

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17087

研究課題名(和文) 肥大軟骨細胞より骨芽細胞への分化転換におけるRunx2の役割

研究課題名(英文) Role of Runx2 in transdifferentiation from hypertrophic chondrocytes to osteoblasts

研究代表者

坂根 千春 (SAKANE, Chiharu)

長崎大学・先端生命科学支援センター・助教

研究者番号：40792578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肥大軟骨細胞特異的にCreを発現するCol10a1 Creトランスジェニック(tg)マウスをRunx2 floxマウスと交配し、肥大軟骨細胞特異的にRunx2を欠失させたRunx2コンディショナルko (cko)マウスを作製した。軟骨への血管侵入は野生型マウスと同程度に認められた。Col10a1 CreマウスとCAG-loxP-stop-loxP-LacZレポーターマウスを交配し、LacZ陽性肥大軟骨細胞が骨芽細胞に分化転換することを確認できた。Runx2 ckoマウスでは分化転換が起こらなかったが、成獣の海綿骨・皮質骨ともに骨量は野生型マウスと有意な差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨内骨化では、軟骨細胞の成熟後、軟骨への血管侵入が必須である。Runx2 koマウスの軟骨への血管侵入は全く認めず、VEGFの発現が低下しており、Runx2 はVEGFを誘導し、軟骨への血管進入を制御すると考えられてきた。しかし、Runx2 ckoマウスでも、正常に軟骨への血管侵入は認められ、Runx2 の肥大軟骨細胞での発現は、軟骨への血管侵入に必須ではないことが明らかとなった。また、Runx2 の肥大軟骨細胞での欠損は、肥大軟骨細胞の骨芽細胞への分化転換を阻害したが、骨量に影響を及ぼさないことも明らかとなった。これらの発見は、軟骨内骨化の分子メカニズムの解明に貢献する。

研究成果の概要(英文)：We generated Runx2 conditional knockout (cko) mice, in which Runx2 was specifically deleted in hypertrophic chondrocytes, by mating Runx2 flox mice with Col10a1 Cre transgenic mice. Vascular invasion into the cartilage was similarly observed in wild-type and Runx2 cko mice. We mated Col10a1 Cre transgenic mice with CAG-loxP-stop-loxP-LacZ reporter mice and confirmed that LacZ-positive hypertrophic chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts. Although the deletion of Runx2 in hypertrophic chondrocytes interrupted the transdifferentiation of hypertrophic chondrocytes to osteoblasts, we did not observe the differences in the bone volume of trabecular and cortical bone between wild-type and Runx2 cko mice by micro-CT analysis.

研究分野：生物系、医歯薬学、歯学

キーワード：軟骨細胞 骨芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 四肢、脊椎、肋骨、頭蓋底等の骨格は、内軟骨性骨化によって形成される。内軟骨性骨化では、まず間葉系細胞が凝集し、軟骨原器が形成され、II型コラーゲンを産生する未熟軟骨細胞に分化する。未熟軟骨細胞は増殖するとともに、骨幹部では成熟しX型コラーゲンを産生する肥大軟骨細胞になる。肥大軟骨細胞はさらに終末期肥大軟骨細胞となり、軟骨器質は石灰化し、軟骨周囲から血管が侵入する。血管とともに軟骨周囲の間葉系細胞が侵入し、骨芽細胞へと分化、軟骨は骨幹部より骨へと置換されていく。これまで、終末期肥大軟骨細胞はアポトーシスで死滅していくと考えられてきたが、最近、一部の細胞は骨芽細胞に分化転換することが示された<sup>1,2</sup>。

(2) Runx2 ノックアウト(ko)マウスは、骨芽細胞が存在せず、内軟骨性骨化も阻害され、出生直後に死亡する。軟骨細胞の後期分化が阻害され、内軟骨性骨化によって形成される骨格の多くは未熟軟骨細胞によって形成されている。すなわち、Runx2 は、骨芽細胞分化及び軟骨細胞後期分化に必須な転写因子である。しかし、Runx2 ko マウスの一部の骨格(脛骨、橈骨)の軟骨細胞は、Runx3 との機能重複のため終末期肥大軟骨細胞まで成熟しており、骨幹部は石灰化しているが、軟骨への血管侵入は全く認めない<sup>3,4</sup>。さらに、Runx2 ko マウスの軟骨を脾臓に移植した実験でも、軟骨への血管侵入は低下している<sup>5</sup>。また、Runx2 ko マウスでは、軟骨細胞が最終分化した骨格でも VEGF の発現が低下しており、Runx2 は VEGF を誘導し、軟骨への血管進入を制御すると考えられてきた<sup>6</sup>。

(引用文献)

1. PLoS Genet 2014, 10 (12), e1004820.
2. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111 (33), 12097-102.
3. Cell 1997, 89 (5), 755-64.
4. Genes Dev, 18(8), 952-63, 2004.
5. J Bone Miner Res 2002, 17 (7), 1297-305.
6. Mech Dev 2001, 106 (1-2), 97-106.

### 2. 研究の目的

本申請では、肥大軟骨細胞から骨芽細胞への分化転換に Runx2 が必須か明らかにするとともに、Runx2 による肥大軟骨細胞から骨芽細胞への分化転換の生理的意義を明らかにする。また、Runx2 の軟骨への血管侵入への寄与を評価する。具体的には、

(1) Col10a1 Cre マウスと CAG-flox-LacZ レポーターマウスを交配し、LacZ 陽性肥大軟骨細胞が骨芽細胞に分化転換することをベータガラクトシダーゼ染色で確認するとともに、Runx2 fl/fl Cre (Runx2 cko)/CAG-flox-LacZ マウスで、LacZ 陽性骨芽細胞が出現するか調べる。LacZ 陽性骨芽細胞が出現しなければ、Runx2 が肥大軟骨細胞から骨芽細胞への分化転換に必須であることを証明したことになる。

(2) Runx2 cko マウスの海綿骨を継時的に観察し、Runx2 による肥大軟骨細胞から骨芽細胞への分化転換の海綿骨形成に対する寄与度を評価する。

(3) Runx2 の軟骨への血管侵入及び VEGF 発現への寄与を評価する。

### 3. 研究の方法

#### (1) Runx2 cko マウスの継時的観察

Runx2 flox マウスは、長崎大学の伊藤公正教授より入手した。Col10 Cre マウスは、ドイツの Klaus von der Mark 教授より入手した。これらを交配し、肥大軟骨細胞特異的 Runx2 fl/fl Cre (Runx2 cko) マウスを作製した。胎生 15.5 日、16.5 日、17.5 日、新生児の骨格標本と組織解析、6 週齢、22 週齢の組織解析及びマイクロ CT 解析を行った。

#### (2) 骨芽細胞・軟骨細胞分化の観察

胎生 16.5 日と 17.5 日の Runx2 fl/fl マウスと Runx2 cko マウスの大腿骨パラフィン切片で、Col2a1, Col10a1, osteopontin, MMP13, Col1a1 プロローベを用いた in situ hybridization を行った。また、Runx2 抗体、Sp7 抗体、Col1a1 抗体を用いて、免疫組織染色を行った。これらの実験により、軟骨細胞の最終分化への影響を調べるとともに、骨芽細胞の有無・分布・分化レベルを bone collar 領域と骨髄内で比較検討した。さらに、大腿骨、脛骨より RNA を抽出、Real Time RT-PCR 法で Runx2, Col10a1, osteopontin, bone sialoprotein (BSP), MMP13, Sp7, Col1a1, osteocalcin の発現を調べた。

#### (3) 分化転換における細胞増殖とアポトーシスの観察

胎生 16.5 日と 17.5 日で、BrdU ラベルを行うことにより骨幹部領域の肥大軟骨細胞及び骨芽細胞の増殖を調べた。また、TUNEL 染色でアポトーシスを調べた。これにより、分化転換時の細胞増殖・アポトーシス、分化転換できない場合の終末期肥大軟骨細胞の運命を明らかにした。

#### (4) 軟骨への血管侵入の評価

胎生 15.5 日と 16.5 日の Runx2 fl/fl マウスと Runx2 cko マウスの大腿骨パラフィン切片を用

いて、H-E 染色で血管侵入のレベルに差があるか検討した。さらに、抗 VEGF 抗体を用いた免疫組織染色を行った。

#### (5) 透過型電子顕微鏡による分化転換の観察

胎生 15.5 日と 16.5 日の大腿骨骨幹部超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察、分化転換時の細胞形態を Runx2 fl/fl マウスと Runx2 cko マウスで比較した。

#### (6) レポーターマウスを用いた Col10a1 陽性肥大軟骨細胞の骨芽細胞への分化転換の観察

Col10a1 Cre マウスと CAG-flox-LacZ レポーターマウスを交配し、Col10a1 Cre/ CAG-flox-LacZ マウスを作製した。胎生 15.5 日、16.5 日、17.5 日で、ベータガラクトシダーゼ染色を行い、胎生 15.5 日では肥大軟骨細胞特異的に、16.5 日以降は、肥大軟骨細胞と一次海綿骨領域の骨芽細胞に染色されることを確認した。

#### (7) Runx2 cko/CAG-flox-LacZ マウスでの、LacZ 発現細胞の観察

Runx2 fl/flCre マウスと Runx2 fl/fl CAG-flox-LacZ マウスを交配し、Runx2 fl/flCre /CAG-flox-LacZ マウス (Runx2 cko/CAG-flox-LacZ マウス) を作製した。このマウスを胎生 15.5 日、16.5 日、17.5 日及び新生児で、ベータガラクトシダーゼ染色を行い、Col10a1 Cre/ CAG-flox-LacZ マウスの結果と比較した。

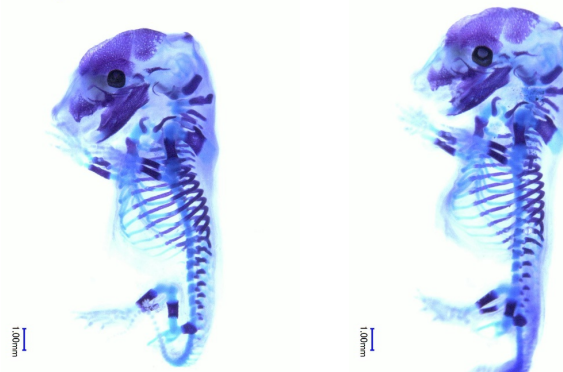
### 4. 研究成果

(1) Runx2 cko マウスの胎生 15.5 日、16.5 日、17.5 日及び新生児の骨格標本では、Runx2 fl/fl マウスと差を認めなかった (図 1)。H-E 染色では、成長板の静止軟骨細胞層、増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層は野生型と同様の構造を呈していた (図 2)。また、最終分化した肥大軟骨細胞層 (終末期肥大軟骨細胞層) への血管侵入は Runx2 fl/fl マウス、Runx2 cko マウス共に同時期に同程度起きていた (図 2)。Col2a1, Col10a1, osteopontin, MMP13, Colla1 プロローブを用いた in situ hybridization では、Col2a1 の発現は Runx2 fl/fl マウスと差を認めなかったが、Col10a1, osteopontin, MMP13, Colla1 の発現

は、Runx2 fl/fl マウスと比較し低下していた。また、H-E 染色で、成長板直下の一次海綿骨及び骨芽細胞が減少していた。透過型電子顕微鏡での観察でも、一次海綿骨領域での骨芽細胞が、Runx2 cko マウスで減少していた。BrdU ラベルは、成長板の増殖軟骨細胞層では Runx2 fl/fl マウスと差を認めなかったが、一次海綿骨領域では Runx2 fl/fl マウスと比較し低下していた。TUNEL 陽性細胞は、一次海綿骨領域で Runx2 fl/fl マウスと比較し増加していた。Runx2 抗体を用いた組織免疫染色では、Runx2 cko マウスで肥大軟骨細胞での陽性細胞が著減していた。また、一次海綿骨領域での Runx2 陽性細胞も著減していた。Sp7 抗体、Colla1 抗体を用いた組織免疫染色では、やはり一次海綿骨領域での陽性細胞が著減していた。VEGF 抗体を用いた組織免疫染色では、bone collar には、Runx2 fl/fl マウス、Runx2 cko マウス共に同程度染色されたが、一次海綿骨領域での陽性細胞が Runx2 cko マウスで著減していた。これらの結果は、Runx2 の肥大軟骨細胞層での欠失は、Col10a1 の発現を低下させるが、その後の肥大軟骨細胞の最終分化には影響を及ぼさないことを示している。また、Runx2 の肥大軟骨細胞層での欠失は、軟骨辺縁の骨芽細胞分化及び bone collar の形成には影響を与えず、軟骨への血管侵入は、bone collar の骨芽細胞による VEGF 発現で充分であることを示している。

Runx2 fl/flマウス

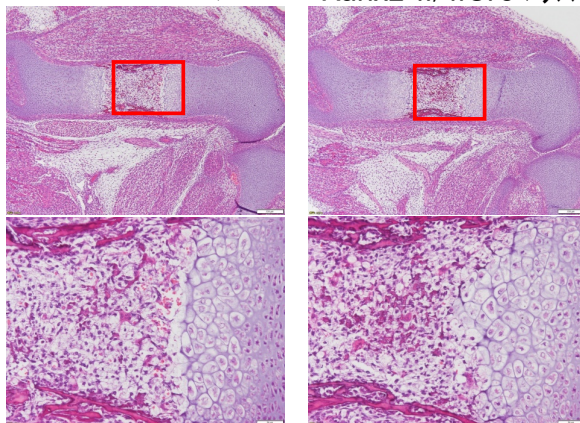
Runx2 fl/flCreマウス



〈図1〉胎生 15.5 日の Runx2 fl/fl(コントロール)マウスと Runx2 fl/flCre (Runx2 cko)マウスの骨格標本

Runx2 fl/flマウス

Runx2 fl/flCreマウス



〈図2〉胎生 15.5 日の Runx2 fl/fl(コントロール)マウスと Runx2 fl/flCre (Runx2 cko)マウスの大腿骨組織切片の H-E 染色本

骨細胞層での欠失は、軟骨辺縁の骨芽細胞分化及び bone collar の形成には影響を与えず、軟骨への血管侵入は、bone collar の骨芽細胞による VEGF 発現で充分であることを示している。

(2) Col10a1 Cre/ CAG-flox-LacZ マウスの胎生 15.5 日、16.5 日、17.5 日、新生児でのベ-

タガラクトシダーゼ染色は、胎生 15.5 日では肥大軟骨細胞特異的に、16.5 日以降は、肥大軟骨細胞と一次海綿骨領域の骨芽細胞に染色された。さらに新生児では皮質骨領域を含む骨全体に陽性細胞が存在した。Runx2 cko/CAG-flox-LacZ マウスでは、ベータガラクトシダーゼ陽性細胞は著減していた。したがって、Runx2 は肥大軟骨細胞の骨芽細胞への分化転換に必須であることが明らかとなった。

(3) Runx2 cko マウスの 6 週齢、22 週齢のマイクロ CT 解析では、骨量、海綿骨厚、海綿骨数、骨密度共に Runx2 fl/fl マウスと Runx2 cko マウスに差を認めなかった。また、皮質骨厚、皮質骨骨密度も Runx2 fl/fl マウスと Runx2 cko マウスに差を認めなかった。したがって、肥大軟骨細胞の骨芽細胞への分化転換は、正常の骨量獲得には必須ではないことが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

①Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, Matsuura-Kawata VKDS, Sakane C, Matsuo Y, Nagai K, Maeno T, Date Y, Nishimura R, Komori T: Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. Sci Rep. 10;8(1):13551, 2018 Sep. DOI: 10.1038/s41598-018-31853-0 (査読有)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。