

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17056

研究課題名(和文) ヒトおよびマウスiPS細胞からの骨芽細胞分化過程におけるRunx2の役割の解明

研究課題名(英文) Investigating the role of RUNX2 in osteoblastic differentiation of mouse and human iPSCs

研究代表者

青木 栄人 (Aoki, Hideto)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90801481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトおよびマウスRunx2ホモ欠損iPS細胞からの骨芽細胞分化過程におけるRunx2の役割について解析することを目的に研究を行った。マウスRunx2ホモ欠損iPS細胞(Runx2<sup>-/-</sup>miPSCs)を骨芽細胞に分化誘導した結果、骨芽細胞への分化は後期まで進まないことが明らかとなった。さらに骨関連遺伝子の遺伝子発現プロファイルにてRunx2<sup>-/-</sup>miPSCsではRunx2<sup>+/+</sup>miPSCと比較して53の遺伝子の発現が低下し、わずか3遺伝子でのみ発現の上昇を認めた。さらにこれらの遺伝子のうちのいくつかの遺伝子についてヒトRunx2ホモ欠損iPS細胞でも確認した結果、マウスと同様の結果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞は多分化能を有することで再生医療の重要なソースとして注目されている。その応用には効率的かつ安全性の高い分化誘導法の確立が必須とされている。しかしながら、iPS細胞から種々の細胞への分化誘導における詳細なメカニズムは不明な点が多く、その一端が解明されたと考える。本研究では疾患特異的iPS細胞のマウスモデルとヒトでの検討を行い、その類似点や相違点を解析した。これは、マウスモデルの解析の重要性が示されたことにもつながると考える。これらの内容はRunx2欠損をはじめとする多くの遺伝子疾患にとっての病態解明や創薬にもつながる重要なデータである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish iPSCs from Runx2 homo-deficient (Runx2<sup>-/-</sup>) mouse and to elucidate the role of RUNX2 in the differentiation process into osteoblasts. Furthermore, we investigate the difference in the mechanisms involved in osteoblastic differentiation, in mouse iPSCs and human iPSCs. A later stage marker of osteogenesis were significantly lower in Runx2<sup>-/-</sup> miPSCs than in wild-type and Runx2<sup>+/+</sup> miPSCs, suggesting that osteoblastic differentiation will not proceed to later stages in Runx2<sup>-/-</sup> miPSCs. A total of 53 genes were downregulated and only three genes were upregulated in Runx2<sup>-/-</sup> miPSCs compared with wild-type miPSCs. We also confirmed that expression of genes by osteoblastic differentiation from human iPSCs suggesting that the function of Runx2 confirmed in the mouse model is the same in humans. Our finding will have implications for improving our understanding of RUNX2 functions in bone formation.

研究分野：歯周病学

キーワード：Runx2 iPS細胞 骨芽細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞分化には、様々なシグナル分子が関与しており、それらのシグナルのクロストークにより厳密に制御されている。この過程で、骨芽細胞は分化段階により種々の表現系を発現する。未分化な骨芽細胞である前駆骨芽細胞や前骨芽細胞は I 型コラーゲンやアルカリフォスファターゼなどを、成熟した骨芽細胞はオステオカルシンを発現し、それらの発現は BMP などによって制御されている(Yamaguchi A, et al. Endoc Rev 2000)。ノックアウトマウスの解析から、骨芽細胞に特異的な転写因子である *Runx2* (Komori T, et al. Cell 1997) と *Osterix (Sp7)* (Nakashima K, et al. Cell 2002) が重要な役割を担っていることが明らかにされている。

iPS 細胞は多分化能を有することで再生医療の重要なソースとして注目されている。その応用には効率的かつ安全性の高い分化誘導法の確立が必須とされている。しかしながら、iPS 細胞から種々の細胞への分化誘導における詳細なメカニズムは不明な点が多く、その解明が必要とされている。特に、iPS 細胞からの骨芽細胞分化過程における *Runx2* の役割については未解明な点が多いため、本研究ではこの点に着眼し学術的「問い」と設定した。

### 2. 研究の目的

ヒトおよびマウス *Runx2* ホモ欠損 iPS 細胞を用いて、骨芽細胞への分化誘導を行い、ヒトとマウスの骨芽細胞分化メカニズムの相違点を解析する。さらに *Runx2* ホモ欠損マウス由来 calvaria-derived cells (Yamaguchi A, et al. J Cell Physiol 2007) を用いて、既存の細胞からの骨芽細胞分化メカニズムと iPS 細胞からの分化メカニズムの違いを明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では遺伝子編集による *Runx2* ホモ欠損ヒト iPS 細胞 (*Runx2*<sup>-/-</sup> hiPSCs) を樹立し、既に作成している *Runx2* ホモ欠損マウス iPS 細胞 (*Runx2*<sup>-/-</sup> miPSCs) とともに骨芽細胞へ分化誘導を行い、*Runx2* の役割について解明する。さらに、*Runx2*<sup>-/-</sup> miPSCs と既存細胞である樹立した *Runx2* ホモ欠損マウス由来 calvaria-derived cells との骨芽細胞分化メカニズムの相違点について検討する。研究の流れとしては *Runx2*<sup>-/-</sup> hiPSCs と *Runx2*<sup>+/+</sup> hiPSCs の作成 → iPS 細胞ならびに calvaria-derived cells の骨芽細胞分化誘導 → リアルタイム PCR による骨芽細胞分化関連遺伝子の解析 → ALP 染色、von Kossa 染色による骨芽細胞分化の評価。骨芽細胞分化に関わる新規 *Runx2* 関連遺伝子の検索を行う(図 1)。

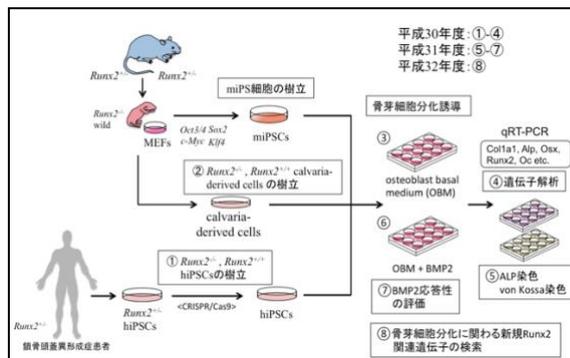


図 1 研究の流れ

### 4. 研究成果

#### (1) *Runx2* ホモ欠損マウス由来 calvaria-derived cells の樹立

胎生 18.5 日のマウス (*Runx2*<sup>-/-</sup>、*Runx2*<sup>+/+</sup>) 頭蓋骨領域に存在する線維性結合組織を採取し、採取した組織を 2×2 mm サイズにし、三次元コラーゲンゲル内で 14 日間培養を行った後、遊走した細胞を継代し calvaria-derived cells (*Runx2*<sup>-/-</sup>、*Runx2*<sup>+/+</sup>) を作成した。

#### (2) *Runx2*<sup>-/-</sup> miPSCs と *Runx2*<sup>-/-</sup> hiPSCs の骨芽細胞分化

既に樹立した *Runx2*<sup>-/-</sup> miPSCs (図 2) と我々の研究グループで既に遺伝子改変技術により作成した *Runx2*<sup>-/-</sup> hiPSCs (Saito A et al. 2018) を用いて骨芽細胞分化を行った。骨芽細胞分化については我々の研究グループで確立した方法を用いて (Ochiai-Shino H et al. 2014) 14 日間行い、サンプルの回収を行った。*Runx2*<sup>-/-</sup> miPSCs においては骨芽細胞後期の分化マーカーの発現が上昇しないことが明らかとなった。またその結果は ALP 染色や von Kossa 染色においても同様の結果を示していた。

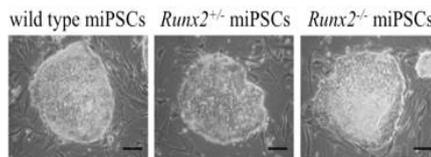


図 2 樹立したマウス iPS 細胞

#### (3) 骨分化関連遺伝子の発現プロファイル

*Runx2*<sup>-/-</sup> と *Runx2*<sup>+/+</sup> iPSCs を 14 日間骨芽細胞分化誘導したのち、回収した RNA をもとに PCR array (mouse osteogenesis) を行い、骨分化関連遺伝子の発現プロファイルの解析を行った。その結果、*Runx2*<sup>+/+</sup> iPSCs と比較して *Runx2*<sup>-/-</sup> iPSCs では 53 遺伝子で発現の低下を認め、わずか 3

遺伝子でのみ発現の上昇を認めた(図 3)。

#### (4) 遺伝子発現解析

さらに、PCR array の結果より発現上昇とて以下の著明であった遺伝子についてリアルタイム PCR にて詳しく解析を行った。また、その中で注目すべき遺伝子については *Runx2*<sup>-/-</sup> hiPSCs *Runx2*<sup>+/+</sup> hiPSCs とで確認したところマウス iPS 細胞での結果と一致することが確認できた。

本研究の内容は iPS 細胞を今後の再生医療での応用する上で基盤となるデータである。細胞をソースとした再生療法を行う上で、効率よく目的の遺伝子へ分化誘導を行うことは重要であり、そのためには詳しい分化メカニズムの解明が必須である。さらに本研究で樹立したマウス iPS 細胞は遺伝子疾患モデルとして、その疾患の病態解明や装薬につながる可能性を秘めている。さらに、マウスと人の細胞で同様の知見が示されれば、さらなる研究の足掛かりにもつながると考える。本研究においては iPS 細胞からの骨芽細胞分化における *Runx2* の役割についてさらなる詳細なデータを解析し、遺伝子疾患の病態解明のみならず創薬、再生療法へとつなげていく必要があると考える。

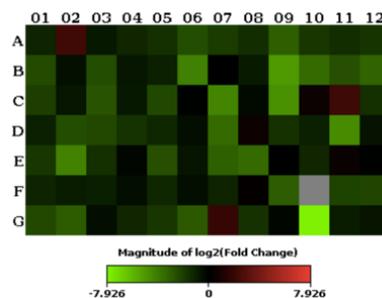


図 3 骨分化関連遺伝子の発現プロファイル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideto Aoki
2. 発表標題 Investigating the role of RUNX2 in osteoblastic differentiation of mouse and human iPSCs.
3. 学会等名 International Osteology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideto Aoki
2. 発表標題 Elucidating the role of RUNX2 in osteoblastic differentiation of iPSCs
3. 学会等名 IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------