

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24105

研究課題名(和文) 蝶形骨骨格形成初期におけるRunx2の細胞増殖機構の解明

研究課題名(英文) Runx2 is an important transcription factor for mesenchymal cell proliferation and chondrogenesis in the secondary cartilage of sphenoid bone

研究代表者

三友 啓介 (Mitomo, Keisuke)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90844051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Runx2は骨芽細胞分化に必須な転写因子である。その一方で、Runx2は間葉系細胞・前骨芽細胞の増殖に対して抑制的に働くという報告が多く認められるしかし申請者は先行研究において胎生初期のRunx2ヘテロ欠損マウスでは、蝶形骨翼状突起内側板領域の間葉系細胞の凝集が低下することを見出した。そしてRunx2は間葉系細胞・前骨芽細胞の増殖を正の方向に制御するとの仮説を立てた。そして本研究結果からRunx2の投与量の減少に伴い、蝶形骨の二次軟骨領域における間葉系細胞の増殖活性が低下することが明らかになり、Runx2が二次軟骨における間葉系細胞の増殖活性を制御してい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

本研究はRunx2欠損マウスの蝶形骨内側翼状突起において、Runx2の投与量の減少に伴い、蝶形骨の二次軟骨領域における間葉系細胞の増殖活性が低下し、二次軟骨の軟骨細胞への分化が確実に阻害されることを明らかにした。これらの結果は、Runx2が蝶形骨の二次軟骨における間葉系細胞の増殖活性と軟骨細胞への分化を積極的に制御していることを示唆している。本研究により、Runx2の細胞増殖機能に関する新たな知見が得られると同時に、RUNX2が関わる骨形成異常を呈する遺伝性疾患の治療の新たな基盤構築が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Runx2 is a transcription factor that is essential for osteoblast differentiation. However, in a previous study, the applicant found that the aggregation of mesenchymal cells in the medial pterygoid process region of the sphenoid bone was reduced in early embryonic Runx2 heterozygous-deficient mice. We hypothesized that Runx2 positively regulates the proliferation of mesenchymal cells and preosteoblasts. And the results of this study showed that the proliferative activity of mesenchymal cells in the secondary cartilage region of the sphenoid bone decreased with decreasing the dose of Runx2, suggesting that Runx2 regulates the proliferative activity of mesenchymal cells in secondary cartilage.

研究分野：Pulp biology

キーワード：Runx2 Sphenoid bone

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 (Cleidocranial dysplasia : CCD)は *RUNX2*ヘテロ変異による常染色体優性遺伝性の疾患であり、膜性骨化に由来する様々な骨の成長が遅延し、低形成を引き起こす。申請者は、蝶形骨翼状突起内側板が膜性骨化で形成されることに着目し、CCD患者でその形成異常が見られるのではないかと仮説を立てた。そして、CCD患者とCCDモデルマウスである *Runx2*ヘテロ欠損マウスの蝶形骨翼状突起内側板を解析したところ、いずれも正常に比べて明らかな蝶形骨翼状突起内側板の形成不全を見出し、蝶形骨翼状突起内側板はCCDの標的骨格の一つであることを初めて明らかにした (Mitomo et al. BONE 2019 図1参照)。

さらに申請者は、この研究の過程で胎生初期の *Runx2*ヘテロ欠損マウスでは野生型に比べて、翼状突起内側板領域の間葉系細胞の凝集が遅延し、細胞数も少ないことに気がついた。一般的に細胞の増殖と分化は互いに相容れない関係にあると考えられており、骨芽細胞の分化過程でも、*Runx2*は間葉系細胞あるいは前骨芽細胞の細胞増殖に対して抑制的に機能すると考えられている。しかし、この考え方では申請者が見出した「ヘテロ欠損マウスでは凝集塊の細胞数が少ない」という現象を説明するのが困難である。そのため、本研究では「発生過程では *Runx2*は細胞増殖と細胞分化の両機構を制御しているのではないか」ということを研究課題の核心をなす学術的「問い」と設定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格形成初期において *Runx2*が間葉系細胞・前骨芽細胞の増殖をどのように制御しているかを明らかにすることである。*Runx2*のハプロ不全によって間葉系細胞の増殖が低下したことを示唆するが、*Runx2*は細胞増殖に対して抑制的な機能をもつと過去に報告されており、申請者の仮説とは相反するものである。*Runx2*が細胞増殖に対して正の方向に制御するということが明らかにできれば、*Runx2*の細胞増殖に対する新たな知見が得られ、*RUNX2*が関わる骨形成異常を呈する遺伝性疾患の治療の新たな基盤構築が期待できる。

3. 研究の方法

実験に使用した動物は *Runx2*^{+/+}と *Runx2*^{+/-}マウス(胎生14.5、18.5日)と *Runx2*^{-/-}マウス(胎生18.5日)である。それぞれ通法に従いパラフィンブロックを作製し蝶形骨翼状突起内側板を関心領域としてマイクロトームにて切片を作製した。組織学的評価をするためにヘマトキシリン・エオジン染色、トルイジンブルー染色をおこなった。またそれぞれのタイプのマウスの細胞増殖能を比較するために抗PCNA抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。次にそれぞれの3タイプの翼状突起内側板の成長を比較するために、胎生18.5日における蝶形骨翼状突起内側板の長径・幅径をHE染色切片を用いて計測した。

4. 研究成果

(1) *Runx2*^{+/+}マウスと *Runx2*^{+/-}マウスの発育初期の蝶形骨のMPPにおける組織学的変化の比較

Runx2^{+/+}マウスでは、E14.5までに将来のMPPを形成する領域に間葉系細胞の凝縮が見られ

たが、Runx2^{+/-}マウスではこのような現象は見られなかった。Runx2^{+/+}マウスとRunx2^{+/-}マウスのトルイジンブルー染色では、MPPを形成する領域にメタクロマジーは観察されなかった。抗Runx2抗体を用いて染色したところ、どちらのマウスでも蝶形骨体の軟骨周囲にRunx2の発現が認められました。しかし、MPPの領域では、Runx2^{+/-}マウスのRunx2の発現は、野生型マウスのそれよりも低かった。

(2) Runx2欠損マウスにおけるMPPの組織学的および免疫組織化学的解析。

Runx2が二次軟骨の細胞分化や増殖にどのように関与しているかを調べるために、E18.5のRunx2欠損マウスの蝶形骨のMPPの組織学的解析を行った。トルイジンブルー染色では、蝶形骨の体部にメタクロマジーが観察された。さらに、蝶形骨体のすぐ下のMPP領域には、間葉系細胞の凝縮が観察された。しかし、トルイジンブルー染色では、MPP領域にはメタクロマジーは認められなかった。また、E14.5では間葉系細胞の凝縮が野生型に比べて少ない傾向が見られた。

次に、Runx2欠損マウスの内側翼状突起領域における細胞の増殖活性を調べるために、抗PCNA抗体による免疫組織化学的染色を行った。Runx2欠損マウスでは、MPP領域の間葉系細胞の凝結部に数個のPCNA陽性細胞が見られた。

(3) Runx2^{+/+}, Runx2^{+/-}, Runx2^{-/-}マウスにおける翼状突起の長軸と幅、MPP細胞の増殖活性の解析。

Runx2^{+/+}, Runx2^{+/-}, Runx2^{-/-}マウスでMPPの大きさを幅と長軸に分けて測定した。E18.5における各タイプの形態的特徴は以下の通りである。Runx2^{+/+}マウスの内側翼突出部は、上3分の2が海綿骨、下3分の1が軟骨で占められた構造を呈していた。Runx2^{+/-}マウスでは、MPPの中心部に骨様組織があり、その周囲は軟骨で囲まれていた。しかし、Runx2^{-/-}マウスのMPPは、軟骨には分化せず、間葉系細胞が凝縮した段階で成長・分化が停止していた。長軸については、ヘテロタイプの方が有意に短いことがわかった。また、Runx2^{-/-}マウスは他の2つの表現型のMPPよりも明らかに短かった。幅については、Runx2^{+/+}マウスとRunx2^{+/-}マウスのMPPの幅には大きな違いはなかったが、Runx2^{-/-}マウスのMPPの平均長さは他の2つの表現型よりも短い幅を示した。

抗PCNA抗体を用いた免疫組織化学的染色を行い、E18.5までの各タイプにおける細胞増殖活性の違いを解析した。Runx2^{+/+}マウスでは、MPPの上部2/3の骨部と下部1/3の軟骨部に、それぞれPCNA陽性細胞が散在していた。同様に、Runx2^{+/-}マウスでは、PCNA陽性細胞はMPP全体に散在していた。Runx2^{-/-}マウスでは、MPP領域での間葉系細胞の凝縮は小さく、PCNA陽性細胞もわずしか見られなかった。MPPにおけるPCNA陽性細胞率を表現型間で比較すると、Runx2^{+/+}マウスとRunx2^{+/-}マウスの間には有意な差はなかったが、Runx2^{+/-}マウスでは陽性率が低い傾向にあった。しかし、PCNA陽性率は、Runx2^{+/+}マウスでは他の2つの表現型に比べて明らかに低かった。

このように、MPPの細胞増殖活性はRunx2^{+/+}マウス、Runx2^{+/-}マウス、Runx2^{-/-}マウスの順に低下し、MPPの成長・発育にも障害が見られた。

これらの結果から、Runx2欠損マウスの蝶形骨内側翼状突起において、Runx2の投与量の減少に伴い、蝶形骨の二次軟骨領域における間葉系細胞の増殖活性が低下し、二次軟骨の軟骨細胞への分化が確実に阻害されることを明らかにした。これらの結果は、Runx2が蝶形骨の二次軟

骨における間葉系細胞の増殖活性と軟骨細胞への分化を積極的に制御していることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

現在論文（査読有）投稿中である。

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