

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10056

研究課題名(和文) Runx2とWnt Signalingによる骨芽細胞分化・機能制御の解明

研究課題名(英文) The interaction between Runx2 and Wnt Signaling regulates the osteoblastic differentiation and function.

研究代表者

永野 健一 (Nagano, Kenichi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：60834348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨代謝機構は骨形成を司る骨芽細胞と骨吸収を司る破骨細胞により厳密に制御されており、その破綻は骨関連疾患の誘因となる。本研究の目的は、骨芽細胞分化に必須とされる転写因子Runx2と情報伝達系Wnt Signalingの古典的経路の必須因子 β -cateninに着目し、これらの連関による骨代謝制御機構の解明を目指すことである。骨芽細胞特異的遺伝子欠損マウスを用いた解析により、過去の研究とは異なり、 β -cateninの欠失が骨芽細胞及び破骨細胞の増加を誘導し、結果として骨量減少を惹起することが明らかとなった。本成果から、 β -cateninによる未知のメカニズムが骨代謝制御に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Wnt signalingの骨代謝における役割、特に骨芽細胞分化において、これまでの報告とは異なる未知のメカニズムが存在することが示唆された。骨代謝機構はその破綻が骨関連疾患へ直結しており、疾患の治療や予防を達成するためには骨代謝機構の包括的理解が必要であるが、未解明な点が多く残されている。本研究で得られた成果はその一端を明らかにするものであり、未知のメカニズムの解明を目指す新たな学術的展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Trabecular bone volume is strictly regulated by the process called bone homeostasis, served by bone-forming osteoblasts and bone-resorbing osteoclasts. Unbalanced bone homeostasis results in initiation of bone related diseases such as osteoporosis. This study focuses on the transcription factor Runx2, which is considered to be essential for osteoblastogenesis, and β -catenin, which serves as a central factor for canonical Wnt signaling. The purpose of this study is to investigate the role of these factors and their interaction in osteoblastogenesis and bone homeostasis machinery. The analysis of mice with osteoblast-specific deletion of either Runx2, β -catenin or both revealed that the loss of β -catenin induced significant increase in number of osteoblasts and osteoclasts, resulting in lower trabecular bone mass compared to wildtype mice. From this study, it is suggested that unknown mechanism by β -catenin might be involved in osteoblastogenesis and bone homeostasis.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨代謝 骨芽細胞 骨形態計測 Wnt Signaling Runx2

1. 研究開始当初の背景

骨代謝維持機構は骨形成を担う骨芽細胞と骨吸収を担う破骨細胞により厳密に調節されており、これにより骨格系の生体支持組織としての機能が保たれている。すなわち、骨代謝維持機構の破綻は骨関連疾患の誘因となっている。これを予防、または治療するためには、骨代謝維持機構の詳細な理解が必須であるが、現在においても未解明な点が多く残されている。この骨代謝維持機構において重要な役割を担っているのが転写因子 Runx2 と情報伝達系 Wnt Signaling である。

転写因子 Runx2 は骨芽細胞分化のマスターレギュレーターであることが報告されている。過去の報告において、骨芽細胞への分化後の Runx2 の役割を明らかにするために Col1 プロモーターを用いた骨芽細胞特異的 Cre マウスを用いて骨芽細胞特異的 Runx2 欠失マウスを解析したところ、骨量及び骨形成の異常が見られなかった (引用文献 (1))。しかしながらこの報告において用いられた骨芽細胞特異的 Cre マウスは特異性、及び効率が低いことが指摘されていたことから、新規に作出された Col1-GFP プロモーターを用いた骨芽細胞特異的 Cre マウスによる Runx2 欠失マウスを作成、解析したところ、骨量の減少が確認された。

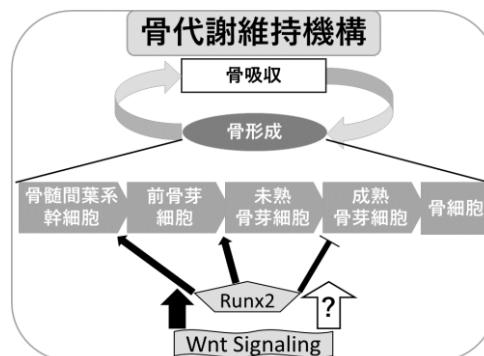


図 1. 本研究課題の背景

情報伝達系 Wnt Signaling には beta-catenin を経由する古典的経路と経由しない非古典的経路が存在し、Wnt Signaling の活性化が骨代謝維持機構を正に制御することが知られている。また古典的経路と Runx2 との相互作用により骨芽細胞分化が亢進することが報告されている。一方で過去の報告において骨芽細胞特異的 beta-catenin 欠失マウスでは骨芽細胞数に影響がなく、破骨細胞数増加により骨量減少をきたすことが示された (引用文献 (2))。しかしながら、この報告で用いられた骨芽細胞特異的 Cre マウスは先述した Cre マウスと同様の問題を内包していることから、beta-catenin 欠失による骨代謝維持機構への影響、また beta-catenin と Runx2 の連関による骨代謝維持機構への影響は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨芽細胞分化のマスターレギュレーターである Runx2 と Wnt Signaling の骨芽細胞における連関を明らかにし、その骨代謝維持機構における役割を解明することである。具体的な方法として、新規に作出された、Col1-GFP プロモーターを用いた骨芽細胞特異的 Cre マウスを用いて beta-catenin 欠失マウス、及び beta-catenin と Runx2 の両欠失マウスを作成する。作出したマウスを用いた各種の解析により、生体内の骨代謝維持機構における beta-catenin、及び beta-catenin と Runx2 の連関の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス

beta-catenin flox マウス (C57BL/6J background、以下 bCat flox) を米国 Jackson lab より購入し、すでに利用可能であった骨芽細胞特異的 Col1GFP Cre マウス (C57BL/6N background) と交配し、Col1GFPCre;bCat flox/+マウスを作成した。このマウスと bCat flox マウスを交配することで、野生型 bCat flox マウスおよび Col1GFPCre;bCat cKO マウス (Mixed background) を作成した。

また Runx2 flox マウス (C57BL/6N background) および Col1GFPCre;bCat flox/+マウスをそれぞれ bCat flox マウスと交配することにより bCat/Runx2 double flox マウス (以下、double-flox マウス) および Col1GFPCre;Runx2 flox/+;bCat flox/+マウスを作成し、これらを交配することにより、野生型 double-flox マウスおよび、Col1GFPCre;Runx2 flox;bCat flox マウス (以下、Col1GFPCre;double-cKO マウス) (Mixed background) を作成した。全ての動物実験計画は長崎大学動物実験委員会による審査、承認を受けた。また遺伝子組み換え動物の取り扱いに当たっては、長崎大学組み換え DNA 実験安全委員会による審査、承認を受けた。

(2) 胎児マウスを用いた全骨格標本の作製

生後 0 日の Col1GFPCre;bCat cKO マウス、Col1GFPCre;double-cKO マウス及びこれらに対する野生型の同腹仔より全骨格標本作製した。マウス屠殺後、皮膚および体内諸器官を除去し、95%エタノールにて一晩固定した。固定後、0.03%アルーシヤンブルー溶液にて 1 日染色、2%水

酸化カリウム溶液にて1日脱色、0.005%アリザリンレッド溶液にて1日染色、1%水酸化カリウム20%グリセロール溶液にて脱色を行い、軟組織の透明化を行った。

(3) 成体マウスを用いた長管骨、腰椎の解析

8週齢のCol1GFPcre;bCat cKOマウス、Col1GFPcre;double-cKOマウス及びこれらに対する野生型の同腹仔より骨組織を摘出し、解析を行った。屠殺に先立ち、屠殺5日前にカルセイン(16mg/kg)、屠殺2日前にデメクロサイクリン(40mg/kg)を背部皮下注射し、屠殺15時間前より絶食した。屠殺直前に体重測定を行い、ペントバルビタールナトリウム(150 mg/kg)の腹腔内投与によりマウスを安楽死させ、右後肢より大腿骨及び脛骨、また腰椎を摘出した。摘出した骨組織は70%エタノールに浸漬し、3日間固定した。固定した骨組織を用いて、以下の解析を行った。

① 長管骨での長軸方向の長さ解析

μ FX-1000(富士フィルム)を用いて大腿骨および脛骨のX線写真を撮影した(25 kV、100 μ A)。撮影したX線写真をGIMP softwareにて解析し、長軸方向の長さを計測した。

② 大腿骨のマイクロCT解析

Skyscan 1272(Bruker社)を用いて、大腿骨遠位端の二次海綿骨、及び中央部の皮質骨を解析した(70kV、142 μ A、解像度10 μ m)。海綿骨の解析は、遠位端成長板より300 μ m上方から2300 μ m上方を関心領域とし、皮質骨を除いた海綿骨を計測した。皮質骨の解析は、遠位端成長板より4000 μ m上方から6000 μ m上方を関心領域とし、海綿骨を除いた皮質骨を計測した。

③ 脛骨、腰椎の骨形態計測解析

固定した脛骨、および腰椎をエタノールにて脱水後、GMA-MMA樹脂包埋を行った。マイクロトームを用いて4 μ mの厚さで骨組織非脱灰切片を作成し、Von Kossa染色、0.05%トルイジンブルー染色を行った。Histometry RT CAMERA(システムサプライ社)を用いた骨形態計測解析として、Von Kossa染色切片は石灰化骨の観察、トルイジンブルー染色切片は静的パラメータの計測に用いた。また無染色切片を準備し、動的パラメータ計測に用いた。関心領域は、脛骨近位端成長板、または腰椎(L3またはL4)頭側成長板より300 μ m下方の幅700 μ m X高さ780 μ mの領域とした。構造パラメータは動的パラメータおよび静的パラメータ計測時にそれぞれ得られた値の平均値を用いた。構造パラメータ、動的パラメータ、静的パラメータの表記はアメリカ骨代謝学会による標準的命名法に準拠した。(引用文献(3))

4. 研究成果

(1) 胎児マウス全骨格標本の解析

生後0日におけるCol1GFPcre;bCat cKOマウスの骨格形成を全骨格標本により野生型と比較したところ、骨格形成に有意な差を認めなかった。またCol1GFPcre;double-cKOマウスにおいても野生型との有意な差を認めなかった。

(2) 成体マウス長管骨の長さ解析

成体マウスでは、野生型マウスとCol1GFPcre;bCat cKOマウスまたはCol1GFPcre;double-cKOマウスとの間で体重に有意な差は見られなかった。続いて、X線写真を用いて成体マウスの長管骨の長さを解析したところ、Col1GFPcre;bCat cKOマウスと野生型マウス、Col1GFPcre;double-cKOマウスと野生型マウスで有意な差を認めなかった。

(1)、(2)の結果から、骨芽細胞におけるbeta-cateninの欠失は胎生時の骨格形成、およびその後の長管骨の成長に影響しないことが示唆された。

(3) 成体マウス大腿骨のマイクロCT解析

マイクロCTを用いて成体マウス大腿骨を解析した。Col1GFPcre;bCat cKOマウスでは海綿骨量が減少する傾向が示された(図2-a)が、皮質骨では有意な差は認められなかった(図2-b)。

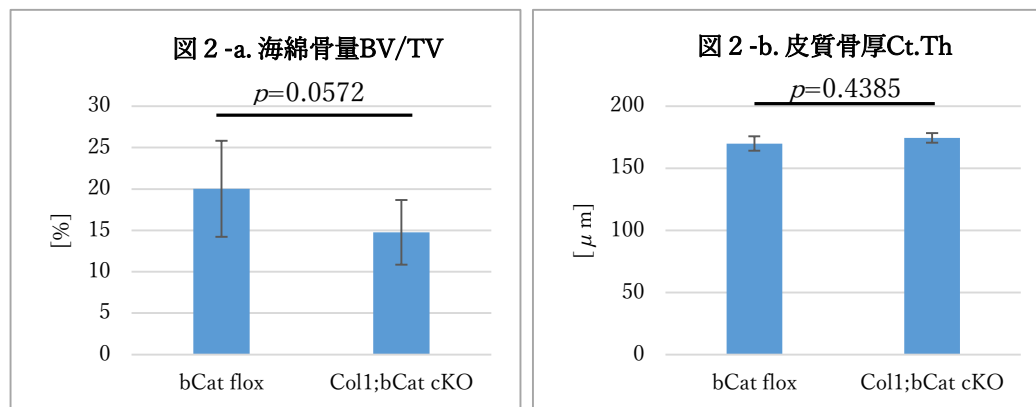


図2. Col1GFPcre;bCat cKOマウスにおけるマイクロCT解析

また Col1GFPcre;double-cKO マウスでは野生型と比較して海綿骨量に有意な減少が見られた (図 3-a)。一方、皮質骨では有意な差は見られなかった (図 3-b)。

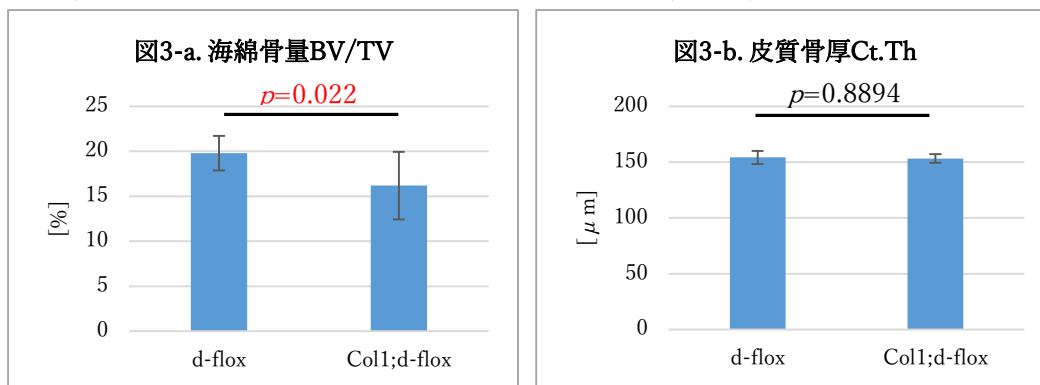


図 3. Col1GFPcre;double-cKO マウスにおけるマイクロ CT 解析

(4) 成体マウス脛骨の骨形態計測解析

骨形態計測法により、成体マウス脛骨の組織学的解析を行った。Col1GFPcre;bCat cKO マウスでは海綿骨量が減少する傾向が示された (図 4-a, 図 4-b) 一方、骨形成速度、及び骨芽細胞数の上昇傾向が見られた (図 4-c)。また破骨細胞数の有意な増加が認められた (図 4-d)。

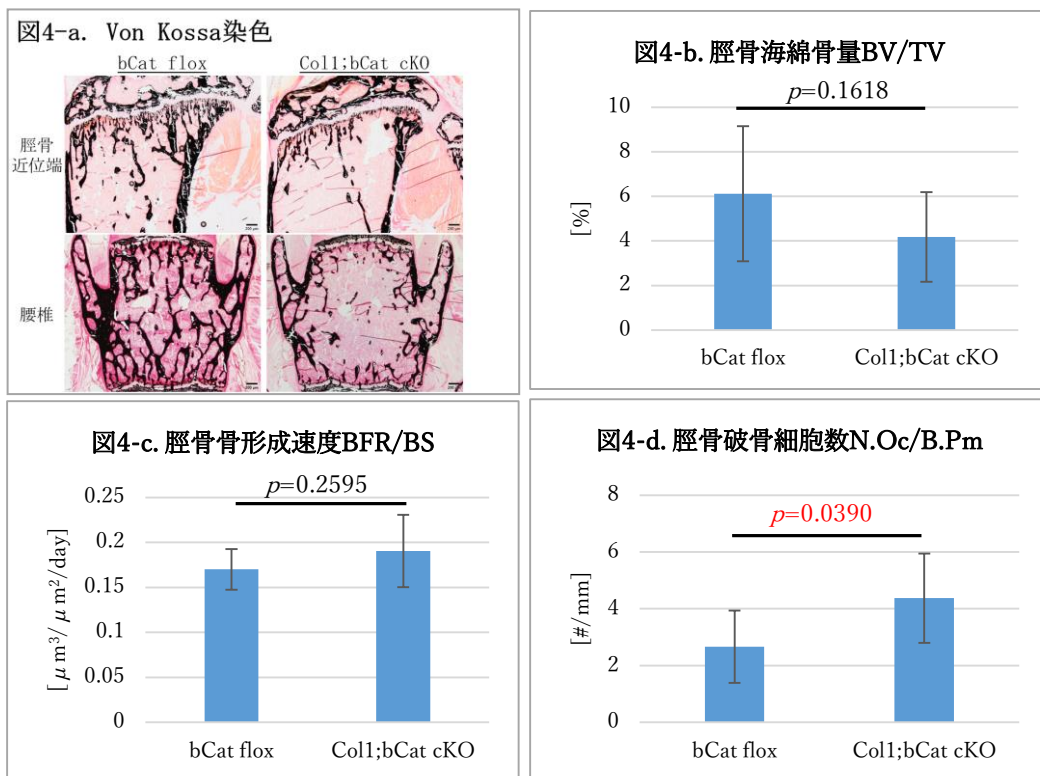


図 4. Col1GFPcre;bCat cKO マウスにおける骨形態計測解析

成体マウス腰椎においても、Col1GFPcre;bCat cKO マウスでは海綿骨量の減少、骨形成速度および骨芽細胞数の増加、破骨細胞数の増加が認められた。

Col1GFPcre;double-cKO マウスに関しては、解析が進行中である。

(3)、(4) の結果から、骨芽細胞における beta-catenin の欠失により、骨芽細胞、破骨細胞が増加し、高骨代謝回転を誘導することにより骨量が減少傾向を示すことが示唆された。また Col1GFPcre;double-cKO マウスでは、beta-catenin に加えて Runx2 を骨芽細胞特異的に欠失させることで骨代謝回転が変化し、海綿骨量が有意に減少することが示唆された。Col1GFPcre;double-cKO マウスの解析を継続することで、骨芽細胞における beta-catenin と Runx2 との協調作用が骨代謝に与える影響を明らかにできると考えられる。

<引用文献>

- (1) Takarada T et al. J Bone Miner Res. 28(10):2064-9. 2013.
- (2) Glass DA 2nd et al. Dev Cell. 8(5):751-64. 2005.
- (3) Dempster DW et al. J Bone Miner Res. Jan;28(1):2-17. 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Qin Xin, Jiang Qing, Nagano Kenichi, Moriishi Takeshi, Miyazaki Toshihiro, Komori Hisato, Ito Kosei, Mark Klaus von der, Sakane Chiharu, Kaneko Hitomi, Komori Toshihisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Runx2 is essential for the transdifferentiation of chondrocytes into osteoblasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagano Kenichi	4. 巻 55
2. 論文標題 R-spondin signaling as a pivotal regulator of tissue development and homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 80～87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2019.03.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永野 健一、山名 慶、斎藤 広章、Parkman Virginia, Gori Francesca, Baron Roland
2. 発表標題 R-spondin3による骨形成制御
3. 学会等名 日本骨代謝学会 第4回Skeletal Science Rtreat.
4. 発表年 2019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
---------	---------