 10 µL になるように DEPC water を加え、37 °C で 20 分間反応させた。その後 RQ1 DNase stop solution(Promega)を 1 µL 加え反応を停止させた。続いて Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer (50 µM、sigma genosys) 1 µL、10 mM dNTP mix (Takara Bio) 3.6 µL、DEPC water 4.4 µL を加え、65 °C、5 分間加熱しすぐに氷令した。そこに 5×First-Strand Buffer (invitrogen) 6 µL、0.1 M DTT (invitrogen) 3 µL、M-MLV Reverse Transcriptase (200 unit/µL、invitrogen) 0.5 µL、DEPC water 0.5 µL を加え、37 °C、60 分間反応させた。続いて 70 °C、15 分間加熱することにより、逆転写酵素を失活させた。

## 2.2.1.2.2. Real-time PCR 法

2.2.1.2.1.の方法で得られた cDNA を Real-time PCR に用いた。Real-time PCR 用プレート (日本ジェネティクス; FG-1742)に THUNDERBIRD™ SYBR qPCRmix (TOYOBO より購入)を 5  $\mu$ L、滅菌精製水により 3 倍希釈した cDNA 2.5  $\mu$ L、2.5  $\mu$ M の sense primer 及び antisense primer をそれぞれ 0.5  $\mu$ L 加え、総量 10  $\mu$ L になるよう滅菌精製水を加えて 1 sample あたり duplicate で Real-time PCR を行った。PCR 反応は MX3005P(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて行った。得られた Ct 値から内部標準 *36b4* の Ct 値を減じて  $\Delta$ Ct を得て、 $\Delta\Delta$ Ct 法にて定量化し PCR 産物の量を算出した。用いた Primer は Table.1. の通りである。

**Table.1. Primer (for Real-time PCR)**

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Pax1</i>	CCGCCTACGAATCGTGGAG	CCCGCAGTTGCCTACTGATG
<i>Pax2</i>	AAGCCCGGAGTGATTGGTG	CAGGCGAACATAGTCGGGTT
<i>Pax3</i>	TTTCACCTCAGGTAATGGGACT	GAACGTCCAAGGCTTACTTTGT
<i>Pax4</i>	GAGTACCCTGCTGTTTTTGCC	ACTCGATTGATAGAGGACACACT
<i>Pax5</i>	CCATCAGGACAGGACATGGAG	GGCAAGTCCACTATCCTTTGG
<i>Pax6</i>	GCAGATGCAAAAAGTCCAGGTG	CAGGTTGCGAAGAACTCTGTTT
<i>Pax7</i>	TCTCCAAGATTCTGTGCCGAT	CGGGTTCTCTCTCTTATACTCC
<i>Pax8</i>	ATGCCTCACAACCTCGATCAGA	ACAATGCGTTGACGTACAACCTT
<i>Pax9</i>	AGTTTCGTCTCAGCATCCAGC	ACCCATGTCCAGCCACATAAC
<i>Osteocalcin</i>	CTTGGTGACACCTAGCAGA	ACCTTATTGCCCTCCTGCTT
<i><math>\alpha</math>1(I)Collagen</i>	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG

## 2.2.1.3. Western blotting 法

培養した細胞を、冷 GPBS で 1 回洗浄後、冷 GPBS 中でセルスクレーパーを用いて細胞を回収し、2000 g、5 分間遠心した。上清を除去し、沈殿に各種 phosphatase inhibitors (5 mM dithiothreitol (DTT)、10 mM sodium fluoride (NaF)、10 mM  $\beta$ -glycerophosphoric acid ( $\beta$ -GP))及び 1  $\mu$ g/mL の各種 protease

inhibitors ((p-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride (APMSF)、leupeptin、antipain、benzamidine)、そして 0.6% NP-40 を含む Buffer A(10 mM HEPES-NaOH(pH 7.9)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、10 mM KCl) を加え、ボルテックスして懸濁後、ソニケーター(Taitec 社、VP-5S)を用いて細胞を超音波破碎し、12000 g、5 分間遠心して上清を全細胞抽出液とした。全細胞抽出液を、sodium dodecyl sulfate(SDS)処理液(10% glycerol、2% SDS、0.01% bromphenol blue(BPB)、5% 2-Mercaptoethanol を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝溶液(pH6.8))と 4:1 の割合で混合し、これを 95°C で 10 分間煮沸し変性させ、使用直前まで -20 °C で凍結保存した。実験当日に凍結した標品を室温にて融解し、Western blotting 法に用いた。各標品を 10% polyacrylamide gel (濃縮用ゲル濃度 4.5%)を用いて室温で 2 時間電気泳動(15 mA/plate)後、あらかじめ 100% methanol で活性化処理を行ったタンパク質ブロッティング用 PVDF 膜に、30 分間ブロッティング(1.6 mA/cm<sup>2</sup>)を行った。ブロッティング終了後、膜を TBST(137 mM NaCl 及び 0.05 % Tween 20 を含む 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5))で洗浄したのち、5% skim milk を含む TBST 中で 1 時間ブロッキングを行った。この膜を 1% skim milk を含む TBST で適当濃度に希釈した 1 次抗体と 4 °C で約 16 時間反応させ、反応後 TBST で 10 分間 3 回洗浄した。次に、1% skim milk を含む TBST で希釈した peroxidase 標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させ、反応後 TBST で 10 分間 3 回洗浄した。続いて、ECL 検出用試薬と反応させたのち、化学発光を Light-Capture を用いて感光させ、抗体陽性タンパク質を検出した。

## 2.2.2. 結果

### 2.2.2.1. マウス初代培養骨芽細胞における Pax ファミリー遺伝子の発現

骨芽細胞における Pax ファミリーの発現を解析するために、マウス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞を培養し、分化誘導開始後、培養 0、7、14、21、28 日目において RNA を回収し Pax ファミリーを特異的に認識する primer を用いて Real-time PCR を行った。

培養 7 日目における mRNA 発現を調べた結果、初代培養骨芽細胞において Pax ファミリーのうち *Pax3*、*Pax5*、*Pax9* の発現が認められたが、*Pax1*、*Pax2*、*Pax4*、*Pax6*、*Pax7*、*Pax8* のは認められなかった(Fig.5(A.))。また発現が認められた *Pax3*、*Pax5*、*Pax9* の mRNA 発現プロファイルを培養 28 日目まで解析した結果、*Pax3* は培養日数の経過とともにその発現量は徐々に低下し(Fig.5(C.))、*Pax5* は逆に培養日数の経過とともにその発現が上昇することが確認された(Fig.5(B.))。一方で *Pax9* はどの培養日数においても一定の発現量を示すことが確認された(Fig.5(D.))。この際、骨芽細胞の分化マーカー遺伝子である *Osteocalcin* 及び  $\alpha(D)Collagen$  の mRNA 発現量も同時に解析したが、骨芽細胞の培養日数の経過と共にその発現量の増加が認められたので、今回の初代培養骨芽細胞は問題なく分化していることが確認できた(Fig.5(B.))。

今回、初代培養骨芽細胞で mRNA 発現が認められた *Pax3*、*Pax5*、*Pax9* のうち、骨芽細胞の分化に伴い、その mRNA 発現の上昇が認められた *Pax5* に今後は特に着目することとした。

分化誘導開始後培養 0、7、14、21、28 日目においてタンパク質を回収し、western blotting 法により Pax5 タンパク質の発現を解析した。その結果、骨芽細胞の分化に伴い Pax5 タンパク質の発現が上昇することが認められた。

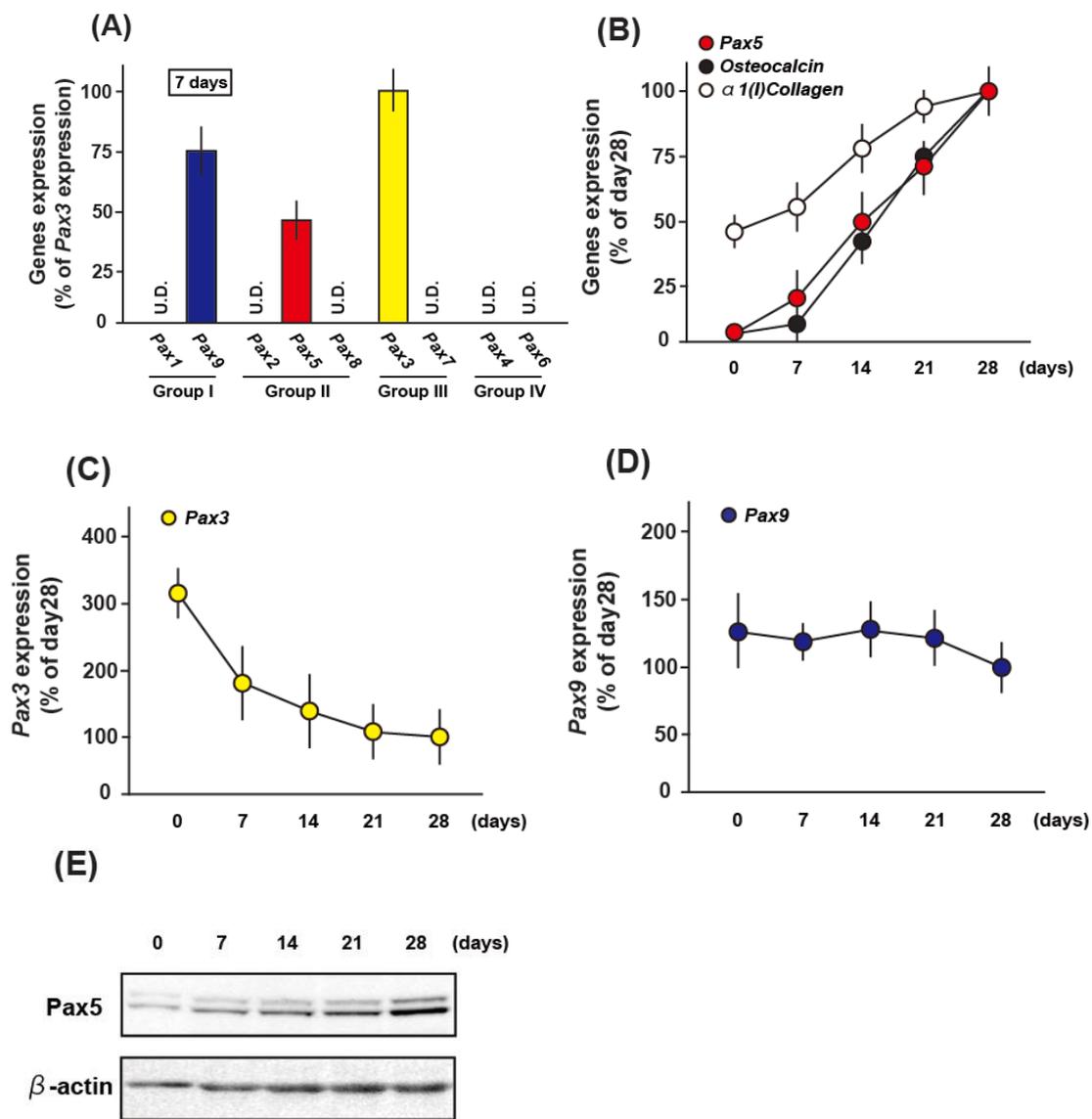


Fig.5. Expression profiles of Pax family in primary osteoblasts.

## 2.3. 骨組織における Pax5 の発現解析

### 2.3.1. 方法

#### 2.3.1.1. マウス脛骨組織切片作製

妊娠 17.5 日目の C57BL/6J 系統 WT マウスを屠殺後、開腹し胎生 17.5 日齢マウスを取り出した。取り出したマウスを断頭後、皮膚を剥離し脛骨を摘出した。摘出した脛骨は 10%中性緩衝ホルマリン溶液にて 24 時間固定した。その後 1 回 PBS で洗浄し、1 日おきに 70%エタノールを計 3 回交換した。その後、12 時間おきに 80%エタノール、90%エタノールに置換し、12 時間おきに 100%エタノールを計 2 回交換した。さらにその後キシレンに置換し脱水後パラフィンにて組織包埋を行った。包埋した脛骨組織を、マイクロトームを用いて 5  $\mu\text{m}$  に薄切しシランコーティングスライドガラスに乗せ、ホットプレート上でスライドガラスを乾かし脛骨組織を完全に貼り付けた。組織を貼り付けたスライドガラスをその後の染色に用いた。

#### 2.3.1.2. 免疫組織染色法(Immunohistochemistry)

脛骨組織のパラフィン切片を、キシレンを用いて脱パラフィン処理を行いアルコール系列で水和(100%エタノールで 2 回、95%、80%、70%、蒸留水の順)後、0.1M PBS で 5 分間洗浄した。次いで、切片を 0.3% hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )を含む methanol で 30 分間処理した後、0.1 M PBS で 5 分間、3 回洗浄した。blocking reagent (3% normal goat serum、0.1% Triton X-100 を含む 0.1 M PBS)で室温、1 時間反応させた後、抗 Pax5 抗体を 1 次抗体として、blocking reagent で適当な濃度に希釈し、4°C で約 12-16 時間抗原抗体反応を行った。1 次抗体反応後、0.1 M PBS で 5 分間、3 回洗浄し、続いてこの切片を、ビオチン標識した 2 次抗体 (0.1 M PBS で希釈) と室温で 30 分間反応させた。反応後の切片を 0.1 M PBS で 5 分間 3 回洗浄した後、VECTASTAIN Elite ABC Reagent (Vector laboratories)で室温、1 時間反応させた。0.1 M PBS で 5 分間 3 回洗浄後、切片を 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)に 5 分間浸した。次いで、切片を DAB 発色試薬[0.5 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine(DAB)、0.01%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含む 50

mM Tris-HCl (pH 7.5)]と 1~10 分間反応させた後、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で 10 分間洗浄した。発色後の切片は蒸留水で洗浄後、アルコール系列で脱水しキシレンに置換し透徹を行い、エンテランニューを用いて封入した。

## 2.3.2. 結果

### 2.3.2.1. マウス骨組織における Pax5 の発現

初代培養骨芽細胞において、mRNA 及びタンパク質レベルで Pax5 の発現が認められたことから、マウス胎生期の骨組織における Pax5 の発現分布を調べるため抗 Pax5 抗体を使用して免疫組織化学的解析を行った。その結果海綿骨周囲に付着した骨芽細胞において DAB 染色での強いシグナルが観察された(Fig.6.)。

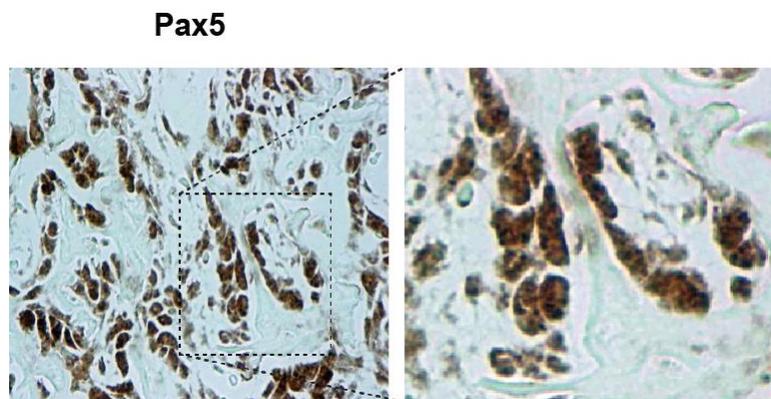


Fig.6. Immunohistochemical analysis on tibial sections for Pax5.

## 2.4. 考察

本章において明らかとなったことは、①マウス初代培養骨芽細胞において *Pax3*、*Pax5*、*Pax9* の mRNA が発現していて、特に *Pax5* は骨芽細胞の分化が進むにつれその発現が上昇すること、② *Pax5* タンパク質の発現が認められ、骨芽細胞の分化が進むにつれその発現が上昇すること、③マウス骨組織において、海綿骨周囲に存在する骨芽細胞で *Pax5* のタンパク質発現が認められることである。

これまでに *Pax5* と骨代謝に関する報告としては既述の通り *Pax5* 全身欠損マウスにおいて破骨細胞数の増加と骨量減少が見られるといったものがあるが、骨芽細胞に関しては詳細な解析がなされていなかった。したがって *Pax5* の発現が *in vitro* 及び *in vivo* の両方において確認されたということが今回の実験結果の目新しい点であると言える。*Pax3* や *Pax6* についても初代培養骨芽細胞において *Pax5* とは異なる発現変動を示していることから、骨芽細胞において何らかの機能を有している可能性は考えられるが、今回の検討では *Pax5* に特に焦点を当てて、次章以降で骨芽細胞において機能的に発現しているかを検討することとする。

## Chapter 3

# Pax5 遺伝子ノックダウンを用いた骨芽細胞機能解析

### 3.1. 序文

第 2 章において初代培養骨芽細胞においては Pax ファミリーのうち *Pax3*、*Pax5*、*Pax9* の mRNA 発現が確認され、骨芽細胞の分化に応じて *Pax5* のタンパク質発現が上昇することも確認された。またマウス脛骨骨組織において *Pax5* の免疫組織染色を行ったところ骨芽細胞においてその発現が認められるという結果が得られた。

*Pax5* 自体は最初に B リンパ球で同定された遺伝子として知られている。*Pax5* 遺伝子は B-Cell lineage specific activator protein (BSAP) と呼ばれるタンパク質をコードすることが知られており、造血幹細胞が pro-B 細胞、pre-B 細胞、未熟 B 細胞、成熟 B 細胞へと分化する際に必要であり、これらの細胞において発現することが分かっている (Cobaleda C et al., 2007、Medvedovic et al., 2011)。*Pax5* 欠損 pro-B 細胞を用いた検討から、*Pax5* 欠損 pro-B 細胞はその後の分化が起こらず、運命決定がなされない細胞となり、種々の刺激によりマクロファージやナチュラルキラー細胞へとミスリードされて分化してしまうことが分かった。また *Pax5* 欠損 pro-B 細胞は種々の細胞系列への運命決定に必要な遺伝子を発現してしまうことから、*Pax5* は pre-B 細胞への分化に必要な転写因子以外の転写因子の発現を抑制することにより B 細胞系列への運命決定に重要な役割を果たすということが報告されている (Nutt SL et al., 1999)。上述の通り *Pax5* は B リンパ球でその機能の詳細な解析が行われている遺伝子ではあるが、造血系幹細胞の系列とは由来が異なる間葉系幹細胞由来の骨芽細胞においてはどのような機能を果たしているかは全く報告がない。

そこで本章ではまず、*Pax5* siRNA を用いて内在性の *Pax5* の発現を骨芽細胞においてノックダウンした際に、その分化にどのような影響が見られるのか、更に詳細な解析を行った。マウス初代培養骨芽細胞は遺伝子導入が難しいことから、今後は遺伝子導入が簡便であり、骨芽細胞の細胞株として頻繁に用いられるマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて実験を行うこととした。

## 3.2. 方法

### 3.2.1. Reverse 法による MC3T3-E1 細胞への一過的 siRNA 導入と分化誘導条件での培養

Lipofectamine RNAiMAX を Opti-MEM 中に添加し、5 分間室温で放置した。その後、導入する Pax5 siRNA を最終濃度 5 nM になるように Opti-MEM 中に希釈し、Opti-MEM で希釈していた Lipofectamine RNAiMAX と混和後、20 分間静置した。この間に、 $\alpha$ MEM-10%FBS 中、 $1 \times 10^5$  cells/mL の密度で MC3T3-E1 細胞の懸濁液を調整し、siRNA-Lipofectamine RNAiMAX 混合液と細胞懸濁液を同時に 90 mm 細胞培養ディッシュに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。その 24 時間後、細胞にトリプシン処理を施し、適当な dish に播種した。翌日メディウムを 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid、5 mM  $\beta$ -glycerophosphate を含む  $\alpha$ MEM-10% FBS へ交換し、この時点を培養 0 日目とした。メディウムは 3 日おきに交換し、7 日間培養した(方法は Nakamura Y et al., 2011 に準じている)。

なお、今回用いた Pax5 siRNA の塩基配列は以下の通りである。

Pax5 siRNA #1	ACACUAUGCUGUACUGGAAGCUGG
Pax5 siRNA #2	CCAGCUUCCAGUCACAGCAUAGUGU

### 3.2.2. Real-time quantitative RT-PCR 法

#### 3.2.2.1. 逆転写反応

2.2.1.2.1.の方法に準じて行った。

#### 3.2.2.2. Real-time PCR 法

2.2.1.2.2.の方法に準じて行った。用いた Primer は Table.1.に加え Table.2. の通りである。

**Table.2. Primer (for Real-time PCR)**

Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Osterix</i>	ATGGCGTCCTCTCTGCTTG	TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT
<i>Runx2</i>	CCAACCGAGTCATTTAAGGCT	GCTCACGTCGCTCATCTTG
<i>Rankl</i>	TGTACTTTCGAGCGCAGATG	CCACAATGTGTTGCAGTTCC
<i>Osteoprotegerin</i>	ACCCAGAAACTGGTCATCAGC	CTGCAATACACACTCATCACT

### 3.2.3. Western blotting 法

2.2.1.3.の方法に準じて行った。

### 3.2.4. Alkaline phosphatase staining

各日数培養した MC3T3-E1 細胞の培養メディウムを取り除き、GPBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde で 15 分間固定した。固定後、細胞を超純水で 2 回洗浄し、0.1 M Tris-buffer (pH=9.5) (0.05 M MgCl<sub>2</sub> 及び 0.1 M NaCl を含む) で 50 倍希釈した NBT/BCIP Stock Solution を添加し、軟骨細胞内のアルカリフォスファターゼ (ALP) と 37°C で 30 分間反応させた。染色後の細胞は超純水で 2 回洗浄した後、30% glycerol solution で封入した。

### 3.2.5. BrdU 取り込みによる細胞増殖 assay

MC3T3-E1細胞のBrdU取り込みは、Cell Proliferation BrdU ELISA Kitを用いて測定した。詳細には、96 well plateに各細胞を1 × 10<sup>4</sup> cells/mLの濃度で最終容積が100 µL/wellになるように3.2.1.に準じてsiRNA導入と同時に播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で48時間培養した。48時間培養後、100 µM BrdU標識溶液を最終濃度が 10 µM になるように培養メディウム中に添加し、37°C、5%

CO<sub>2</sub>条件下で2時間培養した。2時間後、標識メEDIUMを除去し、FixDenat溶液を用いて室温で30分間固定した。固定液を除去した後、100  $\mu$ L/wellの抗BrdU-POD反応液を添加し、室温で90分間反応させた。抗体反応後、抗体溶液をしっかりと取り除き、洗浄液でwell内を3回洗浄した。洗浄液を除去後、100  $\mu$ L/wellの基質液を加え、適当な発色が得られるまで室温で反応させた。室温で40分間反応後、405 nm (対照波長490 nm)の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

### 3.2.6. TUNEL 染色による細胞死 assay

MC3T3-E1 細胞の細胞死評価は、In Situ Cell Death Detection kit を用いて測定した。3.2.1.の方法に準じて培養した細胞から Medium を除去し、GPBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde で室温、1 時間固定した。続いて、GPBS で 1 回洗浄後、浸透化溶液(0.1% クエン酸ナトリウム)中で、氷上で 2 分間インキュベートした。GPBS で 2 回洗浄後、風乾した。その後、TUNEL 反応液を適量加え、37°C、1 時間インキュベートした。その後 GPBS で 3 回洗浄後、蛍光顕微鏡(KEYENCE)で観察した。

## 3.3. 結果

### 3.3.1. MC3T3-E1 細胞への Pax5 siRNA 導入による解析

MC3T3-E1 細胞に 3.2.1.の方法により、Control siRNA または、配列の異なる 2 種類の Pax5 siRNA#1 と#2 を導入した。siRNA 導入後に細胞を播き替え、分化誘導を開始し、siRNA 導入後 72 時間の時点で Pax5 の mRNA の発現を 3.2.2.の方法により Real-time PCR で、タンパク質の発現を 3.2.3.の方法により Western blotting 法により検討した。その結果、Control siRNA 導入群に比べ、Pax5 siRNA #1 及び#2 導入群のいずれにおいても明らかな Pax5 mRNA 発現の有意な減少が認められた(Fig.7(A).)。また Pax5 タンパク質の発現は Control siRNA 導入群に比べ、Pax5 siRNA #1 及び#2 導入群のいずれにおいてもその発現の減少が観察された(Fig.7(B).)。

さらに骨芽細胞の分化の指標として用いられる ALP 染色を 3.2.4.の方法により分化誘導開始後 7 日目の時点で行ったところ、Control siRNA 導入群に比べ、Pax5 siRNA #1 及び#2 導入群のいずれにおいても明らかな ALP 陽性を示す青紫色の染色強度の低下が観察された(Fig.7(C).)。

続いて、分化誘導開始後 7 日目の時点で RNA を回収し、骨芽細胞分化マーカー遺伝子である *Osteocalcin*、 $\alpha(I)Collagen$  及び転写制御因子である *Osterix*、*Runx2* の mRNA の発現を 3.2.2.の方法により Real-time PCR で解析したところ、Control siRNA 導入群に比べ、Pax5 siRNA #1 及び#2 導入群のいずれにおいても *Osteocalcin*、 $\alpha(I)Collagen$ 、*Osterix* の mRNA 発現の有意な減少が認められた(Fig.7(D).)。一方で、Control siRNA 導入群と比較して、Pax5 siRNA #1 及び#2 導入群のいずれにおいても骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである *Runx2* においては、その発現に有意な変化は認められなかった(Fig.7(D).)。また、分化誘導開始後 7 日目の時点でタンパク質を回収し *Runx2* タンパク質の発現を 3.2.3.の方法により Western blotting 法により検討した。その結果 Control siRNA 導入群と比較して、Pax5 siRNA #1 及び#2 導入群のいずれにおいても *Runx2* 発現量の変化は観察されなかった(Fig.7(E).)。

更に、骨吸収を担う破骨細胞の分化に影響を及ぼすことが知られている、骨芽細胞が発現するサイトカインである *Rankl* 及び RANKL のデコイ受容体である *Osteoprotegerin(Opg)* の mRNA 発現量についても解析した結果、Control siRNA 導入群と比較して、Pax5 siRNA #1 及び#2 導入群のいずれにおいても *Rankl*、*Opg* の発現に有意な変化は認められなかった(Fig.8.)。

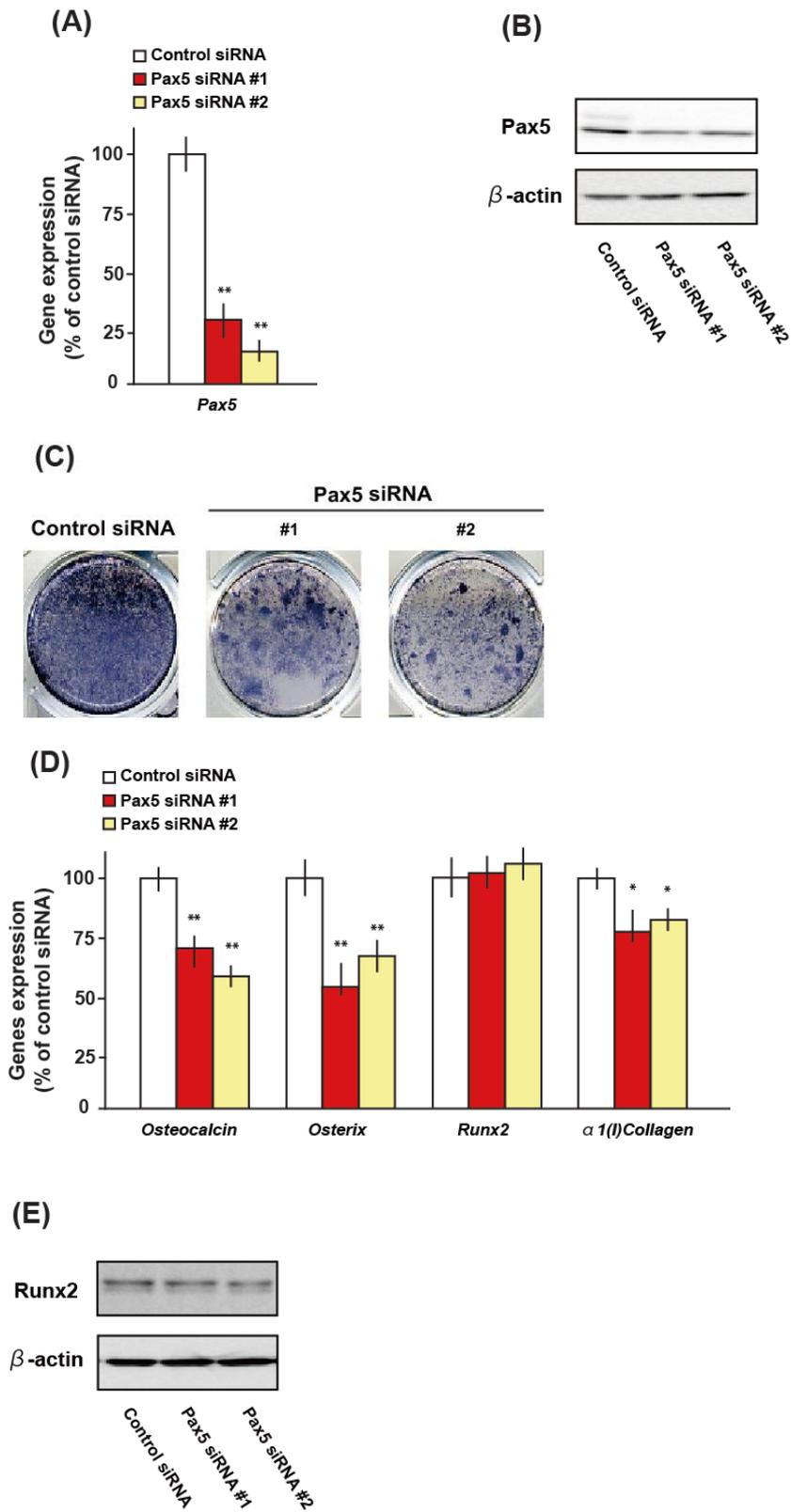


Fig.7. Effect of Pax5 knocked down on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells.

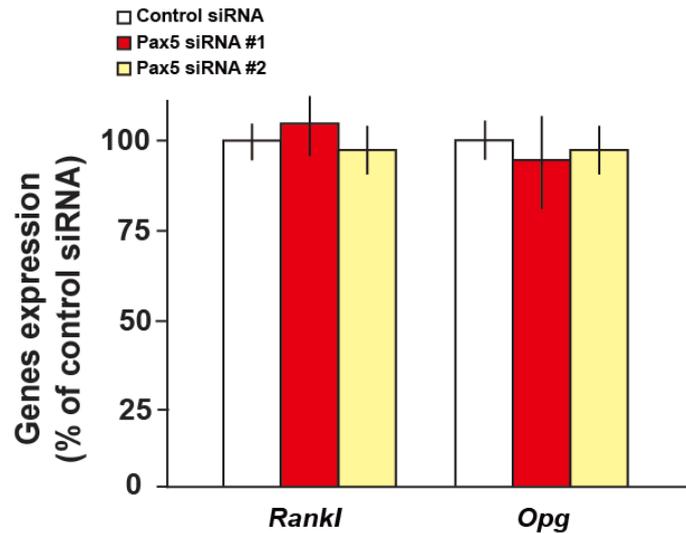


Fig.8. Effect of Pax5 knocked down on expression of molecules involved in osteoclast differentiation in MC3T3-E1 cells.

### 3.3.2. MC3T3-E1 細胞への Pax5 siRNA 導入による細胞増殖、細胞死への影響

MC3T3-E1 細胞に 3.2.1.の方法により、Control siRNA または、配列の異なる 2 種類の Pax5 siRNA#1 と#2 を導入した際の細胞増殖への影響を 3.2.5.の方法により BrdU 取り込みを指標として解析を行った。その結果 Control siRNA 導入群と比較して、Pax5 siRNA#1 及び#2 導入群のいずれにおいても BrdU 取り込み量に有意な変化は認められなかった(Fig.9(A).)。

また Pax5 siRNA 導入による細胞死への影響を 3.2.5.の方法により transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end labeling(TUNEL)染色を指標として解析を行った。その結果 Control siRNA 導入群と比較して、Pax5 siRNA#1 及び#2 導入群のいずれにおいても全細胞数における TUNEL 染色陽性の細胞数の割合に有意な変化は認められなかった(Fig.9(B).)。

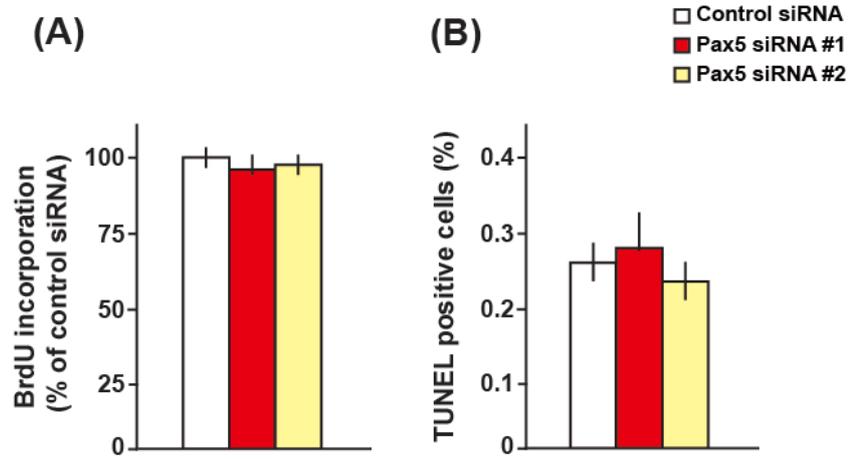


Fig.9. Effect of Pax5 knocked down on cell proliferation and viability in MC3T3-E1 cells.

### 3.4. 考察

本章で明らかとなったことは骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞において Pax5 をノックダウンすることにより①骨芽細胞分化が抑制されること、②骨芽細胞分化マーカー遺伝子 *Osteocalcin*、 $\alpha(I)Collagen$  及び転写制御因子 *Osterix* の mRNA 発現が減少したこと、③*Runx2* の mRNA 発現は変化しないこと、④破骨細胞分化関連遺伝子 *Rankl*、*Opg* の mRNA 発現は変化しないこと、⑤細胞増殖と細胞死には影響を及ぼさないことである。

今回、Pax5 ノックダウンにより骨芽細胞の分化が抑制されたが、細胞増殖及び細胞死に変化は認められなかった。このことから、Pax5 ノックダウンによる骨芽細胞の分化抑制は、細胞増殖抑制や細胞死の惹起によって起こった現象ではなく、Pax5 が骨芽細胞の分化成熟化の過程に影響を与えて起こった現象と推察できる。

また特に着目すべき点として、Pax5 ノックダウンにより骨芽細胞の分化は抑制されるが、骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである *Runx2* の mRNA 及びタンパク質の発現には全く変化が見られなかったということである。このことから Pax5 は *Runx2* とは異なる機構で骨芽細胞の分化を調節している可能性が示唆される。一方で、*Osteocalcin*、 $\alpha(I)Collagen$ 、*Osterix* の mRNA 発現は Pax5 ノックダウンにより減少したことから、骨芽細胞分化抑制は、これらの遺伝子の発現を Pax5 が調節することにより起こった可能性が考えられる。*Osterix* は骨芽細胞分化に重要な転写因子として知られているが、実際に *in vitro* で培養骨芽細胞において *Osterix* をノックダウンすることにより骨芽細胞分化が抑制されること (Zhu F et al., 2012) や、逆に *Osterix* 過剰発現により骨芽細胞分化が促進するといった報告 (Matsubara T et al., 2008, Shrivats AR et al., 2014) があることから今回 Pax5 ノックダウンにより見られた骨芽細胞分化抑制は *Osterix* の発現が減少したことに原因があるかもしれない。

従って、次の検討として、Pax5 と骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写制御因子がどのように関連するかを明らかにすることとした。

## Chapter 4

# 骨芽細胞特異的分化マーカー遺伝子、転写制御因子に対する Pax5 の影響

## 4.1. 序文

第3章において前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞において Pax5 をロックダウンした際に ALP 染色性の低下や、*Osteocalcin*、*Osterix*、 $\alpha(D)Collagen$  といった骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写制御因子の mRNA 発現の有意な低下が認められたことから、Pax5 は骨芽細胞の分化を促進的に調節している可能性が示唆された。本章ではどのようなメカニズムで Pax5 がこれらの分化マーカー遺伝子、転写制御因子と関連しているのかを、Pax5 自体も転写制御因子であることに着目し、遺伝子のプロモーター活性を中心に更に詳細な解析を行った。

## 4.2. 方法

### 4.2.1. Pax5 siRNA を用いた Reporter assay

MC3T3-E1 細胞を  $\alpha$ MEM-10%FBS 中、 $1 \times 10^5$  cells/mL で 24 well プレートに播種した。その際に Lipofectamine 2000 を用いたリバース法により、siRNA(5 pmol/well)及び各種骨芽細胞特異的分化マーカー遺伝子、転写制御因子のレポーターベクター(0.4  $\mu$ g/well)を同時にトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に  $\alpha$ MEM-10%FBS に交換し、その 48 時間後に Luciferase 活性の測定を行った(方法は Nakamura Y et al ., 2011 に準じている)。

### 4.2.2. Pax5 発現ベクターを用いた Reporter assay

MC3T3-E1 細胞を $\alpha$ MEM-10%FBS 中  $5 \times 10^4$  cells/mL の濃度で 24 well プレートに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養後、トランスフェクションに用いた。トランスフェクションでは導入するプラスミド DNA(Pax5 発現ベクター及び *Osteocalcin* あるいは *Osterix* レポーターベクター)を Opti-MEM で希釈し、Plus reagent と混和後、5 分間室温で静置した。その後、Lipofectamine LTX と混和し、30 分間室温で静置した。前日に播種した細胞の培養液にプラスミド DNA-Lipofectamine 複合体を添加し、24 時間トランスフェクトした。その後 $\alpha$ MEM-10%FBS に置換し、さらに 24 時間培養後に Luciferase 活性の測定を行った(方法は Nakamura Y et al., 2011 に準じている)。

### 4.2.3. Reporter assay

4.2.1.及び、4.2.2.に準じて遺伝子導入を行った細胞を、PBS で 2 回洗浄後、Passive lysis buffer (Promega)を用いて回収し、測定まで -80 °Cで保存した。ルシフェラーゼ活性は、Dual Luciferase reporter assay system (Promega) を用いて測定した。アッセイシステムでは、遺伝子発現の測定値(ホタルルシフェラーゼの値)を内部コントロール( $\beta$ -ガラクトシダーゼの値)で補正して定量した。

### 4.2.4. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

#### 4.2.4.1. マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の培養

MC3T3-E1 細胞を 10% FBS を含む $\alpha$ MEM 中、 $1.0 \times 10^4$  cells/mL の密度で各プレートに播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。数日後細胞がサブコンフルエントになったことを確認後、メディウムを 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid、5 mM  $\beta$ -glycerophosphate を含む $\alpha$ MEM-10% FBS へ交換し、この時点を培養 0 日目とした。メディウムは 3 日おきに交換し、数日間培養した。

#### 4.2.4.2. ホルマリンによる細胞固定

4.2.4.1. に準じて、細胞を培養した。分化誘導 7 日間培養した細胞の培地に 1% formaldehyde を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下にて 10 分間固定を行っ

た。その後、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protease inhibitors {(p-amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride (APMSF), leupeptin, antipain, benzamidine}を加えた PBS で洗浄した後に回収し、得られた細胞を SDS Lysis Buffer [1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protease inhibitors]に可溶化させ、氷中で 10 分間順化させた。その後、ソニケーターを用いて 10 秒間超音波処理を行った後に 20 秒間氷中で静置し、合計 10 回超音波処理を行った。

#### 4.2.4.3. Immunoprecipitation

得られたサンプルを ChIP Dilution buffer [0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA (pH 8.0), 16.7 mM Tris-HCl (pH 8.1), 167 mM NaCl, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  protease inhibitors]で 10 倍希釈した後、TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM EDTA (pH 8.0)]で 2 倍希釈した protein A agarose[1.5 mL beads with 600  $\mu\text{g}$  sonicated salmon sperm DNA, 1.5 mg BSA, 4.5 mg recombinant protein A / 1.5 mL buffer; 10 mM EDTA, 0.05% sodium azide]を 75  $\mu\text{L}$  加え、4  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間反応させた。1500 rpm で 15 秒間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心を行った後、上清を回収し抗 Pax5 抗体あるいは Normal mouse IgG を 2  $\mu\text{g}$  分加え、4  $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間反応させた。翌日、60  $\mu\text{L}$  protein A agarose を加え、4  $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間反応させた後、Low Salt buffer [0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 150 mM NaCl]、High Salt buffer [0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 500 mM NaCl]、LiCl buffer [0.25 M LiCl, 1% NP 40, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.1)]の順に各 Buffer で洗浄を行い、さらに TE buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM EDTA (pH 8.0)]で 2 回洗浄を行った。

#### 4.2.4.3. 固定の解除と DNA の回収

洗浄終了後、250  $\mu\text{L}$  の Elution buffer (10 mM DTT, 1% SDS, 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ )を用い、常温、15 分で溶出した。遠心で上清を回収したのち、レジンを再び 250  $\mu\text{L}$  Elution buffer を加えてもう一度繰り返した。得られた上清に 5 M NaCl を 20  $\mu\text{L}$  加え、65  $^{\circ}\text{C}$ で 6 時間処理した。その後、0.5 M EDTA 10  $\mu\text{L}$ 、1 M Tris-HCl (pH 6.5) 4  $\mu\text{L}$ 、10 mg/mL Proteinase K 2  $\mu\text{L}$  を加え、45  $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間処理した。その後、phenol-chloroform 法により DNA を抽出し、30  $\mu\text{L}$  の滅菌精製水で溶解し、使用時まで -20  $^{\circ}\text{C}$ で保存した。なお、PCR

に用いたプライマーは Table.3. の通りである。それぞれの primer は(Fig.12.) に示す *Osteocalcin* 及び *Osterix* のプロモーター領域を認識するように設計された。

**Table.3. Primer (for ChIP assay)**

<i>Fragments</i>	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>Osteocalcin</i> (a-b)	GGCTCAGCAGTTAAGAGCCA	AGCGCCTCAGGCTGCGATGA
<i>Osteocalcin</i> (c-d)	CCGAGCCCCCGCAGGTTTTT	CTTGTGGTTGGTGGGGAAGA
<i>Osteocalcin</i> (e-f)	ATTACTGAACACTCCCTCCC	TCTGACATGGCCCCAGACCT
<i>Osteocalcin</i> (g-h)	GGAGTGGTGGAGCAGCCCCT	GCACCCTCCAGCATCCAGTA
<i>Osterix</i> (a-b)	ATACATATACATACATTAC	TGTGTGTATGTGTGAGTGTG
<i>Osterix</i> (c-d)	ACGCACACTGCCACCCTGAA	CTCTGCTACCCACATGGGGA
<i>Osterix</i> (e-f)	GGCAGCCTCGGTGGTAGCAG	TGGCTGTCCCGTCTCCTCTC
<i>Osterix</i> (g-h)	ATTGCCAGTAATCTTCAAGC	GGAGAGAAGAAAAGGGGGTG
<i>Osterix</i> (i-j)	CATATTCCTGTTTCCCACCC	GGGAGAGAAGAGATCTAAAG

## 4.3. 結果

### 4.3.1. Pax5 siRNA に対する骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写因子の転写活性への影響

MC3T3-E1 細胞に 4.2.1.の方法で Control siRNA、Pax5 siRNA#1 または#2 と同時に *Osteocalcin*、*Osterix*、 $\alpha$ (I)*Collagen*、*Runx2* のプロモーター領域全長をコードする Luciferase レポーターベクターを導入し、内在性 Pax5 遺伝子をノックダウンした際の各種遺伝子の転写活性を測定した。その結果、Control siRNA 導入群に比べ、Pax5 siRNA #1 及び#2 導入群のいずれにおいても *Osteocalcin*、*Osterix* プロモーター転写活性の有意な減少が認められた(Fig.10.)。一方で、Control siRNA 導入群と比較して、Pax5 siRNA#1 及び#2 導入群のいずれにおいても  $\alpha$ (I)*Collagen*、*Runx2* プロモーターの転写活性に有意な変化は認められなかった(Fig.10.)。

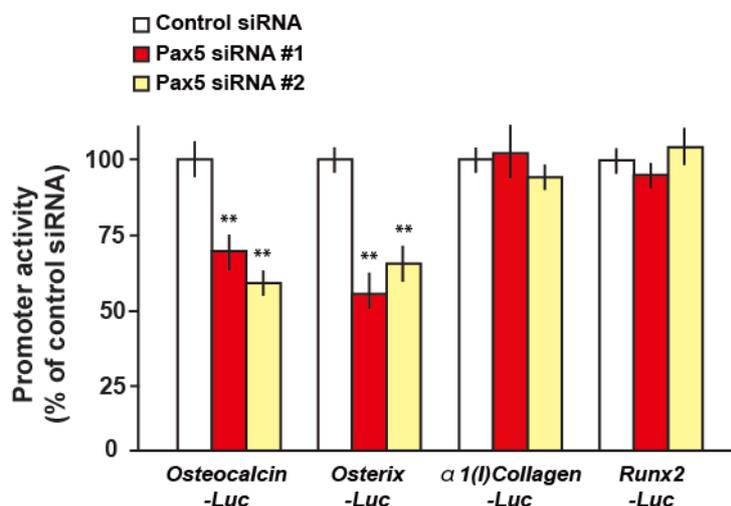


Fig.10. Effect of Pax5 knocked down on promoter activities in MC3T3-E1 cells.

### 4.3.2. Pax5 過剰発現に対する骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写制御因子の転写活性への影響

MC3T3-E1 細胞において Pax5 siRNA 導入時に *Osteocalcin* と *Osterix* の転写活性が減少することが見いだされたので、これら 2 つの遺伝子に今後は特に着目して更に解析を進めることとした。MC3T3-E1 細胞に 4.2.2.の方法で Empty vector(EV)、Pax5 遺伝子全長をコードする発現ベクターあるいは Pax5 遺伝子内の遺伝子結合領域であるペアードドメイン領域を欠損させた Pax5 delta PD 発現ベクターと同時に *Osteocalcin* あるいは *Osterix* の Luciferase レポーターベクターを導入し、*Osteocalcin* と *Osterix* プロモーターの転写活性を測定した。その結果、EV 導入群に比べ、Pax5 発現ベクター導入群において *Osteocalcin* 及び *Osterix* の転写活性の有意な上昇が認められた。一方、EV 導入群と比較して、Pax5 delta PD 発現ベクター導入群では転写活性の有意な上昇は認められなかった(Fig.11.)。

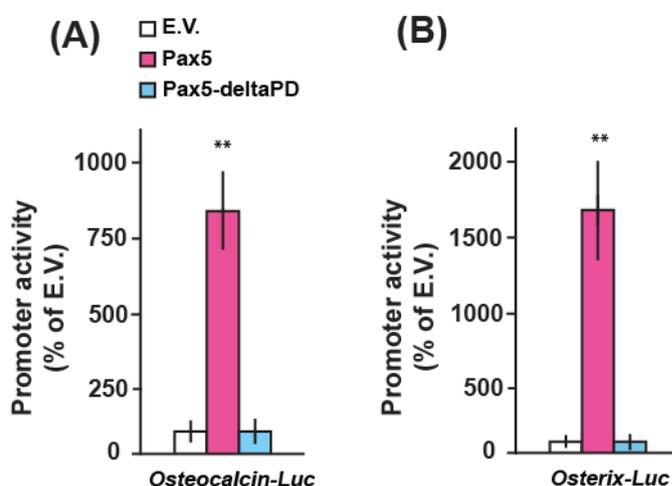


Fig.11. Effect of Pax5 on promoter activities of osteocalcin and osterix.

#### 4.3.3. in silico 解析を用いた骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写制御因子プロモーター領域への Pax5 結合部位の探索

MC3T3-E1 細胞において Pax5 ノックダウン及び過剰発現系を用いた実験により *Osteocalcin* と *Osterix* の転写活性が Pax5 により正に制御されている可能性が示唆されたので、in silico 解析を用いて *Osteocalcin* と *Osterix* のプロモーター領域に Pax5 結合配列が存在する可能性があるのかを探索した。Web 上の

遺伝子 database である VISTA tools(<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>) を用いて解析を行った結果、(Fig.12.)に模式的に示すように *Osteocalcin* 及び *Osterix* プロモーター上の黒い太線の箇所に putative Pax5 binding site が存在する可能性が示唆された。一方で *Runx2* プロモーター上には putative Pax5 binding site は存在しないことが明らかとなった(data not shown)。

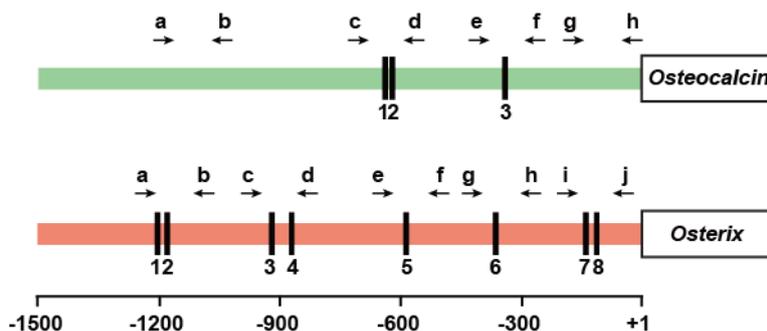


Fig.12. Putative Pax5 binding sites on mouse osteocalcin and osterix promoter.

#### 4.3.4. deletion construct レポーターベクターを用いた転写活性の解析

続いて、*Osteocalcin* 及び *Osterix* プロモーター全長を徐々に短くした deletion construct レポーターベクターを作製した。*Osteocalcin* に関しては 4 種類(転写開始点上流-1316 bp~, -657 bp~, -147 bp~, -34 bp~)、*Osterix* に関しては 5 種類(転写開始点上流-1269 bp~, -665 bp~, -471 bp~, -304 bp~, -121 bp~)作製した。MC3T3-E1 細胞に 4.2.2.の方法で EV あるいは Pax5 遺伝子全長をコードする発現ベクターと同時に、作製した *Osteocalcin* 及び *Osterix* の deletion construct レポーターベクターを導入し転写活性を測定した。その結果、*Osteocalcin* に関しては EV 導入群に比べ、Pax5 発現ベクター導入群において転写開始点上流-1316 bp~と-657 bp~の *Osteocalcin* deletion construct レポーターベクターを導入した際に転写活性の有意な上昇がみとめられたが、転写開始点上流-147 bp~と-34 bp~のベクターを導入した際には有意な変化は認められなかった。*Osterix* に関しては、EV 導入群に比べ、Pax5 発現ベクター導入群においてどの *Osterix* deletion construct レポーターベクターを導入した際でも転写活性の有意な上昇が認められたが、短くなるにつれ転写活性は減弱していくことが明らかとなった。実際、Pax5 発現ベクター導入群において転写開始点上流-665 bp~と-471 bp~間では転写活性の有意な減少が認められ、また転写

開始点上流-304 bp~-と-121 bp~間でも転写活性の有意な減少が認められた (Fig.13.)。

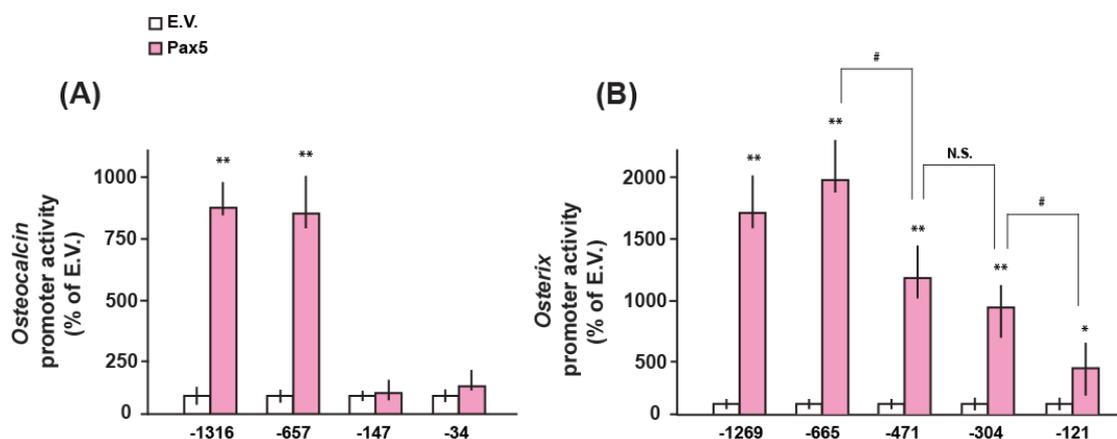


Fig.13. Promoter activities of *osteocalcin* or *osterix* with deleted reporter constructs.

#### 4.3.5. ChIP assay

4.2.4.の方法で ChIP assay を行った。その結果 *Osteocalcin* では(Fig.12.)で示すような Pax5 putative binding site 1、2、3 を挟むように設計した c-d 領域と e-f 領域を増幅するような primer によりシグナルが検出された。*Osterix* では (Fig.12.)で示すような Pax5 putative binding site 5、6、7、8 を挟むように設計した e-f 領域、g-h 領域そして i-j 領域を増幅するような primer によりシグナルが検出された。しかしながら、Pax5 putative binding site 1、2、3、4 を挟むように設計した c-d 領域と e-f 領域を増幅するような primer ではシグナルは検出できなかった。

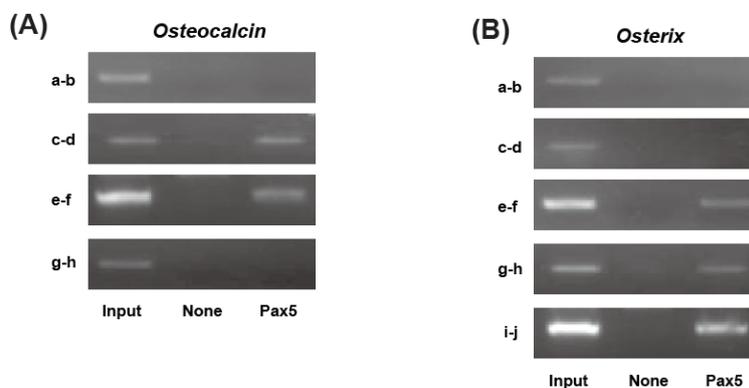


Fig.14. ChIP assay.

## 4.4. 考察

本章で明らかとなったことは骨芽細胞において①Pax5 をノックダウンすることにより *Osteocalcin*、*Osterix* の転写活性が低下したこと、②Pax5 過剰発現により *Osteocalcin*、*Osterix* の転写活性が上昇し、その転写活性の上昇には Pax5 分子内のペアードドメインが関与すること、③in silico 解析により *Osteocalcin*、*Osterix* 遺伝子のプロモーター上に Pax5 結合サイトの存在が示唆されたこと、④ChIP assay により実際に *Osteocalcin* と *Osterix* のプロモーター上への Pax5 の結合が確認されたことである。

Pax ファミリータンパク質は分子内のペアードドメインと他のモチーフ部位を用いて他のタンパク質と相互作用を行い、転写活性を制御していることが知られている(Fitzsimmons D et al., 1996、Eberhard D et al., 2000、He T et al., 2011)。Pax5 においても実際に相互作用するタンパク質に関していくらか報告があり、Pax5 ペアードドメインは、Acute myeloid leukemia-1(AML1=Cbfa2/Runx1)の runt-DNA 結合ドメインと相互作用して、B 細胞特異的 B リンパ球キナーゼ(BLK)プロモーターの転写活性を協調的に促進する作用がある(Libermann TA et al., 1999)。

第3章において Pax5 ノックダウンにより *Osteocalcin*、*Osterix*、 $\alpha(I)Collagen$  の mRNA 発現の減少が認められたが、今回の検討でプロモーター活性の抑制が認められたのは *Osteocalcin* と *Osterix* のみであったため、Pax5 は *Osteocalcin* と *Osterix* の転写活性を直接的、あるいは間接的に制御している可能性が示唆された。 $\alpha(I)Collagen$  に関しては Pax5 ノックダウンにより転写活性の変化は認められなかったが、mRNA 発現量は減少していた。このことから、 $\alpha(I)Collagen$  は Pax5 に間接的に転写を調節されていると考えられる。したがって Pax5 ノックダウンによる  $\alpha(I)Collagen$  の mRNA 発現の減少は *Osterix* 等の発現の減少を介した 2 次的な作用による可能性が示唆される。また Pax5 発現ベクターと、ペアードドメインを欠損した Pax5 発現ベクターを用いた実験により、*Osteocalcin* と *Osterix* の転写活性が Pax5 発現ベクター導入時のみ顕著に上昇したという結果は、Pax5 はペアードドメイン部分を介して *Osteocalcin* と *Osterix* のプロモーターに結合し、直接各遺伝子の転写活性を調節する可能性があること示唆している。そしてこの仮説は in silico 解析による *Osteocalcin* と *Osterix* 遺伝子プロモーター上に Pax5 putative binding site が想定され、そこから設計した primer を用いた ChIP assay での結果から、正しいと言えることができる。*Osteocalcin* プロモーターの in silico 解析では Pax5 putative binding site が 3 ヶ所存在し、この予測は deletion construct プロモーターベクターの実験結果と

ChIP assay の結果と完全に一致している。*Osterix* プロモーターの *in silico* 解析では Pax5 putative binding site が 8 ヶ所存在したが、deletion construct プロモーターベクターの実験結果と ChIP assay の結果から模式図 1、2、3、4 の部分では Pax5 の結合は実際には認められず、模式図 5、6、7、8 の部分で Pax5 の結合が認められた。このように *in silico* 解析の結果と実際に転写因子が結合するかどうかは ChIP assay 等で確かめないと分からないことではあるが、いずれにせよ、Pax5 は *Osteocalcin* と *Osterix* プロモーター上に結合しその転写を直接制御することが明らかとなった。

また前述で Pax5 は AML1=Cbfa2/Runx1 と相互作用しているが、骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである Runx2 も runt-DNA 結合ドメインを有しており、他のタンパク質と相互作用することが知られている(Wastendorf JJ et al., 2006)。このため、Pax5 と Runx2 の相互作用についても検討を行った。しかしながら、MC3T3-E1 細胞あるいは遺伝子導入が簡便なためよく用いられる HEK293 細胞において Pax5 発現ベクターあるいは Runx2 発現ベクターを用いて、本章で行った同様な手法で解析を行ったが、Pax5 と Runx2 が相互作用を示すといった結果は得られなかった(data not shown)。

以上の結果を考え合わせると、Pax5 は Runx2 非依存的に *Osteocalcin* と *Osterix* の転写活性を介して骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された。

## Chapter 5

### Pax5 安定発現細胞株を用いた解析

#### 5.1. 序文

前章の結果から Pax5 は骨芽細胞特異的分化マーカー遺伝子である *Osteocalcin* 及び転写制御因子である *Osterix* のプロモーターに結合しこれら遺伝子の転写を直接正に制御して、骨芽細胞分化成熟化を促進的に調節する可能性が示唆された。本章においては前章までの Pax5 が骨芽細胞を促進的に調節するといった仮説を更に裏付けるために、Pax5 安定発現細胞株を作製し、骨芽細胞分化過程へ Pax5 が及ぼす影響のより詳細な解析を行った。

#### 5.2. 方法

##### 5.2.1. Pax5 安定発現細胞株の作製

MC3T3-E1 細胞を、 $\alpha$ MEM-10%FBS 中  $5.0 \times 10^4$  cells/mL の密度で 3.5 mm シャーレに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。2  $\mu$ g/well の pcDNA3.1-neo Pax5、及びコントロールとして pcDNA3.1-neo を Lipofectamine LTX によりトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後、細胞を 90 mm シャーレに継代し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。その際に 600  $\mu$ g/mL で G418 をメディウム中に転嫁し、2 日間おきに G418 を含む新しいメディウムに交換して 2 週間培養してネオマイシン耐性遺伝子を発現する細胞を選別した。その後、単一細胞からなるコロニーをピックアップして 24 well dish に播種し、徐々にスケールアップを行い 2~5 回までの継代数のものを、以降の実験に用いた(Fig.15.)。

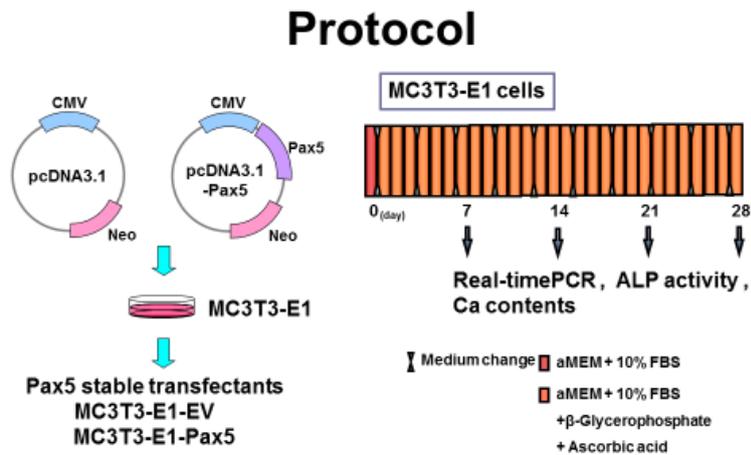


Fig.15. Procedures of Pax5 stable cell line.

## 5.2.2. Pax5 安定発現細胞株の培養

ピックアップにより得た Pax5 安定発現細胞株群を 4.2.4.1. に準じて培養を行い、最大 28 日間培養を行った(Fig.15.)。

## 5.2.3. Real-time quantitative RT-PCR 法

### 5.2.3.1. 逆転写反応

2.2.1.2.1.の方法に準じて行った。

### 5.2.3.2. Real-timePCR 法

2.2.1.2.2.の方法に準じて行った。

#### 5.2.4. ALP 活性の測定

24 well プレートで培養した細胞を、GPBS で 2 回洗浄したのち、Lysis buffer [0.1 M Tris-HCl (pH7.5)、0.1% Triton X-100] 200  $\mu$ L 中で細胞を超音波破碎した。細胞破碎後の細胞溶解液 10  $\mu$ L と Assay buffer (0.05 M 2-amino-2-methyl-1-propanol、10 mM p-nitrophenylphosphoric acid、2 mM  $MgCl_2$ ) 200  $\mu$ L を混合し、37°C で 30 分間反応させた。反応後、直ちに 405 nm の吸光度を測定した。また、細胞破碎液の蛋白量を protein assay reagent (Bio-Rad 社)を用いて測定し、蛋白量及び反応時間あたりの活性を求めた(方法は Hinoi E et al ., 2006 に準じている)。

#### 5.2.5. $Ca^{2+}$ 蓄積量の測定

24 well プレートで培養した細胞を、PBS で 2 回洗浄した後、Lysis buffer [0.1 M Tris-HCl (pH 7.5); 0.1 % Triton X-100]で超音波破碎した。細胞溶解液に最終濃度 2 M になるように HCl を加え、4°C で 16-24 時間静置し、 $Ca^{2+}$ を遊離させた。細胞溶解液を 20,000 g で 5 分間遠心した後、得られた上清中の  $Ca^{2+}$ 量を Calcium C Test Wako を用いて測定した(方法は Hinoi E et al ., 2006 に準じている)。

#### 5.2.5. 細胞の von Kossa 染色

各日数培養した MC3T3-E1 細胞の培養メディウムを取り除き、GPBS で 2 回洗浄後、4% paraformaldehyde で 15 分間固定した。固定後、細胞を超純水で 2 回洗浄し、1%  $AgNO_3$  溶液、sodafomal 溶液、5% sodium thiosulfate 溶液、von Gieson 溶液の順に各 1 分間室温で反応させた。それぞれの溶液に置換する際には超純水で 2 回洗浄した。染色後の細胞は超純水で 2 回洗浄した後、室温で乾燥後、顕微鏡で観察した。

#### 5.2.6. Western blotting 法

2.2.1.3.の方法に準じて行った。

## 5.3. 結果

### 5.3.1. Pax5 安定発現細胞株の作製

MC3T3-E1 細胞を用いて、Pax5 を安定発現させた細胞株を作製し、骨芽細胞分化に与える Pax5 発現の影響を検討した。5.2.1.の方法により Pax5 安定発現細胞株をクローニングし、5.2.3.の方法で Real-time PCR 法により Pax5 の mRNA 発現量を解析した。その結果、Pax5 安定発現細胞株(MC3T3-E1-Pax5)における Pax5 mRNA の発現量は、EV を用いて同様の操作を行って得た細胞株(MC3T3-E1-EV)と比べると、MC3T3-E1-Pax5 Clone #1 では約 7 倍、Clone #2 では約 5 倍の有意な発現上昇が認められた(Fig.16.)。したがってこれら細胞株 MC3T3-E1-Pax5 Clone #1、#2 は Pax5 を過剰に発現することが確認されたので、この 2 つの細胞株を以降の実験、解析に用いることとした。

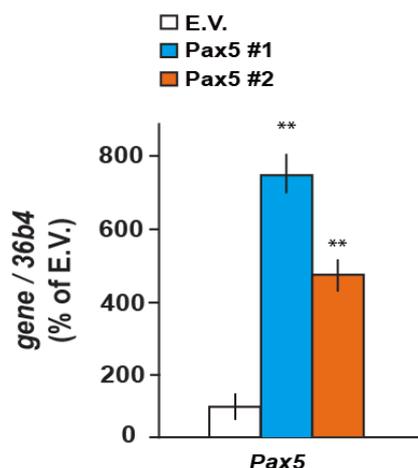


Fig.16. Characterization of Pax5 stable cell line.

### 5.3.2. Pax5 安定発現細胞株における骨芽細胞分化マーカーの変動解析

Pax5 の骨芽細胞分化マーカーへの影響を検討するため Control として用いた MC3T3-E1-EV 及び MC3T3-E1-Pax5 #1、#2 を 5.2.2.の方法で分化誘導開始後、最大 28 日間培養し、7、14、21、28 日目において 5.2.4.の方法で ALP 活性を、

5.2.5.の方法で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 蓄積量の解析を行った。その結果、骨芽細胞の分化に応じて活性が高くなっていくことが知られている ALP 活性に関しては、MC3T3-E1-EV に比べ、MC3T3-E1-Pax5 #1、#2 では 7、14、21、28 日目のどの日数においてもその活性の有意な上昇が認められた(Fig.17(A).)。また骨芽細胞分化後期で増加する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 蓄積量に関しては、分化初期である分化誘導開始後培養 7、14 日目において MC3T3-E1-EV では検出は認められなかったが MC3T3-E1-Pax5 #1、#2 いずれにおいても検出は認められた。また分化誘導開始後培養 14、21 日目において MC3T3-E1-EV と比べ MC3T3-E1-Pax5 #1、#2 では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 蓄積量の有意な増加が認められた(Fig.17(B).)。さらに、分化誘導開始後培養 21 日目において、5.2.5 の方法で von Kossa 染色を行い骨芽細胞の石灰化解析を行った結果、MC3T3-E1-EV と比べ MC3T3-E1-Pax5 #1 では黒褐色で示される骨芽細胞石灰化部位の顕著な増加が観察された(Fig.17(C).)。#2 においても黒褐色で示される骨芽細胞石灰化部位の顕著な増加が観察された(data not shown)。

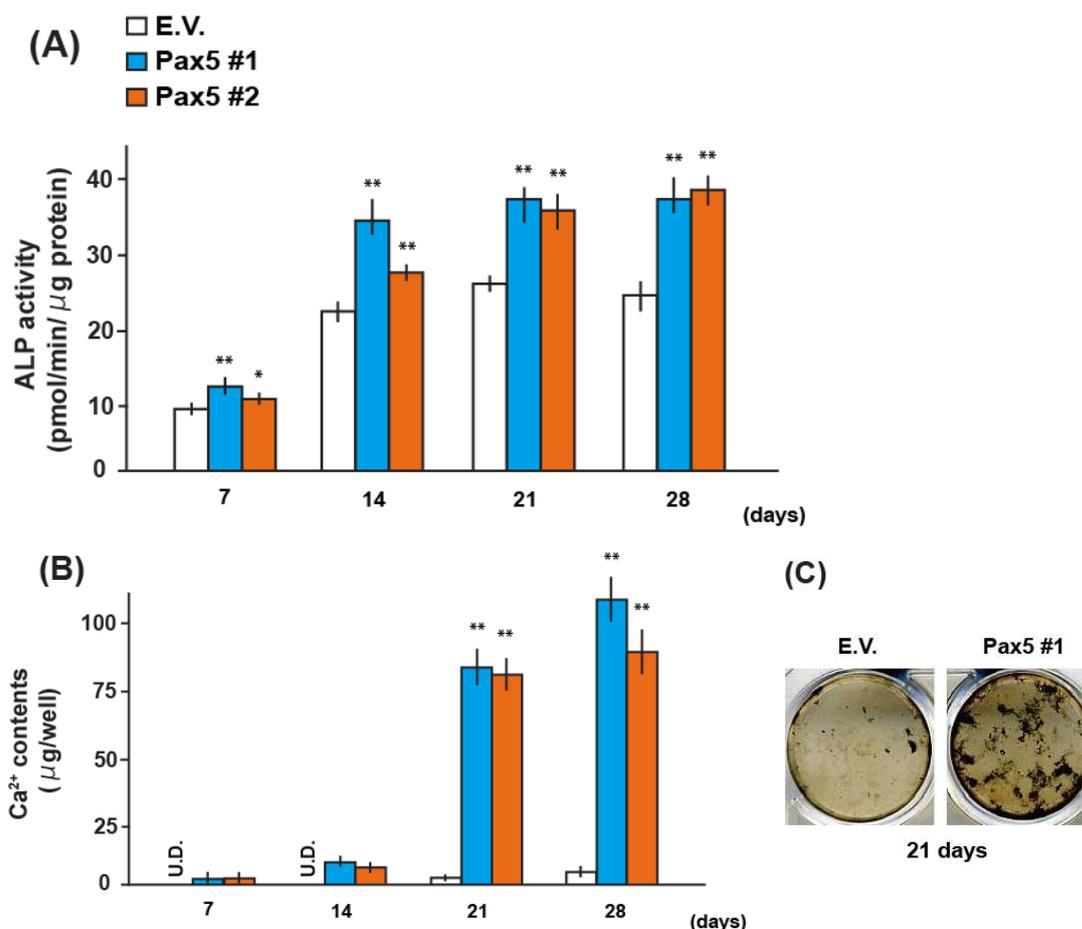


Fig.17. Effect of Pax5 overexpression on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells.

### 5.3.3. Pax5 安定発現細胞株における骨芽細胞分化マーカー遺伝子、転写制御因子の発現解析

Pax5 の骨芽細胞分化マーカーへの影響を検討するため Control として用いた MC3T3-E1-EV 及び MC3T3-E1-Pax5 #1、#2 を 5.2.2.の方法で分化誘導開始後、最大 28 日間培養し、7、14、21、28 日目において mRNA を回収し、5.2.3.の方法で骨芽細胞分化マーカー遺伝子 *Osteocalcin*、 $\alpha(D)Collagen$  を、転写制御因子である *Osterix*、*Runx2* の mRNA 発現量の解析を行った。その結果、*Osteocalcin*、*Osterix* に関しては MC3T3-E1-EV と比べ分化誘導開始後培養 7、14、21、28 日目いずれの日数においても MC3T3-E1-Pax5 #1、#2 どちらも mRNA 発現量の有意な上昇が認められた(Fig.18(A),(B).)。 $\alpha(D)Collagen$  に関しては MC3T3-E1-EV と比べ分化誘導開始後培養 14、21、28 日目において MC3T3-E1-Pax5 #1、#2 どちらにおいても mRNA 発現量の有意な上昇が認められた(Fig.18(C).)。一方、*Runx2* に関しては MC3T3-E1-EV と比べ分化誘導開始後培養 7、14、21、28 日目いずれの日数においても MC3T3-E1-Pax5 #1、#2 どちらにおいても mRNA 発現量の有意な変化は認められなかった(Fig.18(D).)。また、培養 7 日目においてタンパク質を回収し、5.2.6.の方法で western blotting 法により *Runx2* タンパク質の発現を解析した。その結果、MC3T3-E1-EV と比べ MC3T3-E1-Pax5 ではその発現に有意な変化は認められなかった(Fig.18.(E).)。

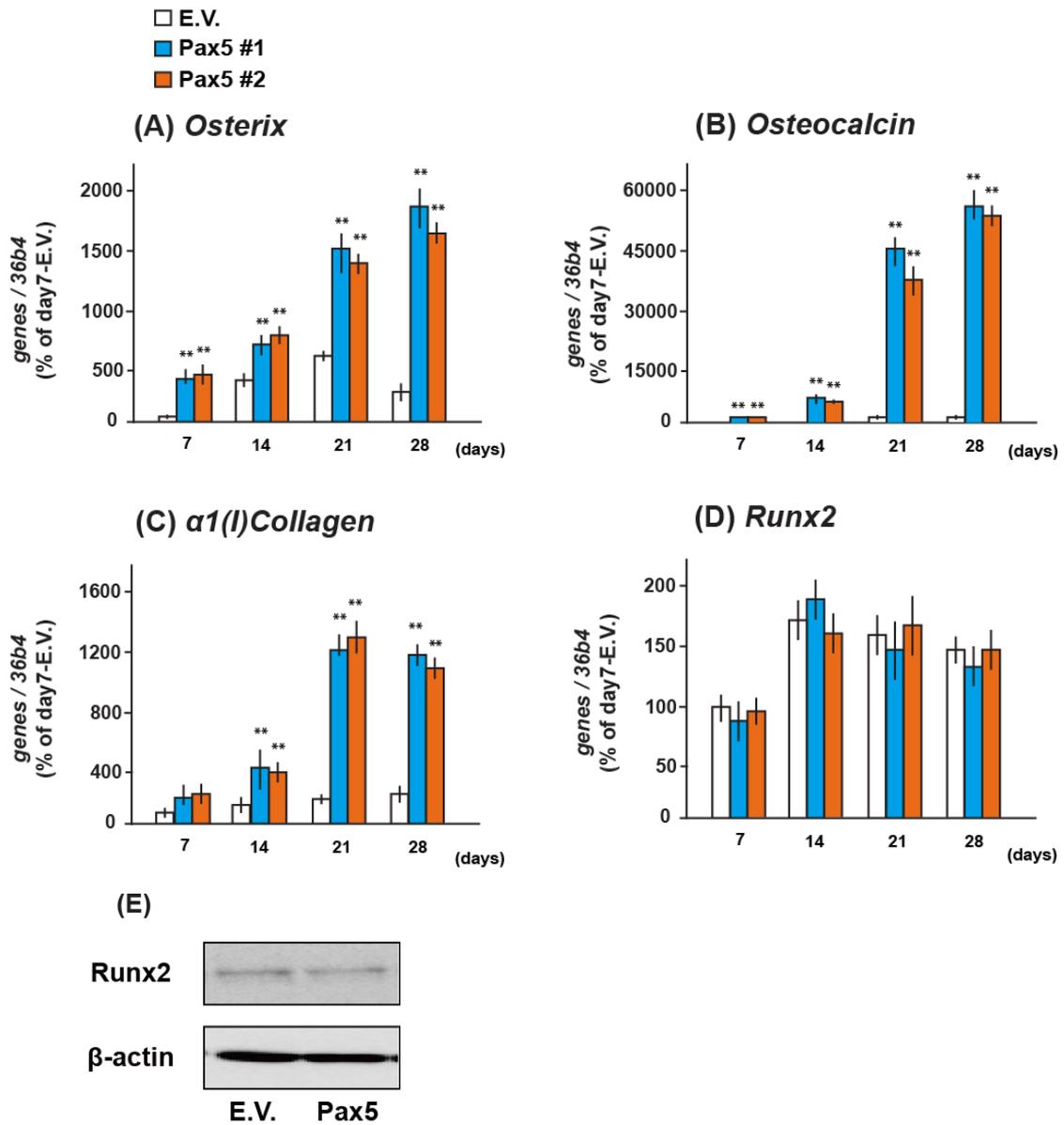


Fig.18. Effect of Pax5 overexpression on expression of osteoblastic marker genes in MC3T3-E1 cells.

## 5.4. 考察

本章では Pax5 を MC3T3-E1 細胞で過剰発現させることで、骨芽細胞分化成熟化にどのような影響が見られるかを解析した。その結果、明らかとなったことは Pax5 安定発現細胞株 MC3T3-E1 細胞では①骨芽細胞の分化が促進すること、②骨芽細胞分化マーカー遺伝子 *Osteocalcin*、 *$\alpha$ (I)Collagen*、転写制御因子 *Osterix* の mRNA 発現が著明に上昇すること、③*Runx2* の mRNA 発現及びタンパク質発現は変化しないことである。

第 3 章では siRNA により一過性の Pax5 遺伝子ノックダウンの影響を解析したが、今回は安定発現細胞株を作製することにより長期間にわたって骨芽細胞の分化成熟化に Pax5 過剰発現がどのような影響を与えるかを解析することができた。Pax5 ノックダウンの実験では培養 7 日目までといった短期間でしか骨芽細胞の分化過程を観察できなかったが、安定発現細胞株では培養最大 28 日間と骨芽細胞の後期分化過程までの実験系を用いることができた。そして、Pax5 ノックダウン時に見られた骨芽細胞分化抑制及び各種遺伝子発現の減少とは、逆の結果を過剰発現系の実験により概ね得ることができた。

以上、第 2、3、4、5 章の *in vitro* における実験結果を考え合わせると、Pax5 は骨芽細胞に機能的に発現しており、骨芽細胞分化成熟化を促進的に調節している可能性が考えられる。また、その直接的な要因としては、特に骨芽細胞分化マーカー遺伝子である *Osteocalcin*、転写因子である *Osterix* のプロモーターに Pax5 が直接結合することにより転写活性を正に制御していることだと考えられる。

## Chapter 6

# 骨芽細胞特異的 Pax5 トランスジェニックマウスの作製と骨表現型解析

## 6.1. 序文

3、4、5章において Pax5 が骨芽細胞の分化成熟化を促進的に調節することが、骨芽細胞を用いた *in vitro* における Pax5 ノックダウン解析、Pax5 の各種遺伝子へのプロモーター結合解析、Pax5 過剰発現細胞の解析により明らかとなった。そこで本章ではこの *in vitro* において得られた結果が生体レベルで見られるのかを検討するために骨芽細胞特異的 Pax5 トランスジェニックマウスを作製し、その骨表現型解析を *in vivo* での手法を用いて行った。

## 6.2. 方法

### 6.2.1. Pax5 トランスジェニック (Tg) マウスの作製

2.3 kb のマウス  $\alpha 1(I)Collagen$  プロモーターを含む Pax5 cDNA をコードするプラスミドベクターを作製し、C57BL/6J WT マウスに pronuclear injection 法を用いて導入し、骨芽細胞特異的 Pax5 トランスジェニックマウス(以下、Pax5 Tg マウス)を作製した。得られた雄性キメラマウスを雌性 C57BL/6J マウスと交配させることにより Pax5(+/+)(=Wild type)、Pax5(Tg/+)(=Hemi)各遺伝子型のマウスを得た。

作製されたマウスの遺伝子型は sense primer KZD71#1-cDNA-F2:TCCAGT CACAGCATAGTGTCTACAG 及び anti sense Primer KZD71#1-cDNA-R2:GTAGGGACTTCCAGAAAATTCCTC を用いた PCR 解析により決定した。得られたマウスは 3-4 週令の時点で雌雄を分けて離乳を行い、解剖日まで食餌及び水を自由に摂取できるように飼育した。また、取り扱う実験動物に関しては、日本薬理学会実験動物倫理規定を順守するとともに、

金沢大学動物実験施設において独自に制定された金沢大学宝町地区動物実験指針に則り実験計画を策定した。

## 6.2.2. RT-PCR 法

### 6.2.2.1. 逆転写反応

作製した Pax5(Tg/+)マウスを 8 週齢の時点で解剖し、脛骨、脳、白色脂肪、肝臓などの各種組織を摘出しこれら組織を ISOGEN 中に入れてホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。脛骨に関してはハンマーで破碎を行ってからホモジェナイズした。これにより組織から RNA を回収した。また、マウス頭蓋骨由来初代培養骨芽細胞及び、マウス骨髄由来初代培養破骨細胞の培養を行い、ISOGEN を用いて RNA を回収した。以降の実験は 2.2.1.2.1. に準じて行った。

### 6.2.2.2. PCR 法

逆転写反応により得られた complementary DNA (cDNA) はそのまま PCR 法に用いた。PCR 反応は、PCR 用チューブに 10×Buffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 100 mM Tris-HCl [pH 8.3] 緩衝液、Takara) 2.5 µL、2.5 mM dNTP mix 2 µL、cDNA 1 µL、10 µM の sense primer 及び antisense primer をそれぞれ 1 µL、5 unit/µL Recombinant Taq DNA ポリメラーゼ 0.125 µL 加えて総量 25 µL になるよう超純水を加えて PCR を行った。PCR 産物は 1.5% Agarose/TBE ゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにより染色し、UV で DNA を検出した。

### 6.2.3. カルセイン投与

骨を摘出する 4 日前から 48 時間の投与間隔で 2 回、カルセイン (2.5 mg/mL) を 200 µL/mouse 腹腔内投与し、骨標識を行った。

#### 6.2.4. 脊椎と脛骨切片の作製

生後 8 週令の時点で WT 及び Pax5 Tg マウスを解剖し、脊椎と脛骨を摘出し、10%ホルマリンで固定した後、70%エタノール、80%エタノール、95%エタノール、及び 100%エタノールで 2 回脱水し、浸潤溶液に 2 日間浸し Methyl Methacrylate Monomer (MMA) 樹脂で包埋した。マイクロトームを用いて厚さ 7  $\mu$ m の切片を作製し、スライドガラスに貼り付けた。これらの切片をプレスし 2 日間 50 度の恒温槽で、その後 2 日間室温に静置し乾燥させた後、染色に使用した。

#### 6.2.5. von Kossa 染色

1-Acetoxy-2-methoxyethane (AME) 中で作製した切片の MMA 樹脂を除去し、アルコール系列で水和後 (100%エタノールで 2 回、95%、80%、70%、蒸留水の順) 1% AgNO<sub>3</sub> 水溶液に 1 分間反応させた。スライドガラスを蒸留水で 1 回洗浄し、Sodaformol 水溶液に 1 分間反応させた。その後、蒸留水で 1 回洗浄し、5% sodium thiosulfate 水溶液に 1 分間浸けた。蒸留水で 1 回洗浄後、von Gieson 液に 1 分間反応させた。蒸留水で 2 回洗浄後、アルコール系列で脱水(70%エタノール、80%、95%、100%で 2 回)し、キシレンに置換して有機溶媒系封入剤エンテランニューを用いて封入した。

#### 6.2.6. Toluidine blue 染色

AME 中で作製した切片の MMA 樹脂を除去し、アルコール系列で水和後、0.01%トルイジンブルー溶液に 20 秒反応させた。蒸留水で洗浄後、アルコール系列で脱水しキシレンに置換してエンテランニューを用いて封入した。

#### 6.2.7. TRAP 染色

AME 中で作製した切片の MMA 樹脂を除去し、アルコール系列で水和後、37°Cで温めた 100 mL の Stock Basic Incubation Medium に 37°Cで 30 分浸した。30 分後、Naphthol AS-BI Phosphate Substrate を 1 mL 混ぜ、さらに 37°C

で 30 分浸した。Sodium Nitrite に Pararosaniline Dye を加えた液を常温の新しい Stock Basic Incubation Medium に混ぜ、切片を 60~90 分間反応させた。蒸留水で洗浄後、Carrazi's hematoxylin で 1 分間反応させ、再度蒸留水で洗浄し、50%グリセロール in TE で封入した。

## 6.2.8. 骨形態計測

Image J を用いて von Kossa 染色後の切片で単位骨量(組織全体の体積に占める骨梁全体の体積、Bone volume / Tissue volume : BV/TV)を計測した。Osteomeasure を用いて切片のカルセイン標識した 2 重ラベルの間隔から骨形成率(単位骨梁面あたりの骨形成速度、Bone formation rate / Bone surface : BFR/BS)を計測した。また、7  $\mu$ M の切片で破骨細胞面(骨梁表面全体における破骨細胞が付着している面の割合、Osteoclast surface / Bone surface : Oc.S/BS)、Toluidine blue 染色後の 4  $\mu$ M の切片で骨芽細胞数(単位骨梁周囲長当たりの骨芽細胞数、Osteoblast number / Bone perimeter : N.Ob/B.Pm)を計測した(方法は Kajimura D et al., 2011、Parfitt AM et al., 1987 に準じている)。

## 6.2.9. TRAP 染色

所定の日数培養した細胞を PBS で洗浄した後、細胞を固定するために 4% paraformaldehyde で 10 分間、室温に静置した。固定液を除去後、PBS で洗浄し EtOH : acetone = 1 : 1 の液に浸した後、溶液を除去し完全に風乾した。用時調製した TRAP 染色溶液 (50 mM Acetate buffer [pH 5.0], 0.22 mM Naphthol AS-MX phosphate, 1.33 mM Fast red violet LBsalt, 0.11 M N,N-dimethyl formamide) を添加し、37 °C で 5~10 分反応させた。染色され十分に赤紫色になったら、TRAP 染色液を除去し超純水で洗い PBS に置換後、顕微鏡下で観察した。

## 6.3. 結果

### 6.3.1. 骨芽細胞特異的 Pax5 Tg マウスの作製

6.2.1.の方法で得た Pax5 Tg マウスのうち同腹で生まれた WT と#10 及び#18 のマウスから DNA を回収し Southern blotting を行い、Pax5 トランスジェニックマウスが正しく創出できているかの確認を行った。その結果、WT と比較して#10、#18 のマウスにおいて transgene の位置で強いシグナルが観察され、更に endogenous の位置においても強いシグナルが観察された(Fig.19(B).)。更に、6.2.2.の方法で Pax5 トランスジェニックマウスの脛骨、脳、脂肪、肝臓といった組織から RNA を回収し Pax5 transgene の発現を解析した。また Pax5 トランスジェニックマウス由来初代培養骨芽細胞及び、初代培養破骨細胞においても RNA を回収し Pax5 transgene の発現を解析した。その結果、脛骨組織、及び初代培養骨芽細胞においてのみ transgene のシグナルが観察された(Fig.19(C).)。しかしながら初代培養破骨細胞、脳、脂肪、肝臓においては transgene のシグナルは観察されなかった(Fig.19(C).)。このことから骨芽細胞特異的 Pax5 トランスジェニックマウスは正しく創出できていることが確認できた。

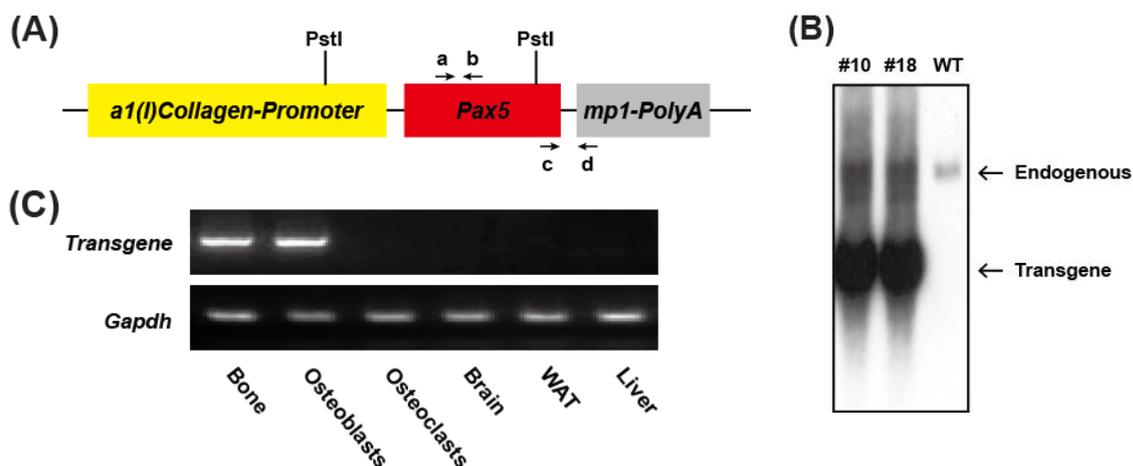


Fig.19. Generation of Pax5 transgenic mice.

### 6.3.2. Pax5 Tg マウスの骨表現型解析

Pax5 が生体レベルで骨組織において何らかの働きを行っているかを解析する

目的で、8週齢の雄性 WT と Pax5 Tg マウスの表現型解析を行った。外観においては特に WT と Pax5 Tg マウスに明らかな差は認められなかった(data not shown)。また解剖時に体重と体長の測定を行ったが WT と Pax5 Tg マウスに明らかな差は認められなかった(data not shown)。続いて脊椎を摘出し 6.2.4.の方法により骨切片を作製することにより、骨表現型の解析を行った。作製した切片を 6.2.5.の方法により von Kossa 染色で石灰化部位を黒色に染色し骨量(BV/TV)測定を行った。その結果、WT マウスに比べ Pax5 Tg マウスでは von Kossa 染色により黒色で染まる脊椎組織内カルシウム沈着部位の明らかな増加が観察された(Fig.20(A).)。脊椎骨量を測定したところ WT マウスに比べ Pax5 Tg マウスでは BV/TV の有意な上昇が認められた(Fig.20(B).)。また同様に WT と Pax5 Tg マウスの脛骨を摘出し、切片を作製し von Kossa 染色で石灰化部位を黒色に染色し骨量(BV/TV)測定を行った。その結果、von Kossa 染色により黒色で染まる脛骨組織内カルシウム沈着部位の明らかな増加が観察された(Fig.20(C).)。また脛骨骨量を測定した結果、脊椎と同様で、WT マウスに比べ Pax5 Tg マウスでは BV/TV の有意な上昇が認められた(Fig.20(D).)。

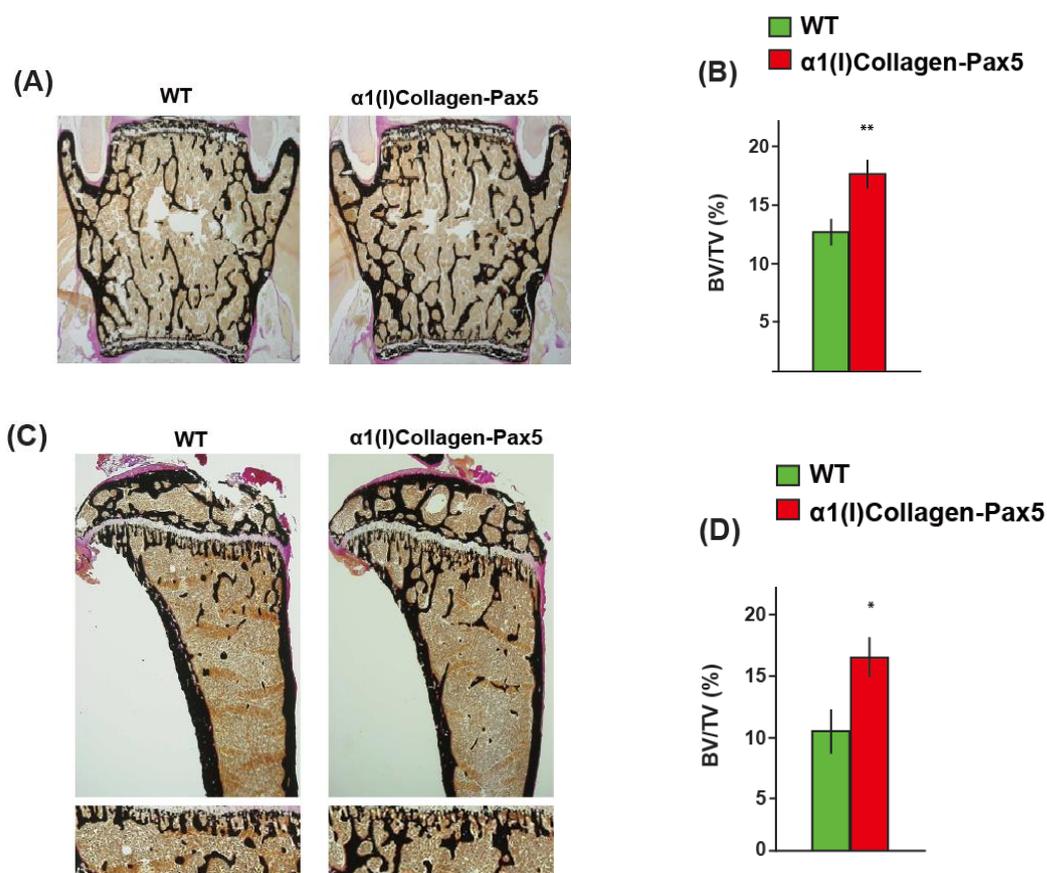


Fig.20. Bone phenotype of Pax5 transgenic mice.

### 6.3.3. Pax5 Tg マウスの骨形態計測

更に詳細な骨表現型の解析を行うために骨形態計測を行った。脊椎切片を6.2.6.の方法で toluidine blue 染色し、骨形成の指標として BFR 及び N.ob/B.Pm を測定した。その結果 WT に比べ Pax5 Tg マウスにおいて、BFR と N.ob/B.Pm の有意な上昇が認められた(Fig.21(B),(C).)。BFR が有意に上昇したという結果は、カルセインで2重標識した新生骨の間隔が WT に比べ Pax5 Tg マウスにおいて広がっているということからも観察できる(Fig.21(A).)。また脊椎切片を6.2.7.の方法で TRAP 染色し、骨吸収の指標として Oc.S/BS を測定した。その結果、WT に比べ Pax5 Tg マウスにおいて、Oc.S/BS の有意な上昇が認められた(Fig.21(D).)。

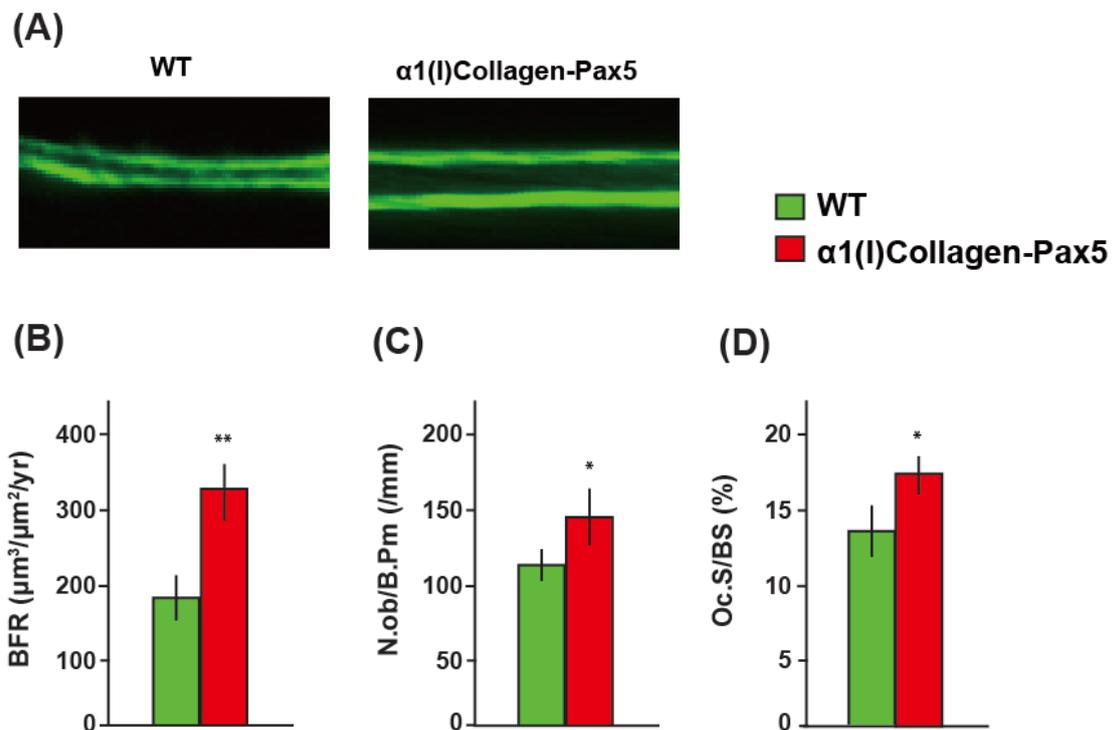


Fig.21. Bone histomorphometric analysis of Pax5 transgenic mice.

## 6.4. 考察

本章で得られた結果としては WT マウスと比較して Pax5 Tg マウスでは①脊椎及び脛骨における骨量の増加(BV/TV の増加)が見られたこと、②脊椎における骨形態計測の結果骨形成パラメーター(BFR、N.Ob/B.Pm)の上昇が見られたこと、③骨形成パラメーター(Oc.S/BS)の上昇が見られたことである。これらの *in vivo* における実験結果から、Pax5 は定常状態のマウスにおいて骨形成及び骨リモデリングを促進する可能性が示唆された。

第 5 章までの *in vitro* の実験結果と今章の *in vivo* の実験結果である Pax5 Tg マウス骨量上昇及び骨形成パラメーター上昇は整合性が取れた結果となった。また、骨形態計測の結果から Pax5 Tg マウスにおいて骨吸収パラメーターの上昇が認められた。この結果は Pax5 Tg マウス由来骨芽細胞と WT 由来の破骨細胞の共培養系の実験において TRAP 陽性の破骨細胞数が著明に増加したという結果から説明できる(data not shown)。

破骨細胞は、CFU-GM を前駆細胞とする、CD11b 抗原タンパク質を特異的に細胞膜上に発現する単球マクロファージ系の造血幹細胞から分化する(Udagawa N et al., 1990)。その分化には M-CSF、RANKL といった種々の因子が関与する。破骨細胞の前駆細胞は、骨芽細胞等によって生成される RANKL の刺激によって骨吸収能を有する多核の成熟破骨細胞に分化する(Yasuda H et al., 1998)。成熟した破骨細胞は骨表面に貼り付き、タンパク質分解酵素である Cathepsin K や MMP-9、プロトン(H<sup>+</sup>)を細胞外に分泌し、骨の無機質であるヒドロキシアパタイトや、骨の有機成分であるコラーゲンを分解し骨吸収を行う。RANKL とそのレセプターである RANK の機能を阻害すると破骨細胞の形成が阻害されることから、RANK signaling は破骨細胞分化に必要不可欠であると考えられる(Nakagawa N et al., 1998、Kong YY et al.,1999)。また RANK signaling 以外の経路である OSCAR signaling 経路や M-CSF signaling 経路が抑制あるいは欠損しても破骨細胞の形成は抑制されてしまうことから、破骨細胞分化にはこれらのシグナルが協調的に働くことが重要であると考えられる(Kim N et al., 2004、Koga T et al., 2004、Wiktor-Jedrzejczak W et al., 1990)。

共培養系の実験結果として考えられることは、Pax5 Tg 骨芽細胞において破骨細胞の分化を促進する分子の発現が上昇したからだと推察できる。しかしながら、破骨細胞分化成熟に非常に重要であると知られている分子の *Rankl* と *Opg* の mRNA 発現は Pax5 Tg マウスにおいては変化が認められなかった(data not shown)。このことから、今回検討していないが、RANKL/RANK 経路以外の別の破骨細胞活性化機構により TRAP 陽性多核細胞数の上昇が見られた可能性が

考えられる。実際、破骨細胞内シグナル伝達機構の解明により RANKL/RANK シグナル経路を介さない破骨細胞の活性化機構として新たに TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  及び IL-1 等の存在が明らかとなってきたので、これらの因子が Pax5 Tg 骨芽細胞において発現変動しているという可能性も考えられる (Matsuo K. 2012、Hayashi M et al., 2012、Kobayashi K et al., 2000、Kim JH et al., 2008、Itonaga I et al., 2004)。今後、破骨細胞分化の活性化に関してはより詳細な機構を明らかにする必要はあるが、Pax5 Tg マウス由来骨芽細胞は、RANKL/RANK 経路とは非依存的な別の経路で破骨細胞分化を正に制御しているということが重要な結果だと考えられる。また、今回骨形成パラメーター及び骨吸収パラメーターの両方が上昇しており高骨代謝回転状態になっているが、それにも関わらず骨量の上昇が認められた。その原因として、明確なことは現在の時点では言えないが、骨形成と骨吸収のバランスが骨形成の方に傾いているので骨形成優位となり骨量増加に繋がったと推察することができる。しかしながらそれを裏付ける根拠はないので今後の解析に期待される。

以上をまとめると、Pax5 は生体内において骨形成及び骨リモデリングを促進する可能性が示唆された。

## Chapter 7

# 骨粗鬆症モデル処置を行った Pax5 トランスジェニックマウスの骨表現型解析

## 7.1. 序文

6章において Pax5 Tg マウスは骨量が増加し、また骨形態計測の結果から骨形成パラメーター及び骨吸収パラメーターが WT マウスと比較して増加していることが判明した。本章では、続いて閉経後骨粗鬆症のモデルマウスとして用いられる卵巣摘出处置マウスを Pax5 Tg マウスを用いて作製することにより、骨粗鬆症病態時に Pax5 が骨代謝にどのような影響を与えるのかを明らかにすることとした。その為に6章と同様な *in vivo* 解析を行った。

## 7.2. 方法

### 7.2.1. 卵巣摘出術(OVX)

6.2.1.と同様な手法で得た8週齢の C57BL/6J 系統の WT 及び Pax5 Tg 雌性マウスを、ペントバルビタール麻酔下で腹部を切開し両側の卵巣を輸卵管ごと摘出し切除したものを卵巣摘出(OVX)群、腹部を切開し縫合したものを偽手術(Sham)群とした。手術後においても通常の固形飼料と水道水を自由に摂取させた。手術日を0日目とし、手術後4週間(28日間)後に脊椎を摘出した(Fig.24.)。また、卵巣を摘出し組織重量を測定した。更に脛骨を摘出し、脛骨から RNA を回収した。取り扱う実験動物に関しては、日本薬理学会実験動物倫理規定を順守するとともに、金沢大学動物実験施設において独自に制定された金沢大学宝町地区動物実験指針に則り実験計画を策定した(方法は Yamamoto T et al., 2012 に準じている)。

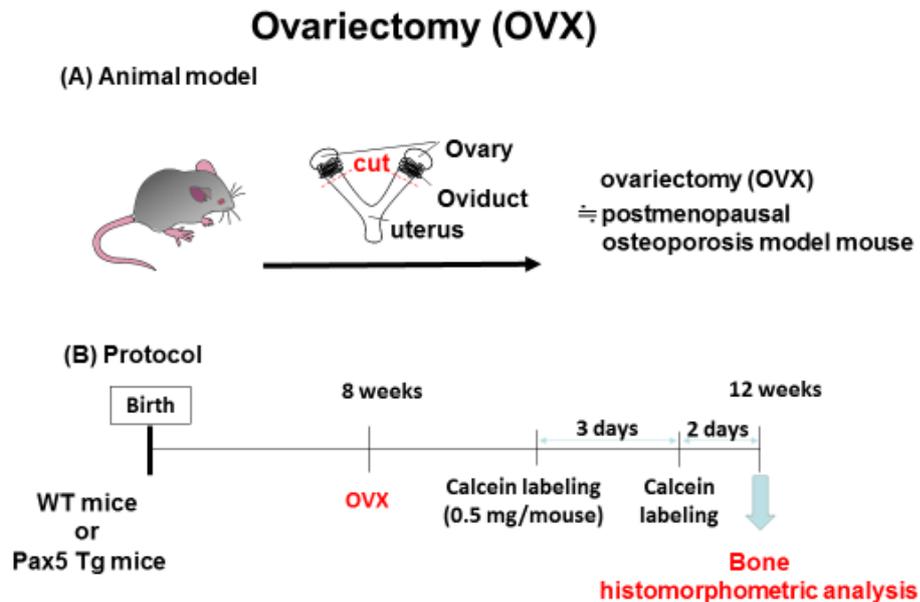


Fig.22. Procedure and protocol for ovariectomy (OVX)

## 7.2.2. 17β-エストロジオール投与

Corn oil に溶解した 17β-エストロジオールを OVX 処置後、1 週間に 1 回 5 μg/kg の容量でマウスに腹腔内投与した。

## 7.2.3. カルセイン投与

6.2.3.の方法に準じて行った。

## 7.2.4. 脊椎切片の作製

6.2.4.の方法に準じて行った。

## 7.2.5. von Kossa 染色

6.2.5.の方法に準じて行った。

## **7.2.6. Toluidine blue 染色**

6.2.6.の方法に準じて行った。

## **7.2.7. TRAP 染色**

6.2.7.の方法に準じて行った。

## **7.2.8. 骨形態計測**

6.2.8.の方法に準じて行った。

## **7.2.9. Real-time quantitative RT-PCR 法**

### **7.2.9.1. 逆転写反応**

回収した脛骨をハンマーで破碎し、破碎した骨を ISOGEN 中に入れてホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。以降の実験は 2.2.1.2.1.に準じて行った。

### **7.2.9.2. Real-time PCR 法**

2.2.1.2.2.の方法に準じて行った。

## 7.3. 結果

### 7.3.1. 子宮重量の測定

卵巣摘出術が成功しているかを確認する目的で、マウスの子宮重量を測定した。その結果、WT と Pax5 Tg マウスいずれにおいても Sham 群と比べて OVX 群では子宮重量の有意な減少が認められた(Fig.23.)。この結果から、OVX は正しく成功していることが確認できた。

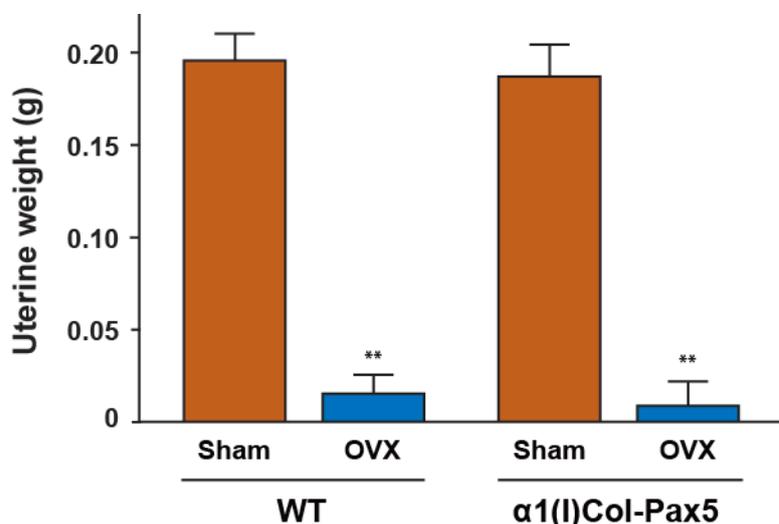


Fig.23. Uterine weight after OVX.

### 7.3.2. 脛骨組織における Pax5 発現変動解析

OVX 処置時における骨組織内での Pax5 の発現量に変化があるかを調べるため、7.2.9.の方法で Pax5 mRNA 発現量を Real-time PCR 法を用いて解析した。その結果、WT-Sham 処置マウス群と比べて WT-OVX 処置マウス群では脛骨組織での Pax5 に有意な変化は認められなかった(Fig.24(A.))。また、生体内における女性ホルモン量の変化が Pax5 の発現量に影響を与えるかを調べるため、17 $\beta$ -estradiol 溶液を WT-sham マウス及び WT-OVX マウスに 1 週間に 1 回投与し、同様な方法で Pax5 mRNA 発現量の解析を行った。Control としては WT-Sham マウス及び WT-OVX マウスに 17 $\beta$ -estradiol 溶液の溶媒である Corn oil を投与したマウスを用いた。その結果、Corn oil を投与した群と比較して、

17 $\beta$ -estradiol 投与群では Sham マウス及び OVX マウスいずれの群においても Pax5 発現量に変化は認められなかった(Fig.24(B).).

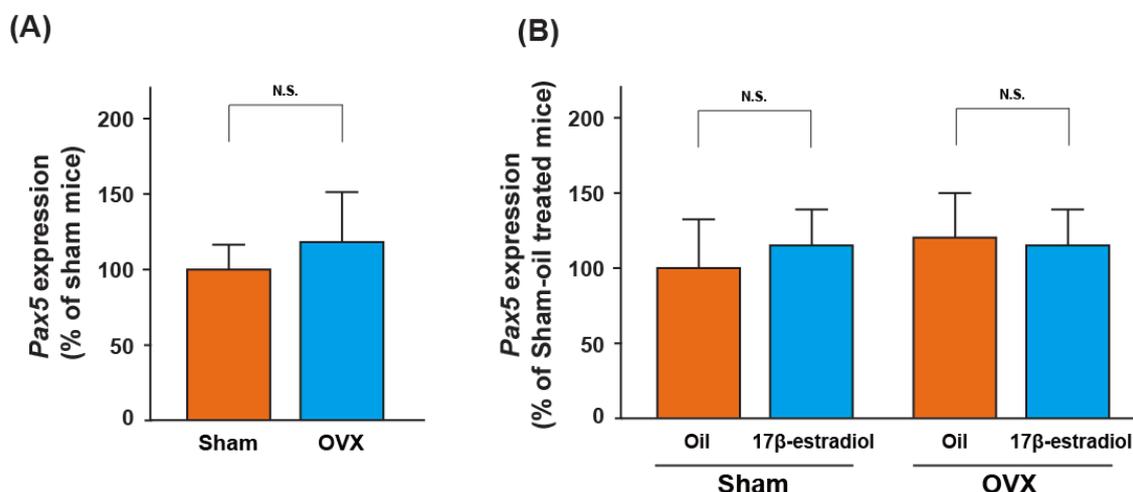


Fig.24. Effect of OVX on Pax5 expression.

### 7.3.3. OVX 処置を行った Pax5 Tg マウスの骨表現型解析

骨粗鬆症病態時に Pax5 が骨代謝に与える影響を調べるため、WT 及び Pax5 Tg マウスに OVX を施し、骨粗鬆症病態が認められる術後 4 週間後のマウスから脊椎を摘出し 7.2.4.の方法により骨切片を作製することにより、骨表現型の解析を行った。作製した切片を 6 章と同様に von Kossa 染色で石灰化部位を黒色に染色し骨量(BV/TV)測定を行った。その結果、WT マウスにおいて、Sham 処置群と比べ、OVX 処置群では脊椎内の黒色染色部位の著明な減少が観察された。一方、Pax5 Tg マウスにおいて、Sham 処置群と比べ、OVX 処置群では脊椎内の黒色染色部位の減少は特に観察されなかった(Fig.25(A).).

続いて、この染色した切片を用いて BV/TV の測定を行った。まず、WT マウスと Pax5 Tg マウスの Sham 処置群においては、WT マウスに比べ Pax5 Tg マウスでは BV/TV の有意な上昇が認められた。また WT マウスにおいては Sham 処置群に比べ、OVX 処置群の BV/TV の有意な減少が認められたが、Pax5 Tg マウスにおいては Sham 処置群と OVX 処置群では BV/TV に有意な変化は認められなかった(Fig.25(B).).

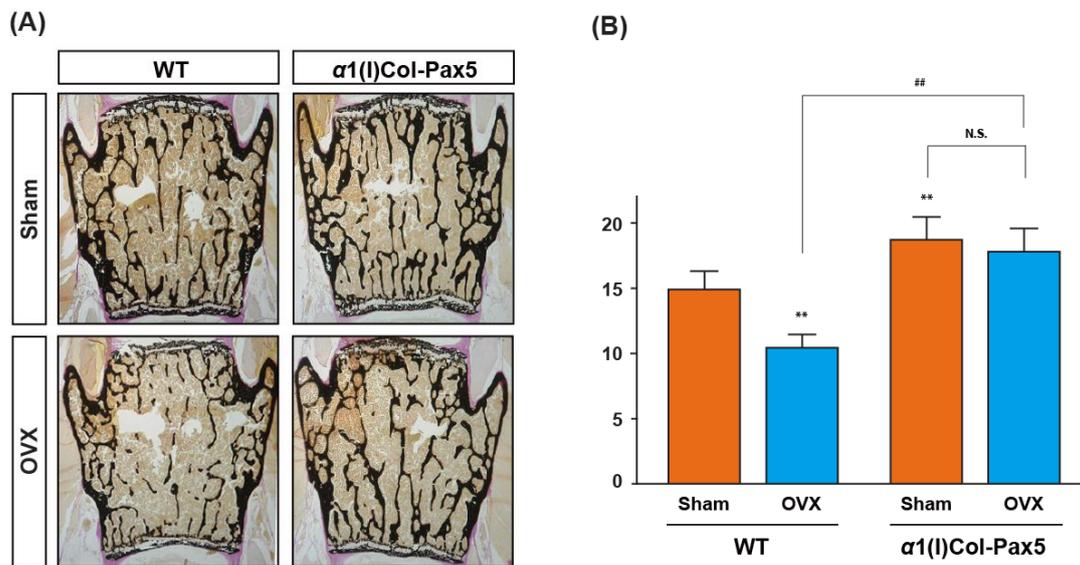


Fig.25. Effect of Pax5 transgenic on OVX-induced bone loss.

#### 7.3.4. OVX 処置を行った Pax5 Tg マウスの骨形態計測

骨粗鬆症様病態時に骨代謝を担う骨芽細胞、もしくは破骨細胞にどのような変化が起きているかを調べるため、骨形態計測を行い更に詳細な骨表現型の解析を行った。6章と同様な手法で骨形成パラメーターと骨吸収パラメーターの測定を行った。その結果、骨形成パラメーターである N.Ob/B.Pm 及び BFR に関して、WT 及び Pax5 Tg マウスにおいて Sham 処置群同士、あるいは OVX 処置群同士を比較すると、どちらの骨形成パラメーターも、WT と比較して Pax5 Tg マウスにおいて有意な上昇が認められた。しかしながら WT マウスあるいは Pax5 Tg マウスのどちらのマウスにおいても Sham 処置群と OVX 処置群を比較してもこれらのパラメーターに有意な変化は認められなかった (Fig.26(A),(B).)。続いて骨吸収パラメーターである Oc.S/BS 及び破骨細胞数 (N.Oc/B.Pm) に関して、Sham 処置群においては、WT マウスと比べて Pax5 Tg マウスでは有意な上昇が認められたが、OVX 処置群においては WT マウスと比べて Pax5 Tg マウスでは有意な変化は認められなかった。また、これら骨吸収パラメーターは、WT マウスにおいて Sham 処置群と比較すると OVX 処置群では有意な上昇が認められたが、Pax5 Tg マウスにおいては Sham 処置群と比較すると OVX 処置群では有意な変化は認められなかった (Fig.26(C),(D).)。

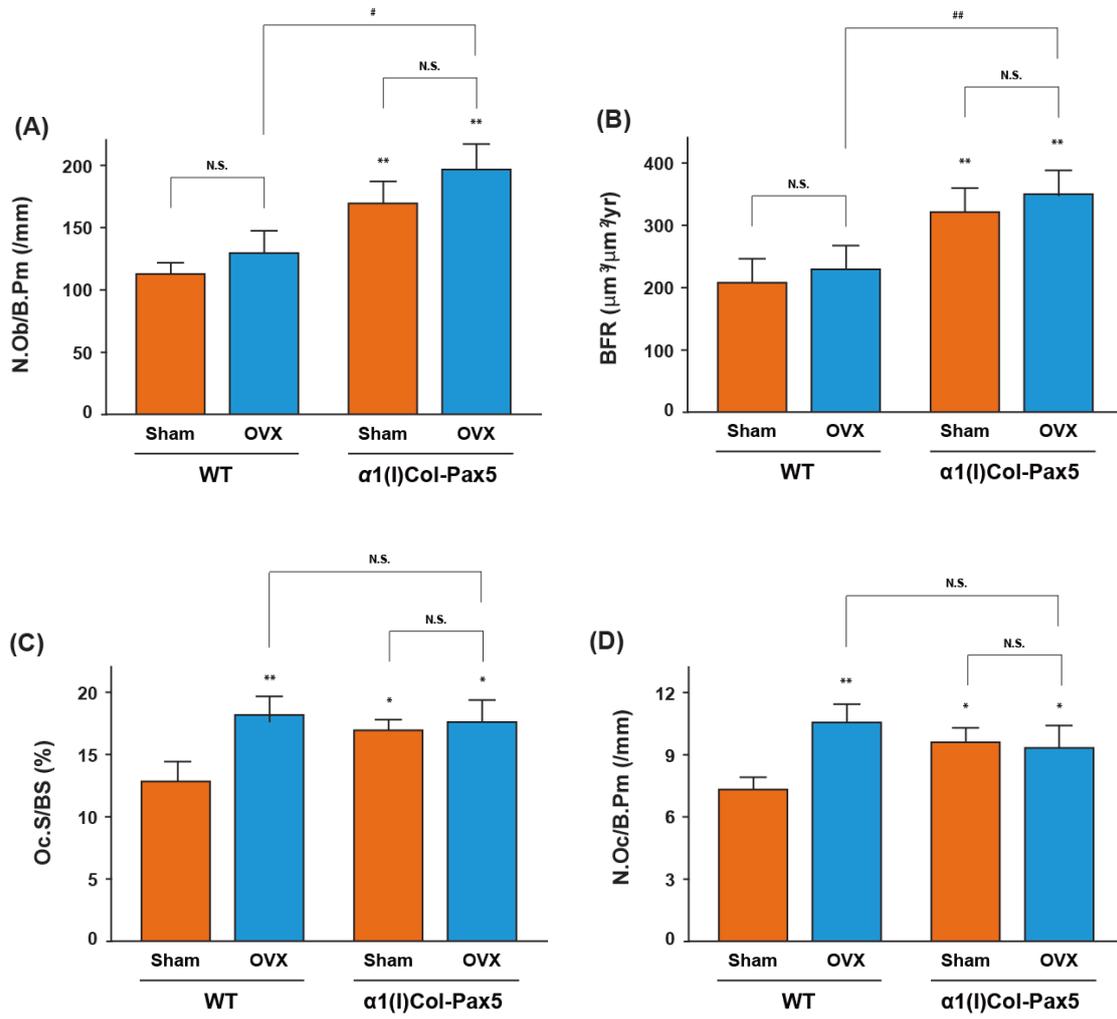


Fig.26. Effect of Pax5 transgenic on histomorphometric analysis of OVX mice.

## 7.4. 考察

本章で得られた結果は①OVX 処置によっては骨組織において Pax5 の mRNA 発現量に変化は認められないこと、②女性ホルモン(17 $\beta$ -estradiol)投与によっては Pax5 の mRNA 発現量に変化は認められないこと、③Pax5 Tg マウスにおいては、WT マウスで認められた OVX 処置による骨量の減少は認められないこと、④WT マウス、Pax5 Tg マウスにおいて OVX 処置では骨形成パラメーター(BFR、N.Ob/B.Pm)に変化は認められないこと、⑤Pax5 Tg マウスにおいては、WT マウスで認められた OVX 処置による破骨細胞パラメーター(Oc.S/BS、N.Oc/B.Pm)の上昇が認められないことである。

今回の実験に用いた OVX モデルは閉経後骨粗鬆症の原因が閉経によるエストロゲン欠乏であることに基づいて考案された動物モデルであり(Miller SC et al., 1991)、破骨細胞の活性化により骨吸収が亢進しているが、破骨細胞が活性化するには TRAP、Cathepsin K など破骨細胞特異的な様々なタンパク質の発現が上昇することが知られている。

今回、Pax5 Tg マウスにおいて OVX 処置による骨量の減少は起こらなかったが、この原因として、WT マウスにおいては OVX 処置により骨吸収パラメーターである Oc.S/BS、N.Oc/B.Pm が上昇したが、Pax5 Tg マウスでは OVX によるこの Oc.S/BS、N.Oc/B.Pm の上昇が認められなかったことによる可能性がまず考えられる。骨吸収パラメーターが Pax5 Tg マウスに OVX 処置を行っても上昇しなかった原因に関しては詳細な検討を行っていないので明らかではない。既に知られていることとして、エストロゲンは骨芽細胞の RANKL 発現を負に調節しているので間接的に破骨細胞分化成熟化を負に調節していることや、TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 などの破骨細胞活性化を惹起するサイトカインの発現を負に制御していることから、エストロゲンが欠乏することによりこの破骨細胞分化成熟に対する負の制御が外れてしまい骨粗鬆症が起こる。これらの反応が Pax5 Tg 骨芽細胞においては何らかの機構により起こらないために破骨細胞パラメーターの上昇が起こらなかったのかもしれないが、詳細な原因に関しては今後の解析に期待したい。また、OVX 誘導性の骨量減少が Pax5 Tg マウスで起こらなかった原因として他に考えられることとして、Pax5 Tg マウスは OVX 未処置の定常状態でも常に骨形成パラメーター及び骨吸収パラメーターは WT マウスと比べて高いので、OVX による骨粗鬆症病態の影響を受けづらかった可能性も考えられる。本章において重要な点は、骨芽細胞における Pax5 の発現上昇により骨粗鬆症病態を防ぐことを今回初めて明らかにできたことである。このことから、Pax5 は骨粗鬆症病態の創薬ターゲットとして期待が持てる。

## Chapter 8 終わりに

本研究結果より、転写制御因子 Pax5 は骨芽細胞に機能的に発現しており、Runx2 非依存的な経路で、骨形成と骨リモデリングにおいて骨芽細胞分化・骨芽細胞成熟化を促進的に調節することが明らかとなった。

Pax5 以外に第 2 章で Pax3、Pax9 の発現が初代培養骨芽細胞で認められたが、Pax9 について言及すると、既報として Pax9 全身欠損マウスは歯の欠損が認められることから、Pax9 も骨芽細胞において重要な働きをするのではないかと考えられた。しかしながら、Pax5 に関して行った転写活性や mRNA 発現の実験に関して同様な解析を Pax3、Pax9 に関して行った結果、Osteocalcin、Osterix、Runx2 の転写活性や mRNA 発現に関して Pax3、Pax9 はいずれも影響を及ぼさなかった(data not shown)。従って、Pax5 は Pax ファミリーの中で骨芽細胞に唯一、機能的に発現している転写因子であることが分かった。

また、卵巣摘出術を行った Pax5 Tg マウスの骨表現型から、骨芽細胞特異的な Pax5 の発現上昇は、病態時にも骨関連細胞において何らかの働きを行い、骨粗鬆症における骨量減少を抑制することが判明した。現在、骨粗鬆症治療において骨形成促進剤と骨吸収抑制剤の 2 種類の治療薬が存在し、骨吸収抑制剤としてはビスフォスフォネート製剤、エストロゲン製剤、カルシトニン製剤など複数の作用機序を持つ薬剤が使用されている。しかしながら、骨形成促進剤としては副甲状腺ホルモン(PTH)製剤のたった 1 種類しか現在用いられていないのが現状である(Canalis E et al., 2007)。

骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである Runx2 をターゲットとした薬剤すら、骨形成促進剤としては現時点で存在しないという現状を考えると、骨芽細胞において骨形成を制御する Runx2 以外の別の因子を発見することが、将来骨形成促進剤の開発に役立つかもしれない。この観点から、骨芽細胞分化を Runx2 非依存的に促進的に調節する可能性が今回の研究結果から示唆された Pax5 は、今後もしかしたら骨粗鬆症治療薬開発においてターゲット分子と成り得ると考えられる。しかしながら、骨芽細胞において、Pax5 の発現自体を制御している因子やシグナルに関しては今回の検討では行っておらず、またそのような報告も全くないのが現状であるので、その点を明らかにしていくことが今後期待される。今回の研究結果が、骨粗鬆症、あるいは骨芽細胞の異常分化や成熟と関連している様々な代謝性骨疾患の新規治療の礎となり、新たな展望をもたらすことを期待したい。

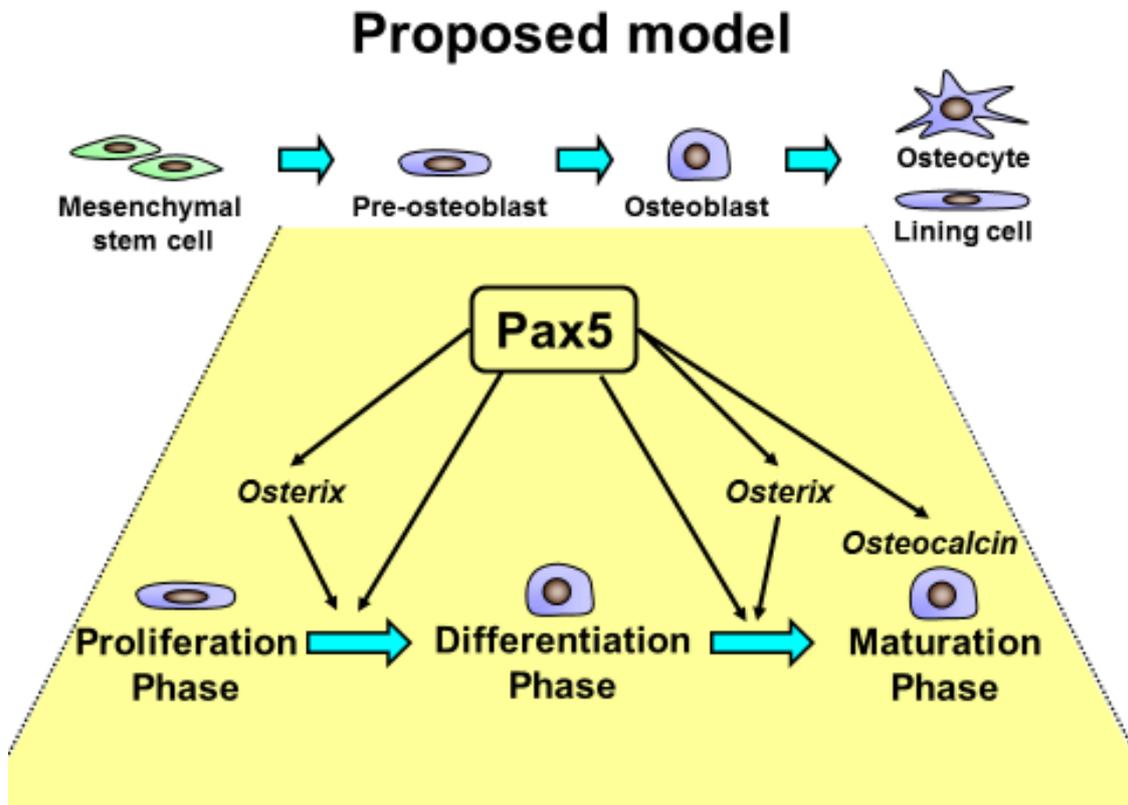


Fig.27. Proposed model of this study.

## Chapter 9 結語

1. マウス初代培養骨芽細胞において、Pax ファミリーのうち *Pax3*、*Pax5*、*Pax9* の mRNA 発現が認められる。またマウス骨組織において *Pax5* のタンパク質発現が認められる。
2. *Pax5* は直接的に *Osteocalcin* と *Osterix* のプロモーターに結合し、*Runx2* 非依存的に、骨芽細胞の分化・成熟化を正に制御する。
3. 骨芽細胞特異的 *Pax5* トランスジェニックマウスでは骨量が増加と、骨形成パラメーターの上昇が認められる。
4. OVX 処置を行った *Pax5* Tg マウスでは OVX 誘導性の骨粗鬆症発症に抵抗性を示す。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を遂行する上で終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、金沢大学大学院自然科学研究科、米田幸雄教授、檜井栄一准教授、宝田剛志助教に厚くお礼申し上げます。

また、学部4年時配属から修士課程を経て博士後期課程3年時までの計6年間、多大なる御協力と御援助を頂きました金沢大学薬物学研究室の先輩・同期・後輩の皆様、秘書の荒木様、そしていつも励ましてくれた家族に深く感謝いたします。

## 引用文献

- Aubin, J. E., Turksen, K. and Heersche, J. N. M. (1993). Osteoblastic cell lineage. In Cellular and Molecular Biology of Bone (ed. M. Noda) 1-45.
- Balczarek KA, Lai ZC, Kumar S. (1997). Evolution of functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. Mol Biol Evol 14(8):829-42.
- Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. (2007). Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. N. Engl. J. Med 357(9):905–916.
- Center JR, Nguyen TV, Schneider D, Sambrook PN, Eisman JA. (1999). Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. Lancet 353(9156):878–882 .
- Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. Nat Immunol 8(5):463-70.
- Dacquin R, Starbuck M, Schinke T, Karsenty G. (2002). Mouse alpha 1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast. Dev Dyn 224(2):245-51.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.* (1997). Cell 89(5): 747-54.
- Eberhard D, Jimenez G, Heavey B, Busslinger M. (2000). Transcriptional repression by Pax5 (BSAP) through interaction with corepressors of the Groucho family. EMBO J 19(10):2292-303.
- Emelyanov AV, Kovac CR, Sepulveda MA, Birshtein BK. (2002). The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells. J Biol Chem 277(13):11156-64.
- Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. (2011). Annu Rev

Pathol 6:121-45.

Fitzsimmons D, Hodsdon W, Wheat W, Maira SM, Wasylyk B, Hagman J. (1996). Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter. Genes Dev 10(17):2198-211.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. Cell Tissue Kinet 20(3):263-272.

Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M.(1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. J Biol Chem 274(11): 6972-8.

Harada S, Rodan GA. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. Nature 423(6937):349-55.

Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A, Takayanagi H. (2012). Osteoprotection by semaphoring 3A. Nature 485(7396):69-74.

He T, Hong SY, Huang L, Xue W, Yu Z, Kwon H, Kirk M, Ding SJ, Su K, Zhang Z. Histone acetyltransferase p300 acetylates Pax5 and strongly enhances Pax5-mediated transcriptional activity. J Biol Chem 286(16):14137-45.

Hinoi E, Fujimori S, Wang L, Hojo H, Uno K, Yoneda Y. (2006). Nrf2 negatively regulates osteoblast differentiation via interfering with Runx2-dependent transcriptional activation. J Biol Chem 281(26):18015-24.

Horowitz MC, Xi Y, Pflugh DL, Hesslein DG, Schatz DG, Lorenzo JA, Bothwell AL. (2004). Pax5-deficient mice exhibit early onset osteopenia with increased osteoclast progenitors. J Immunol 173(11):6583-91.

Itonaga I, Sabokbar A, Sun SG, Kudo O, Danks L, Ferguson D, Fujikawa Y, Athanasou NA. (2004). Transforming growth factor-beta induces osteoclast

formation in the absence of RANKL. Bone 34(1):57-64.

Kajimura D, Hinoi E, Ferron M, Kode A, Riley JK, Zhou B, Guo XE, Karsenty G. (2011). Genetic determination of the cellular basis of the sympathetic regulation of bone mass accrual. J Exp Med 208(4):841-51.

Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. (2009). Genetic control of bone formation. Annu Rev Cell Dev Biol 25:629-48.

Kim JH, Jin HM, Kim K, Song I, Youn BU, Matsuo K, Kim N. (2009). The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. J Immunol 183(3):1862-70.

Kim N, Takami M, Rho J, Josien R, Choi Y. (2002). A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. J Exp Med 195(2):201-209.

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin TJ, Suda T. (2000). Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. J Exp Med 191(2):275-86.

Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Onishi H, Matozaki T, Kodama T, Tniguchi T, Takayanagi H, Takai T. (2004). Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. Nature 428(6984):758-763.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell 89(5):755-64.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliverira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR,

Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 397(6717):315-323.

Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. (2007). PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. Biochem Pharmacol 73(1):1-14.

Libermann TA, Pan Z, Akbarali Y, Hetherington CJ, Boltax J, Yergeau DA, Zhang DE. (1999). AML1 (CBFalpha2) cooperates with B cell specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell specific BLK gene promoter. J Biol Chem 274(35):24671-6.

Lu X, Gilbert L, He X, Rubin J, Nanes MS. (2006). Transcriptional regulation of the osterix (Osx, Sp7) promoter by tumor necrosis factor identifies disparate effects of mitogen-activated protein kinase and NF kappa B pathways. J Biol Chem 281(10):6297-306.

Mansouri A, Stoykova A, Torres M, Gruss P. (1996). Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7<sup>-/-</sup> mutant mice. Development 122(3):831-8.

Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T. (2008). BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. J Biol Chem 284(43):29119-25.

Matsuo K. (2010). Eph and ephrin interactions in bone. Adv Exp Med Biol 658:95-103.

Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, Busslinger M. (2011). Pax5 a master regulator of B cell development and leukemogenesis. Adv Immunol 111:179-206.

Miller SC, Bowman BM, Miller MA, Bagi CM. (1991). Calcium absorption and osseous organ-, tissue-, and envelope-specific changes following ovariectomy in rats. Bone 12(6):439-446.

Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K,

Morinaga T, Higashio K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun 253(2):395-400.

Nakamura Y, Hinoi E, Takarada T, Takahata Y, Yamamoto T, Fujita H, Takada S, Hashizume S, Yoneda Y. (2011). Positive regulation by GABBR1 subunit of leptin expression through gene transactivation in adipocytes. PLoS One 6(5):e20167.

Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell 108(1):17-29.

Nutt SL, Heavey B, Rolink AG, Busslinger M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. Nature 401(6753):556-62.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. Cell 89(5):765-71.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res 2(6):595-610.

Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. Genes Dev 12(17):2735-47.

Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. (2011). Osteoporosis: now and the future. Lancet 377(9773):1276-1287.

Shrivats AR, Hsu E, Averick S, Klimak M, Watt AC, Demaiom, Matyjaszewski K, Hollinger JO. (2014). Cationic nanogel-mediated runx2 and osterix siRNA delivery decreases mineralization in MC3T3 cells. Clin Orthop Relat Res DOI 10.1007/s11999-014-4073-0.

Suda T, Yoshiki S. (1991). Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. J Cell Biol 113(3):681–687.

Takahata Y, Takarada T, Hinoi E, Nakamura Y, Fujita H, Yoneda Y. (2011). Osteoblastic  $\gamma$ -aminobutyric acid, type B receptors negatively regulate osteoblastogenesis toward disturbance of osteoclastogenesis mediated by receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand in mouse bone. J Biol Chem 286(38):32906-17.

Teitelbaum SL, Ross FP. (2003). Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet 4(8):638-49.

Tsuji K, Ito Y, M. Noda. (1998). Expression of the PEBP2 $\alpha$ A/AML3/CBFA1 gene is regulated by BMP4/7 heterodimer and its overexpression suppresses type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells. Bone 22(2):87–92.

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. (1990). 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(18):7260-7264.

Westendorf JJ. (2006). Transcriptional co-repressors of Runx2. J Cell Biochem 98(1):54-64.

Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante AW Jr, Ahmed-Ansari A, Sell KW, Pollard JW, Stanley ER. (1990). Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 87(12):4828-4832.

Wilm B, Dahl E, Peters H, Balling R, Imai K. Targeted disruption of Pax1 defines its null phenotype and proves haploinsufficiency. (1998). Proc Natl Acad Sci U S A 95(15):8692-7.

Xiao G, Cui Y, Ducy P, Karsenty G, Franceschi RT. (1997). Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. Mol Endocrinol 11(8):1103-13.

Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Weintraub H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. Cell 75(7):1241-1244.

Yamamoto T, Hinoi E, Fujita H, Iezaki T, Takahata Y, Takamori M, Yoneda Y. (2012). The natural polyamines spermidine and spermine prevent bone loss through preferential disruption of osteoclastic activation in ovariectomized mice. Br. J. Pharmacol 166(3):1084-1096.

Yasuda H, Shima N, Nakazawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashino K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci U S A 95(7):3597-3602.

Zambotti A, Makhluf H, Shen J, Ducy P. (2002). Characterization of an osteoblast-specific enhancer element in the CBFA1 gene. J Biol Chem 277(44):41497-506.

Zhu F, Friedman MS, Luo W, Woolf P, Hankenson KD. (2012). The transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6-induced human osteoblast differentiation. J Cell Physiol 227(6):2677-85.