

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10063

研究課題名（和文）新概念に基づく骨芽細胞分化制御機構の解明と鎖骨頭蓋骨異形成症に対する治療薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the regulatory mechanism of osteoblast differentiation based on a new concept and development of therapeutic agents for cleidocranial dysplasia.

研究代表者

齋藤 暁子 (Saito, Akiko)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90722835

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨芽細胞分化のマスター転写因子であるRUNX2のヘテロ遺伝子変異を有する鎖骨頭蓋骨異形成症患者由来iPS細胞を用いて、RUNX2による新しい骨芽細胞分化制御機構について検討を行った。その結果、RUNX2はiPS細胞からの骨芽細胞分化過程において、核膜タンパク質の発現を制御することで核形態を正常に維持し、さらにLamin Aとクロマチンとの結合を正常に機能させることで、骨芽細胞分化に関わる遺伝子群の発現を調節すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞分化におけるRUNX2による核形態の維持は、その後の骨芽細胞分化に関わる遺伝子発現制御が正常に行われるために重要であると考えられた。これにより、RUNX2遺伝子変異に起因する鎖骨頭蓋骨異形成症（CCD）において、核膜タンパク質の異常によって引き起こされる疾患であるラミノパチーで使用される治療薬がCCDでも応用可能か検討できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated a novel regulatory mechanism of osteoblast differentiation by RUNX2 using iPS cells derived from a patient with clavicular skull dysplasia who had a heterozygous mutation in RUNX2, a master transcription factor for osteoblast differentiation. The results suggest that RUNX2 regulates the expression of genes involved in osteoblast differentiation during osteoblast differentiation from iPS cells by regulating the expression of nuclear membrane proteins to maintain normal nuclear morphology, as well as the normal function of Lamin A and chromatin binding.

研究分野：生化学

キーワード：骨芽細胞分化 RUNX2 疾患特異的iPS細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

鎖骨頭蓋骨異形成症 (CCD) は RUNX2 遺伝子のヘテロ欠損変異に起因する骨芽細胞分化異常を伴う遺伝性骨疾患である。申請者は CCD 患者に由来する iPS 細胞 (RUNX2<sup>+/-</sup>) を作製し、疾患 iPS 細胞評価のために遺伝子編集技術によって遺伝的背景が同一のコントロール iPS 細胞 (RUNX2<sup>+/+</sup>) とノックアウト細胞 (RUNX2<sup>-/-</sup>) を樹立した。解析の結果、CCD-iPS 細胞で、骨芽細胞分化の遅延のほか、電子顕微鏡観察で細胞の核形態異常を偶然発見した。これらの RUNX2 欠損細胞について、核膜タンパク質の遺伝子発現を網羅的に調べると、核形態維持に必須の核ラミナ構成成分 Lamin A と、アクチン結合ドメインをもつ Nesprin1 の著しい発現低下が観察された。Lamin A の全身性ノックアウトマウスでは骨密度の低下が起きることが報告されていることから、申請者は RUNX2 欠損に伴う核膜タンパク質の発現低下が骨芽細胞分化異常を引き起こしているのではないかと仮説を考えた。そこで核膜裏打ちタンパク質である Lamin を始めとする核膜タンパク質の骨芽細胞分化における役割についてヒトおよびマウスの Runx2 KO-iPS 細胞およびノックアウトマウスを用いて詳細な解析をしようという着想に至った。

### 2. 研究の目的

鎖骨頭蓋骨異形成症 (CCD) は根本的な治療法が存在しないためにさらなる病態解明が求められている。核膜タンパク質の異常はラミノパチーという疾患を引き起こすことが知られているが、現在までに硬組織疾患と核形態との関連性については全く知られていない。本研究では、RUNX2 による核膜構造の維持を介して転写制御が適切に行われるという新概念に基づいた骨芽細胞分化制御機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) RUNX2 KO-iPS 細胞への核膜タンパク質の過剰発現

Lamin A (LMNA) または Nesprin 1 (SYNE1) を発現するレンチウイルスを作製し、RUNX2 KO-iPS 細胞へ感染させ過剰発現させたのち、核形態異常や骨芽細胞分化能が回復するか調べた。

#### (2) 原子間力顕微鏡を用いた核強度の測定

RUNX2 (+/+ , +/- , -/-) iPS 細胞の骨芽細胞分化過程における核の硬さを、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて解析した。

#### (3) 機械的シグナル伝達の解析

Nesprin 1 や Lamin A などの核膜タンパク質は細胞外の機械的刺激を細胞内へ伝達する役割があり、中でも Emerin はリン酸化することでシグナルを伝達すると考えられている。そこで骨芽細胞分化誘導後の細胞を足場の硬さを変えた基質上に播種することで機械的刺激を与え、24 時間後に細胞を回収しタンパク質抽出を行った。その後、抗 Emerin 抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行いウェスタンブロット解析を行った。

(4) Lamin A はクロマチンに結合し、遺伝子発現を制御していることが知られている。抗 Lamin A 抗体を用いて CUT&RUN 解析を行い、Lamin A とクロマチンとの転写開始点 (TSS) 付近における結合領域について調べた。

#### (5) シングルセル RNA-seq 解析

RUNX2<sup>-/-</sup> iPS 細胞および Nesprin1 を過剰発現させた RUNX2<sup>-/-</sup> iPS 細胞で骨芽細胞分化誘導後の遺伝子発現についてシングルセル RNA-seq 解析を用いて網羅的に解析した。

### 4. 研究成果

(1) iPS 細胞から骨芽細胞分化させると、RUNX2<sup>-/-</sup> 細胞では分葉状の異常な形態を示す核が観察された。また qPCR 解析では、核膜タンパク質である Nesprin 1 (SYNE1) および Lamin A (LMNA) 遺伝子の発現が、RUNX2<sup>+/+</sup> 細胞に比べ RUNX2<sup>-/-</sup> 細胞で有意に減少していた。

(2) 原子間力顕微鏡による核の強度測定では、RUNX2<sup>+/+</sup> 細胞に比べ RUNX2<sup>-/-</sup> 細胞で核の弾性率は低下していたが、Lamin A (LMNA) および Nesprin 1 (SYNE1) を過剰発現させると核の弾性率は回復した (図 1)。

(3) 機械的刺激を与えると、RUNX2<sup>+/+</sup> 細胞に比べ RUNX2<sup>-/-</sup> 細胞では Emerin のリン酸化が低下していた。しかしながら、Nesprin 1 (SYNE1) を過剰発現

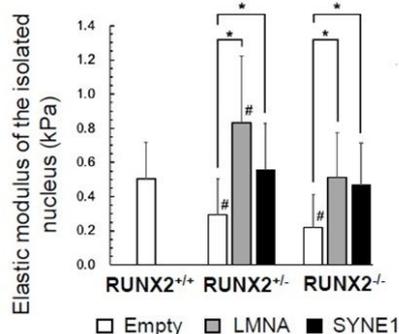


図1 核強度の測定

させた細胞では、RUNX2<sup>+/+</sup> 細胞と同程度まで Emerin のリン酸化が回復した。

( 4 ) CUT&RUN により Lamin A とクロマチンとの結合領域を調べた結果、RUNX2<sup>+/+</sup> 細胞では TSS 付近に Lamin A が濃縮していた。RUNX2<sup>-/-</sup> 細胞では TSS 付近の Lamin A 結合が減少していたが、Nesprin 1(SYNE1)の過剰発現により TSS 付近に Lamin A の濃縮がみられた。

( 5 ) シングルセル RNA-seq 解析の結果、前骨芽細胞様の細胞集団の割合が、RUNX2<sup>-/-</sup> 細胞でも Nesprin 1 (SYNE1) の過剰発現で RUNX2<sup>+/+</sup> 細胞と同程度まで回復した ( 図 2 ) 。

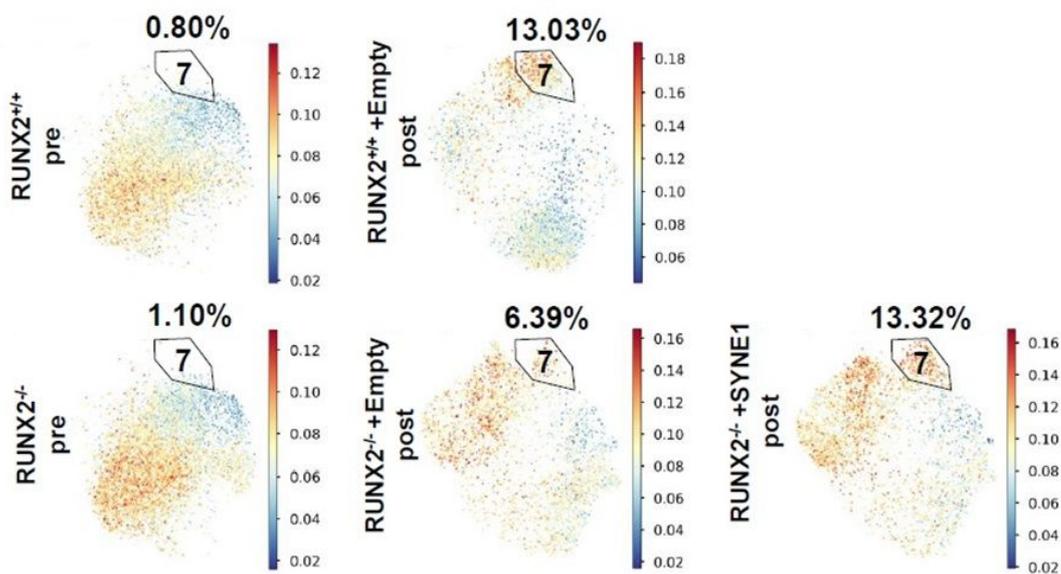


図2 シングルセルRNA-seq解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤暁子, 大木章生, 澤田隆, 中村貴, 小野寺晶子, 末石研二, 山口朗, 東俊文
2. 発表標題 鎖骨頭蓋骨異形成症特異的iPS細胞を用いた骨分化におけるRUNX2と核膜タンパク質による転写制御の検討
3. 学会等名 第307回東京歯科大学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤暁子, 中村 貴, 小野寺晶子, 間 奈津子, 岡田 寛之, 北條 宏徳, 長山 和亮, 東俊文
2. 発表標題 RUNX2による核膜関連タンパク質の発現調節を介した骨芽細胞分化制御機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤暁子, 中村 貴, 小野寺晶子, 間 奈津子, 岡田 寛之, 北條 宏徳, 長山 和亮, 東俊文
2. 発表標題 RUNX2による核膜関連タンパク質の発現調節を介した骨芽細胞分化制御機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
研究分担者	小野寺 晶子  (Onodera Shoko)  (90637662)	東京歯科大学・歯学部・講師    (32650)	

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
---------	---------