

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20364

研究課題名(和文) Runx2による骨芽細胞突起形成阻害の分子メカニズムとその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism and physiological significance in the inhibition of osteoblast process formation by Runx2

研究代表者

河井 洋祐 (KAWAI, Yosuke)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：50423629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞特異的にRunx2を過剰発現したトランスジェニックマウスでは、骨芽細胞の成熟が抑制され、骨は未熟骨芽細胞で占められていた。全身の骨は、線維骨によって形成されており、高頻度に骨折が起こり、ほとんど骨細胞が存在せず、骨芽細胞突起の著減が観察された。すなわち、突起形成を主とした細胞骨格の変化が骨芽細胞の成熟を規定している可能性が示唆された。Runx2あるいはRunx2 siRNAを導入し、突起数の定量化を行い、骨芽細胞突起数とRunx2発現レベルが逆相関することを実証し、Runx2が骨芽細胞突起形成の制御に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In osteoblast-specific Runx2 transgenic mice, osteoblast maturation was inhibited and most of the osteoblasts were immature. Whole bone was formed by woven bone, the mice frequently suffered bone fracture, osteocytes were virtually absent, and the number of osteoblast processes were severely reduced. It suggested that cytoskeletal change, especially process formation, may determine osteoblast maturation. The examination of the number of osteoblast processes by the introduction of Runx2 or Runx2 siRNA revealed that the number of osteoblast processes and Runx2 expression levels are inversely related, and that Runx2 is involved in the regulation of osteoblast process formation.

研究分野：口腔外科学、骨代謝学

キーワード：Runx2 骨芽細胞突起 骨芽細胞成熟

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、転写因子 Runx2、Sp7 および Wnt シグナルにより骨芽細胞へと分化する。骨芽細胞は、まず I 型コラーゲンの産生を増加させるとともに、石灰化に關与するアルカリホスファターゼを産生する。次にオステオポンチンや骨シアロ蛋白質を産生し、骨芽細胞の成熟とともにオステオカルシンを産生するようになる。一部の骨芽細胞は、基質の中に埋め込まれ、骨細胞となる。未熟骨細胞は DMP1 を、成熟骨細胞はスクレロステチンを産生する。未熟骨芽細胞はコラーゲンの走行がランダムな線維骨を形成するが、線維骨は容易に破骨細胞によって吸収され、成熟した骨芽細胞、コラーゲンの走行が一定の層状骨を形成する。骨芽細胞の成熟過程で、Runx2 の発現は未熟骨芽細胞に強く、成熟とともにその発現は低下する。我々は、2.3 kb I 型コラーゲンプロモーターを用いて、骨芽細胞特異的に Runx2 を過剰発現したトランスジェニック (tg) マウスを作製したが、骨芽細胞の成熟が抑制され、骨は未熟骨芽細胞で占められていた。全身の骨は、線維骨によって形成されており、高頻度に骨折が観察された (図 1)。成熟骨芽細胞マーカーであるオステオカルシンの発現も著減していた。興味深いことに、Runx2 tg マウスではほとんど骨細胞が存在しなかった (図 1)。また、電子顕微鏡で観察すると、骨芽細胞の突起が著減していた。すなわち、これまで、骨芽細胞の分化・成熟は、産生される基質の種類と量によって規定されてきたが、突起形成を主とした細胞骨格の変化が骨芽細胞の成熟を規定している可能性が示唆された。すなわち、突起の少ない未熟骨芽細胞は、細胞間のコミュニケーションも乏しく、ランダムにコラーゲンを産生するが、成熟骨芽細胞は、多くの突起によって密に細胞間コミュニケーションを取り、一定方向にコラーゲンを産生している可能性がある。実際、骨芽細胞の最終分化段階である骨細胞は非常に多くの突起を有している。

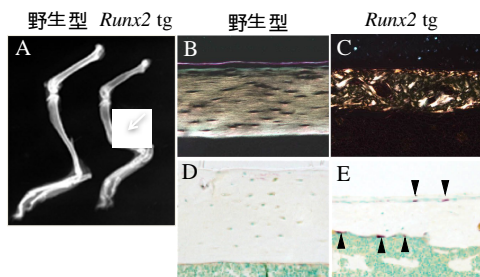


図 1 野生型 (B, D) および Runx2 tg (C, E) マウスの X 線写真 (A)、偏光顕微鏡像 (B, C)、TRAP 染色 (D, E)。Runx2 tg マウスでは高頻度で骨折が認められ (A 矢印)、コラーゲン走行はランダムで (C)、骨細胞が著減し破骨細胞 (E 矢印) が多く見られる。

2. 研究の目的

本申請では、骨芽細胞突起数と Runx2 発現レベルが逆相関することを実証するとともに、骨芽細胞突起の数の増加が、骨芽細胞の成熟および層状骨 (成熟骨) の形成と相関するという仮説を証明する。さらに Runx2 の下流で骨芽細胞突起形成を阻害する分子を明らかにする。具体的には、

(1) Runx2 の発現レベルと骨芽細胞突起の数が逆相関することを示すことにより、Runx2 が突起形成の抑制に關与していることを証明する。

(2) 新生児から成獣までのマウスの骨芽細胞の突起を海綿骨部、皮質骨 (骨幹端部)、皮質骨 (骨幹部) の 3 カ所で走査型電子顕微鏡で観察するとともに、それぞれの部位で骨芽細胞分化マーカーの発現およびコラーゲンの走行を調べ、骨芽細胞突起数と骨芽細胞の成熟および骨の成熟との相関を明らかにする。

(3) 野生型マウスと Runx2 tg マウスから骨芽細胞分画を取り、マイクロアレイ解析で、細胞骨格関連遺伝子の発現を比較し、突起形成を制御する候補遺伝子を同定する。

(4) これらの候補遺伝子から、Runx2 の下流で、突起形成の阻害に重要な役割を果たす遺伝子を明らかにする。これまで、骨芽細胞突起数と骨芽細胞の成熟度との相関を証明した報告はない。また、骨芽細胞突起数の増加が、骨芽細胞の成熟を規定するといった概念も提唱されていない。したがって、これまで骨芽細胞の成熟の指標となってきた各種骨基質蛋白質の他に、突起形成が骨芽細胞の成熟に重要な要因であることを証明することは、骨芽細胞分化の概念を変える画期的な発見となる。また、骨芽細胞突起の数と、形成された骨の成熟度 (線維骨か層状骨) の相関を明らかにすることは、骨の成熟を細胞骨格の変化から説明する独創的な結果となる。Runx2 は未熟骨芽細胞に発現が高く、未熟骨芽細胞によって線維骨が形成される。骨芽細胞の成熟とともに Runx2 の発現が低下し、層状骨が形成されていく。したがって、Runx2 tg マウスを用いて、Runx2 の下流で突起形成の阻害を引き起こす分子を同定できれば、生理的にも Runx2 がその分子の発現調節により突起形成を制御し、骨芽細胞および骨の成熟度を調節していることを強く示唆することができる。

3. 研究の方法

(1) Runx2 の発現レベルと骨芽細胞突起数の相関性の検討

まず、骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を slide grass に 0.5×10^4 cells を播種し、16 時間後に 4 % PFA で固定後、一次抗体として anti-actin goat IgG、二次抗体として Alexa Fluor 488 anti-goat IgG (緑) を用い、免疫染色を行った。また、DAPI で核染色した。突起の長さを、Image J で解析し、形態、長さ、

数で突起を分類した。

retrovirus によって IRES-GFP と Runx2-IRES GFP を導入したときの MC3T3-E1 細胞の形態変化を比較した。GFP により遺伝子導入された細胞を区別し形態変化を見やすくした。上記1の分類で、突起の変化を定量化した。

Runx2 の siRNA をエレクトロポレーション法で MC3T3-E1 細胞へ導入した。mRNA を抽出、real time RT-PCR 法で Runx2 の発現を調べた。上記1と同様に細胞形態を actin の検出で観察、突起の変化を定量化した。

(2) 骨芽細胞突起数と骨芽細胞の成熟および骨の成熟との相関性の解析

固定した新生児、3週齢、8週齢マウスの大腿骨を海綿骨部、皮質骨(骨幹端部)、皮質骨(骨幹部)の3カ所で切断後、6N HCL、1mg/ml のコラゲナーゼで処理し、切断面を走査型電子顕微鏡で観察し、骨芽細胞突起数を計測した。また、大腿骨を長軸方向に切断、骨芽細胞が少数残る条件でコラゲナーゼ処理し、内骨膜側の骨芽細胞を走査型電子顕微鏡で観察し、骨芽細胞突起数を計測した。この場合、未熟骨芽細胞を骨幹端部で、成熟骨芽細胞を骨幹部で観察した。

(3) マイクロアレイ解析による Runx2 ターゲット遺伝子の同定

10週齢の野生型マウスおよび Runx2 tg マウスの大腿骨周囲の筋や結合組織を除いた後、両側の骨幹端で切断、PBS で骨髄細胞を除いた後、歯間ブラシを用いて内骨膜の骨芽細胞を集めた。mRNA を抽出、マイクロアレイで、野生型マウスと Runx2 tg マウス間で、2倍以上差がある遺伝子を選択した。

2倍以上差がある遺伝子のうち、DAVID ソフトウェアを用いて、cytoskeleton を含む Gene Ontology (GO) term に分類される遺伝子を選択した。遺伝子情報により、候補遺伝子を絞り込んだ。

上記で絞り込んだ候補遺伝子は、上記1で抽出した RNA を用い、real time RT-PCR で、再現性を確認し、さらに絞り込んだ。

MC3T3-E1 細胞に Runx2 を導入、上記で絞り込んだ遺伝子が誘導あるいは抑制されるか検討した。また、Runx2 の siRNA を導入して、同様に調べた。

細胞骨格関連遺伝子で、Runx2 tg マウスで発現が増加あるいは低下しており、Runx2 の導入により誘導(抑制) Runx2 の siRNA の導入により抑制(誘導)される遺伝子を候補遺伝子とした。

候補遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイで Runx2 による活性誘導を調べるとともに、抗 Runx2 抗体を用いた ChIP アッセイを行った。

4. 研究成果

(1) Runx2 の発現レベルと骨芽細胞突起数の相関性

骨芽細胞突起数と Runx2 発現レベルが逆相関することを実証するために、骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞にレトロウイルスによって IRES-GFP と Runx2-IRES GFP を導入し、細胞突起数を測定した。また、Runx2 の siRNA をエレクトロポレーション法で MC3T3-E1 細胞へ導入し、細胞突起数を測定した。両者において、突起数の定量化を行ったところ、Runx2 の発現量と突起数が逆相関していた。すなわち、骨芽細胞突起数と Runx2 発現レベルが逆相関することを実証するとともに、Runx2 が骨芽細胞突起数の制御に関与していることを明らかにできた。

(2) 骨芽細胞突起数と骨芽細胞の成熟および骨の成熟との相関性

固定した新生児、3週齢、8週齢マウスの大腿骨を海綿骨部、皮質骨(骨幹端部)、皮質骨(骨幹部)の3カ所で切断後、6N HCL、1mg/ml のコラゲナーゼで処理し、断面を走査型電子顕微鏡で観察したが、骨芽細胞突起数を定量することは困難であった。また、大腿骨を長軸方向に切断、骨芽細胞が少数残る条件でコラゲナーゼ処理し、内骨膜側の骨芽細胞を走査型電子顕微鏡で観察する方法でも、骨芽細胞突起数を定量することは困難であった。電子顕微鏡像の3次元構築が骨芽細胞突起数の定量に必要と考えている。

(3) マイクロアレイ解析による Runx2 ターゲット遺伝子の同定

10週齢の野生型マウスおよび Runx2 tg マウスの骨芽細胞より mRNA を抽出、マイクロアレイで、野生型マウスと Runx2 tg マウス間で、2倍以上差がある cytoskeleton 関連遺伝子を選択した。リアルタイム RT-PCR で確認後、MC3T3-E1 細胞に Runx2 あるいは Runx2 の siRNA を導入、選択された遺伝子が誘導あるいは抑制されるか検討した。さらに、Runx2 tg マウスで発現増加、2.3 kb Col1a1 Cre を用いた Runx2^{fl/fl} Cre マウスで低下した1遺伝子を候補遺伝子とした。さらに、その遺伝子のプロモーターを用いたレポーターアッセイで、Runx2 による活性誘導を確認した。また、Runx2 導入により突起数が減少した MC3T3-E1 細胞に、この遺伝子を導入することにより、Runx2 による突起数の減少が認められなくなった。これらの結果により、この分子が、Runx2 による細胞骨格の制御に関与していると考えられた。現在、この遺伝子のノックアウトマウスを作製しており、今後この遺伝子の生理的機能も明らかにする。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1)Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Taniuchi I, Ito K, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori :. Cbfb regulates bone development by stabilizing Runx family proteins. J Bone Miner Res. 査読有, 30(4):706-14, 2015.
DOI:10.1002/jbmr.2379

〔学会発表〕(計1件)

(1)Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Taniuchi I, Ito K, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori T: Cbfb plays important roles in bone development through the stabilization of Run family proteins. The RUNX Transcription Factors in Development and Disease.

2015年10月18日～21日

Rehovot (Israel)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

河井 洋祐 (KAWAI, Yosuke)

長崎大学・病院 (歯学系)・助教

研究者番号 : 5 0 4 2 3 6 2 9