

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09819

研究課題名(和文) ノックアウトマウスとレポーターマウス作製によるType I Runx2の機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of Type I Runx2 by generating knockout mice and reporter mice

研究代表者

松尾 友紀 (Matsuo, Yuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員

研究者番号：40792601

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)：Runx2は、骨形成に必須の転写因子である。Runx2は、2つのプロモーター(P1、P2)によって転写が制御されており、これまでの研究から、P2プロモーターから転写されるType I Runx2が骨形成に重要な働きをすることが推測される。

本研究では、P2プロモーターを欠失・変異させ、Type I Runx2ノックアウトマウスを作製した。このマウスの10週齢でのマイクロCTの結果では、海綿骨、皮質骨領域共に野生型と比較して、有意な差はなかった。胎生15.5日と18.5日の骨格標本では、野生型と比較して骨・軟骨形成に明確な差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人口の高齢化が進むにつれ、骨粗鬆症および変形性関節症は、重要な健康問題となっている。骨・軟骨形成に必須の転写因子Runx2の骨格形成機構の解明は、新規の骨粗鬆症薬および変形性関節症薬の開発につながる非常に有用な研究であり、社会的意義がある。今回の方法では、Type I Runx2の機能を明らかにできなかったが、その解明は骨格形成機構の理解に大きく貢献し、学術的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：Runx2 is a major regulator of osteoblast and chondrocyte differentiation, and is essential for bone formation. Runx2 transcription is regulated by two promoters (P1 and P2). Type II Runx2 knockout mice transcribed from the P1 promoter have relatively milder bone formation abnormalities than Runx2 knockout mice. This suggests that Type I Runx2, which is transcribed from the P2 promoter, plays an important role in bone formation.

In this study, we deleted and mutated the P2 promoter to generate Type I Runx2 knockout mice. Micro-CT analysis of femurs in mice at 10 weeks of age showed no significant differences in both trabecular and cortical bone compared with wild-type mice. Skeletal development on embryonic days 15.5 and 18.5, there was no difference in bone and cartilage formation compared to wild-type mice.

研究分野：細胞生物、骨代謝学

キーワード：Runx2 Type I Runx2 type II Runx2 アイソフォーム 骨形成 軟骨形成

1. 研究開始当初の背景

Runx2 は、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化、および軟骨細胞の後期分化に必須の転写因子である。Runx2 ko マウスは、骨芽細胞が存在せず、骨形成が欠損し、出生直後に致死となる。Runx2 の転写は、遠位 (P1) および近位 (P2) の2つのプロモーターにより制御されており、それぞれの転写産物から Type II、Type I Runx2 が形成される (図1)。この2つのアイソフォームは、N末端アミノ酸が数アミノ酸異なるのみで、その下流のアミノ酸配列は同一である。Runx2 は、間葉系幹細胞から発現が認められ、前骨芽細胞の段階で発現が上昇する。この早期に発現する Runx2 は、Type I Runx2 であり、P2 プロモーターから転写される。したがって、Type I Runx2 は、間葉系幹細胞から骨芽細胞系列へのコミットメントに重要と推察される。P1 プロモーターから転写される Type II Runx2 ko マウスでは骨形成は阻害されるが、Runx2 ko マウスに比べ予想外に軽度であった¹⁻³。したがって、Type I Runx2 が骨形成に重要な機能を果たすと考えられるが、その ko マウスは存在せず、機能は明らかになっていない。

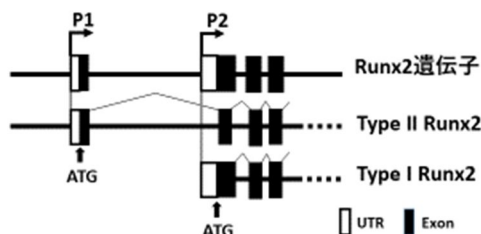


図1. Runx2の遺伝子構造

これまでに Type I Runx2 の機能を明らかにするため、P2 プロモーター欠失による Type I Runx2 ko マウスの作製を試みてきた。まず、Type I Runx2 の ATG 上流 6.3kb の様々な DNA フラグメントを用いてレポーターアッセイを行い、種間でホモロジーの高い ATG の 5' 側 1.9 kb の領域が転写活性に重要であることを明らかにした。次に ATG 上流 2.5kb を欠失させた Runx2 P2 2.5kb ko マウスを作製した。10 週齢で大腿骨マイクロ CT 解析を行ったが、海綿骨、皮質骨ともに野生型マウスと差を認めなかった。そこで、ATG 上流 24kb を欠失させた Runx2 P2 24kb ko マウスを作製したが、10 週齢で海綿骨は増加、6 ヶ月齢で皮質骨が減少していた。すなわち、両マウスともに予想した P2 ko マウスの表現型を示さなかった。その原因を探るために、転写開始点の同定と mRNA の定量ができるトランスクリプトーム解析 Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) を、18.5 日の頭蓋冠を用いて行った。野生型マウスの転写開始点は、3' 側では第一 ATG の下流 9 bp にあり、それから上流約 1.1 kb にわたって、多数存在した。Runx2 P2 2.5kb ko マウス、Runx2 P2 24kb ko マウスでは、ともに欠失領域の 5' 側と 3' 側で転写が起きていたが、24kb ko マウスでは全体に発現レベルは低下していた。また、24kb ko マウスでは、欠失領域上流の転写開始点の 27 塩基上流に TATA box が存在した。どちらの欠損マウスでも欠損部下流 41bp 内に、転写開始点が認められ、欠失後もこの 41bp に RNA ポリメラーゼ複合体が結合し、転写が起きると考えられた。そして、この領域で転写が起こることにより、クロマチン構造が変化し、欠失上流部からの転写が惹起されたと推測された。この 41bp は、P1 プロモーターからの転写のスプライシングのための配列を含み、type II Runx2 の発現を保持するために、欠失できなかった配列である。そこで、上流域の欠失に加えて、41bp 内のスプライシングのための配列を最適化し、その周囲の配列にも変異を導入することにより、P1 プロモーターからの転写のスプライシングを阻害することなく RNA ポリメラーゼ複合体の結合を阻害することにした。本研究では、P2 プロモーターを破壊することにより Type I Runx2 ko マウスを作製、Type I Runx2 が間葉系幹細胞から骨芽細胞へのコミットメントに必須かという問いに答える。

2. 研究の目的

Runx2 は、骨芽細胞分化および軟骨細胞後期分化における主要な制御因子であり、骨形成に必須である。Runx2 は、2つのプロモーター (P1, P2) によって転写が制御されており、これらのプロモーターから転写・翻訳される2つのアイソフォーム (Type II, Type I Runx2) がある。Type II Runx2 ノックアウト (ko) マウスが報告されたが、Runx2 ko マウスと比較し、骨形成の異常は比較的軽微であり、Type I Runx2 が骨形成、特に間葉系幹細胞から骨芽細胞系列へのコミットメントに重要な働きをすると推察される。しかし、その機能は明らかになっていない。我々は、P2 プロモーターを欠失・変異させ、Type I Runx2 ko マウスを作製、その機能を明らかにする。さらに、P1, P2 プロモーターレポーターマウスを用いて、骨芽細胞、軟骨細胞の各分化段階における両者の発現を調べ、Type I Runx2 の骨格形成における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Type I Runx2 Ko マウスの作製

P1 プロモーターから転写される Type II Runx2 の発現には影響を与えず P2 プロモーターを完全に失活させるために、P2 プロモーターに含まれる P1 プロモーターからの RNA スプライシングのために必要な配列を最適な配列に変異させるとともに、Type I Runx2 転写開始 ATG を含め

たその他すべての配列にも変異を導入したオリゴを合成した。これを2種のガイドRNAおよびCas9とともに、マウスの受精卵に注入し、Type II Runx2の発現に影響のないP2プロモーター領域については欠失させ、Type II Runx2の発現に必要な配列については適切な変異を導入したP2プロモーター欠失・変異マウスを作製した。

(2) Type I Runx2 Ko マウスの解析

4週齢よりマウスの体重を測定し、WtとKoマウスでの体重の変動を検討した。10週齢のマウスについて、カルセインを投与後、大腿骨を摘出し、リガクマイクロCTを用いて、骨幹端海綿骨領域の骨量、骨梁幅、骨梁数、骨梁間、骨塩量、および骨幹皮質骨領域の皮質骨厚、外周長、内周長、骨塩量の測定を行った。Type I Runx2のWtとKoマウスの胎生15.5日と18.5日の胎児で骨格標本を作製し、骨・軟骨領域の分化段階を比較検討した。

4. 研究成果

P1プロモーターから転写されるType II Runx2の発現には影響を与えずP2プロモーターを完全に失活させるために、P2プロモーターに含まれるP1プロモーターからのRNAスプライシングのために必要な配列を最適な配列に変異させるとともに、Type I Runx2転写開始ATGを含めたその他すべての配列にも変異を導入したP2プロモーター欠失・変異マウスを作製できた。このマウスの交配により、Type I Runx2 Koマウスを作製し、4週齢より体重の変動を検討した結果、雌雄ともにWtと比較してKoマウスで体重の減少傾向がみられた(図2)。10週齢のマウスにカルセイン投与後、大腿骨を摘出しマイクロCTにより、骨幹端海綿骨領域の骨量、骨梁幅、骨梁数、骨梁間、骨塩量、および骨幹皮質骨領域の皮質骨厚、外周長、内周長、骨塩量の解析を行った。この結果、10週齢のマウスではすべてのパラメーターで有意な差異は認められなかった(図3)。さらに、胎生15.5日と18.5日の胎児の骨格標本を作製し、骨・軟骨形成について比較検討した。この結果、WtとKoマウスでは明らかな骨・軟骨形成の遅延はみとめられなかった。

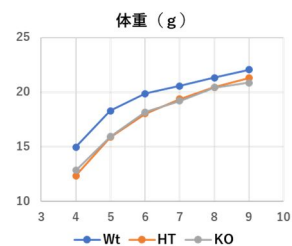


図2. 体重測定結果

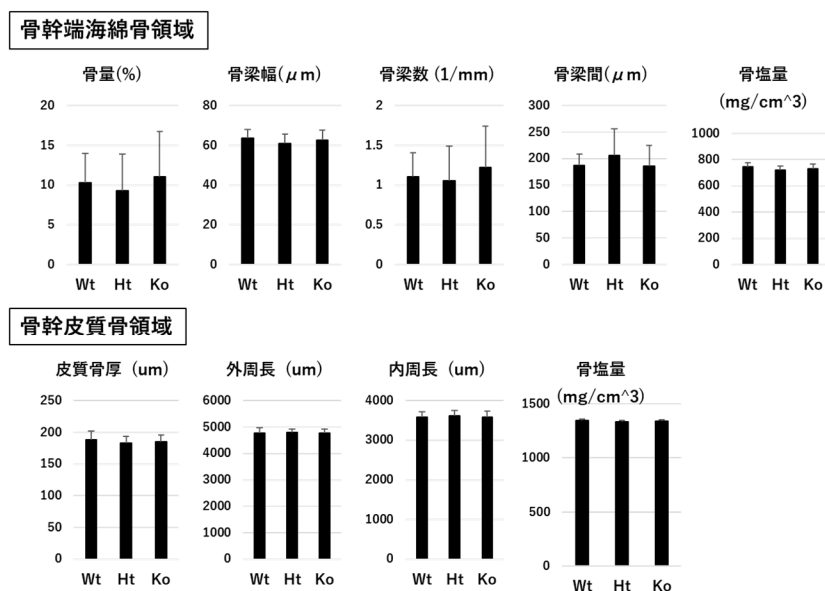


図3. マイクロCT結果

参考文献

1. J. Cell Biol. 153, 87-100 2001, 2. Dev. Biol. 296, 48-61. 2006
2. Dev. Biol. 296, 48-61. 2006
3. J Bone Miner Res. 31(7) 1391-1404, 2016, 4. PLoS One 9, e108294. 2014

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〕

-

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	小守 壽文 (Komori Toshihisa) (00252677)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・特命教授 (17301)	
研究分担者	森石 武史 (Moriishi Takeshi) (20380983)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	
研究分担者	大庭 伸介 (Ohba Shinsuke) (20466733)	大阪大学・大学院歯学研究科・教授 (14401)	

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