

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20414

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の骨芽細胞系列への分化初期過程における細胞増殖・凝集機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the proliferation and condensation of osteoblast progenitors at an early stage of osteoblast differentiation

研究代表者

松裏 恵子 (MATSUURA, Keiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・特別研究員

研究者番号：20770423

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)：間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化には、転写因子Runx2とSp7の両者が必須である。ヒト及びマウスのRunx2ヘテロ変異は、頭蓋の泉門の開大、鎖骨低形成等を主徴とする鎖骨頭蓋異形成症を引き起こす。Sp7 ノックアウト(ko)マウスでは、頭蓋冠領域に骨芽細胞は存在しないが分厚い間葉系細胞の凝集を認めた。一方、Runx2 koマウスでは、間葉系細胞の凝集も認めなかった。Wnt、ヘッジホグ、Fgf、Pthlhシグナル分子の発現が、Sp7 koマウスに比しRunx2 koマウスの頭蓋冠で低下していた。また、これらの分子の発現は、野生型マウスに比しRunx2ヘテロ変異マウスの頭蓋冠でも低下していた。

研究成果の概要(英文)：The transcription factors, Runx2 and Sp7, are essential for the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts. The heterozygous mutations of Runx2 in human and mice cause cleidocranial dysplasia, which is characterized by open fontanelle and hypoplastic clavicles. Sp7 knockout mice lacked osteoblasts, but had a condensation of mesenchymal cells in calvariae. Runx2 knockout mice lacked both osteoblasts and condensation of mesenchymal cells in calvariae. The expression of the molecules in Wnt, hedgehog, Fgf, and Pthlh signaling pathways was reduced in Runx2 knockout calvariae compared with that in Sp7 knockout calvariae. The expression of these molecules was also reduced in Runx2 heterozygous calvariae compared with that in wild-type calvariae.

研究分野：骨代謝学

キーワード：Runx2 Sp7 骨芽細胞 鎖骨頭蓋異形成症

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化には、転写因子 Runx2 と Sp7 の両者が必須であり、Runx2 は Sp7 の上流に位置する。ヒト RUNX2 のヘテロ変異は、頭蓋の低形成、泉門の開大、鎖骨低形成、過剰歯、低身長等を主徴とする鎖骨頭蓋異形成症を引き起こす。マウスのヘテロ変異では、過剰歯は見られないが、その他は同様の表現型を示す。マウス前頭縫合は特異な癒合過程をとる。生後6-7日目位に、間葉系細胞の凝集が起き、凝集した細胞は軟骨細胞へと分化、軟骨内骨化によって骨に置換される。これによって、前頭縫合は完全に癒合する。矢状縫合等の他の縫合では、軟骨内骨化を介した癒合は起こらず、組織学的には完全に癒合しない。

Cbfb は Runx2 と結合し、Runx2 の DNA 結合を促進するとともに、Runx2 のタンパク分解を阻害し安定化させる。Cbfb には2つのアイソフォーム(Cbfb1, Cbfb2)があり、それぞれのノックアウト(ko)マウスでは、Cbfb1 ko マウスは異常を認めず、Cbfb2 ko マウスは骨格形成が阻害されていた。Cbfb2 ko マウスと Runx2 ヘテロ変異マウスの比較では、軟骨内骨化で形成される骨格は Cbfb2 ko マウスで強く阻害され、膜性骨化で形成される骨格は、Runx2 ヘテロ変異マウスの方が強く阻害されていた。Cbfb は、Runx ファミリー (Runx1, Runx2, Runx3) 全体に必要なため、軟骨内骨化部位では、Runx1 と Runx3 が Runx2 の機能の一部を代替していると考えられた。しかし、膜性骨化部位では、Runx2 の存在が絶対的で、ヘテロ変異でも強い表現型が出現すると考えられた。すなわち、頭蓋縫合の閉鎖には、十分な Runx2 の発現量が必要と考えられる。

そこで、Runx2 ko マウスと Sp7 ko マウスの頭蓋冠を比較してみた。Sp7 ko マウスでは、頭蓋冠領域に骨芽細胞は存在しないが分厚い間葉系細胞の凝集を認めた。また、リアルタイム RT-PCR で、Sp7 ko マウスは野生型マウスと同程度に Runx2 を発現していた。一方、Runx2 ko マウスでは、頭蓋冠領域に間葉系細胞は少なく、凝集は全く認めなかった。下顎骨領域を観察すると、両者ともに骨芽細胞を認めず、全く骨形成は起こっていなかったが、Sp7 ko マウスでは下顎骨領域に広範に間葉系細胞の凝集を認めたのに対し、Runx2 ko マウスではメッケル軟骨周囲に限局して間葉系細胞を認めた。さらに、四肢の長管骨を比較すると、外骨膜領域で Sp7 ko マウスでは間葉系細胞の凝集を認め、Runx2 ko マウスでは認めなかった。Sp7 ko マウスの凝集した間葉系細胞の一部は、軟骨細胞へと分化した。

これらの結果は、Runx2 が間葉系幹細胞を骨芽細胞系列へと分化誘導するとき、まず間葉系細胞の増殖・凝集を引き起こすことを示唆している。

## 2. 研究の目的

Runx2 が間葉系幹細胞から骨芽細胞系列へ

の分化誘導初期に、間葉系細胞の増殖・凝集を引き起こす分子メカニズムを解明する。具体的には、

(1)野生型マウス、Cbfb2 ko マウス、Runx2+/-マウスで前頭縫合及び矢状縫合の閉鎖を組織学的に詳細に比較する。

(2)Runx2 ko マウスと Sp7 ko マウスの頭蓋冠の RNA を用いてマイクロアレイで比較、Sp7 ko マウスで Runx2 によって誘導される遺伝子候補を選択する。

(3)選択された遺伝子が、Runx2 によって直接調節されるか明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1)前頭縫合、矢状縫合の組織学的解析

出生後7日 (P7)、P10、P14、P28 の野生型マウス、Cbfb2 ko マウス、Runx2+/-マウスの頭部の前頭断の切片を用いて、H-E 染色、サフラニン O 染色、Colla1、Col2a1、Coll10a1 プロベを用いた in situ hybridization を行った。また、抗 Runx2 抗体、抗 Sox9 抗体を用いた免疫組織染色を行った。

### (2)マイクロアレイ解析による間葉系細胞増殖・凝集に関わる Runx2 標的遺伝子の探索

①胎生 18.5 日の Runx2 ko マウス、Sp7 ko マウスの頭蓋冠より RNA を抽出し、Runx2 ko マウスと Sp7 ko マウス間で、マイクロアレイ解析で比較した。

②Runx2 ko マウスに比較し Sp7 ko マウスで 2 倍以上発現増強され、バックグラウンドより 10 倍以上のシグナル強度を示した遺伝子を選択した。選択された遺伝子は、リアルタイム RT-PCR で確認後、アノテーション情報、パスウェイ解析等によりクラス分けした。特に、細胞増殖および細胞凝集にフォーカスした。

### (3)ChIP 解析

抗 Runx2 抗体を用いた chromatin immunoprecipitation (ChIP) 解析によって、上記で選択した遺伝子の転写制御領域に Runx2 が結合しているか調べた。

## 4. 研究成果

### (1)前頭縫合、矢状縫合の組織学的解析

P7 では、野生型マウスの前頭縫合で間葉系細胞の凝集が認められた。この細胞は I 型コラーゲンも II 型コラーゲンも発現していなかった。一方、Cbfb2 ko マウス、Runx2+/-マウスでは、間葉系細胞の凝集は認められなかった。P10 では、野生型マウスの前頭縫合で、サフラニン O 染色陽性の軟骨細胞が出現

していた。これらの細胞は、II 型コラーゲンあるいは X 型コラーゲンを発現していた。Cbfb2 ko マウスでは、間葉系細胞の凝集が認められ、サフラニン 0 染色、II 型コラーゲンの発現が認められたが、X 型コラーゲンの発現は認めなかった。Runx2<sup>+/-</sup>マウスでは、全く間葉系細胞の凝集は認めなかった。P14 では、野生型マウスの前頭縫合はすでに完全に癒合し、I 型コラーゲン陽性の骨芽細胞と骨によって占められていた。Cbfb2 ko マウスでは、まだサフラニン 0 染色陽性で、軟骨細胞は X 型コラーゲンを発現していた。一方、Runx2<sup>+/-</sup>マウスでは、全く間葉系細胞の凝集は認められなかった。P28 では、Cbfb2 ko マウスでも前頭縫合は完全に癒合し、I 型コラーゲン陽性の骨芽細胞と骨によって占められていた。しかし、Runx2<sup>+/-</sup>マウスでは、間葉系細胞の凝集は認められず、軟骨細胞も出現しなかった。これは、P42、15 週齢でも同様であった。したがって、Cbfb2 ko マウスでは、遅延はするが、軟骨内骨化を介した完全な前頭縫合の癒合が起き、Runx2<sup>+/-</sup>マウスでは、間葉系細胞の凝集も起きないことが明らかになった。すなわち、Runx2 の正常の半分以上のタンパク量が、間葉系細胞の凝集に必要であることが判明した。

野生型マウスの矢状縫合は P10 でほぼ消失するが、P28 でも完全には癒合しなかった。Cbfb2 ko マウスでは P10 でほぼ消失、P28 でも完全には癒合しなかった。Runx2<sup>+/-</sup>マウスでは、P28 でも矢状縫合が広範囲に存在した。

抗 Runx2 抗体、抗 Sox9 抗体を用いた免疫組織染色では、野生型マウス、Runx2<sup>+/-</sup>マウスともに、前頭縫合の間葉系細胞に Runx2 及び Sox9 タンパク質を検出した。

(2) マイクロアレイ解析による間葉系細胞増殖・凝集に関わる Runx2 標的遺伝子の探索

胎生 18.5 日の Runx2 ko マウス、Sp7 ko マウスの頭蓋冠の RNA を用いたマイクロアレイ解析の結果、Wnt、ヘッジホグ、Fgf レセプター、Pthlh シグナル分子の発現が Runx2 ko マウスの頭蓋冠で低下していた。これらの低下は、リアルタイム RT-PCR で確認できた。確認できた遺伝子に関しては、野生型マウスと Runx2<sup>+/-</sup>マウスの発現レベルをリアルタイム RT-PCR で調べたが、これらの多くは、野生型マウスと比較し Runx2<sup>+/-</sup>マウスで低下していた。

(3) ChIP 解析

抗 Runx2 抗体を用いて、ChIP 解析を行った。上記で Sp7 ko マウスに対して Runx2 ko マウスで発現低下していた遺伝子の発現調節領域において、Runx2 結合配列を含む部位でプライマーを設定、リアルタイム PCR で定量解析を行った。結合配列は複数あることが多く、複数箇所にプライマーを設定、リアルタイム

PCR を行った。ほとんどの発現低下していた遺伝子のゲノム上に Runx2 の結合を確認できた。

したがって、Wnt、ヘッジホグ、Fgf レセプター、Pthlh シグナル分子が、Runx2 によって発現制御され、頭蓋冠の間葉系細胞増殖・凝集にかかわると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/kaihou-2/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松裏 恵子 (MATSUURA, Keiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・  
特別研究員

研究者番号：20770423

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者  
なし