

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月18日現在

機関番号：17301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23792108
 研究課題名（和文）Runx ファミリーの共役因子 Cbfb の骨格および歯の発生における機能解析
 研究課題名（英文）Analysis of the functions of Cbfb, a cotranscription factor of Runx family proteins, in skeletal and tooth development.
 研究代表者
 六反田 賢（ROKUTANDA SATOSHI）
 長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：60549608

研究成果の概要（和文）：

Cbfb は、Runx ファミリーの共役因子であり、Runx ファミリー分子とヘテロダイマーを形成、Runx ファミリー分子に DNA 結合能を獲得させる。Cbfb の骨格形成における働きを明らかにするために、全身の間葉系細胞で Cbfb を欠損させたマウスを作製した。骨形成および軟骨細胞分化の遅延が見られ、Cbfb が骨格形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Cbfb is a cotranscription factor of Runx proteins. It forms a heterodimer with Runx family proteins and binds to DNA. To elucidate the function of Cbfb in skeletal development, we generated conditional knockout mice, in which Cbfb was deleted in mesenchymal cells in whole body. In Cbfb conditional knockout mice, bone formation and chondrocyte differentiation were retarded, indicating that Cbfb plays an important role in skeletal development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

 キーワード：Cbfb、Runx2、骨芽細胞、軟骨細胞、骨形成、
 コンディショナルノックアウトマウス、Dermo1

1. 研究開始当初の背景

転写因子 Runx ファミリー（Runx1, Runx2, Runx3）は、様々な器官の発生に重要な役割を担っている。すなわち、Runx1 は、造血系幹細胞の分化、Runx2 は、骨芽細胞・軟骨細胞分化、Runx3 は神経系および消化管上皮の発生に重要な役割を果たしている。さらに、

Runx1 と Runx3 は、T 細胞分化に重要である（J Cell Biochem 95: 2005）。また、Runx2 は、歯の発生にも必須であることが報告されている（Development 126: 2911, 1999）。私は、これまで軟骨細胞の分化、増殖、内軟骨性骨化の分子メカニズムを転写因子 Runx2、

そして Runx2 と相互作用する Akt シグナルを中心に解析してきた (Dev Biol 328: 78, 2009; J Bone Miner Metab DOI: 10.1007/s00774-010-0222-z)。しかし、Runx1, Runx2, Runx3 とともに軟骨細胞に発現しているため、ファミリー分子間で機能が重複している可能性があり、Runx2 ノックアウトマウスを解析しても、正確に Runx2 の骨格形成における機能を見ることができないと考えた。また、歯の発生過程においても、3 分子の発現が検出される (Mech Dev 119S: S107, 2002; J Bone Miner Res 19: 1671, 2004; Biochem J 405: 69, 2007)。すなわち、Runx2 は歯原性間葉系細胞に、Runx3 は象牙芽細胞に、Runx1 は歯原性間葉系細胞およびエナメル上皮に主に発現が検出される。Runx ファミリー分子の骨格形成および歯の発生における機能を明らかにすることが全体構想であるが、Runx ファミリー分子それぞれの機能を明らかにするには、ファミリー分子間での機能重複の他にも課題がある。Runx1 ノックアウトマウスは、胎児肝臓での造血ができずに、骨格発生の初期 (胎生 12 日) に死亡する。したがって、本研究の目的を達成するためには、少なくとも Runx1 に関しては、細胞系列特異的に遺伝子欠損させなければ、その機能を明確にすることはできない。ファミリー分子間の機能重複を考えあわせると、Runx1 flox マウスに Cre を導入するとともに、Runx2, Runx3 とのダブル、トリプルノックアウトマウスを作製していかなければならない。これは、全く実現不可能というわけではないが、膨大な時間と研究費を必要とし、現実的ではない。

2. 研究の目的

Cbfb は、Runx ファミリーの共役因子であり、Runx ファミリー分子とヘテロダイマーを形成、Runx ファミリー分子の立体構造を変え、Runx ファミリー分子に DNA 結合能を獲得させ

る。すなわち、Runx ファミリー分子はその機能発現のために Cbfb を必要とする。そこで、Cbfb のコンディショナルノックアウトマウスを用いて、Runx ファミリー分子の機能を解明することにした。すなわち、本研究では、全身の間葉系細胞に発現する Dermo1 遺伝子に Cre をノックインしたマウスと、Cbfb flox マウスを交配し、骨格系および歯の間葉系細胞で、それらの発生初期で Cbfb を欠失させ、その表現系を解析することにより、Runx ファミリー分子の骨格形成および歯の発生過程における機能を明らかにする。

3. 研究の方法

間葉系細胞に Cre を発現する Dermo1 Cre ノックインマウスと Cbfb flox/flox (*Cbfb*^{f1/f1}) マウスを交配、骨格形成細胞 (軟骨細胞・骨芽細胞の前駆細胞) で Cbfb を欠失させ、骨格形成過程を組織学的および分子生物学的手法を用いて検討する。

(1) Cbfb flox/flox: Dermo1 Cre (*Cbfb*^{f1/f1/Cre}) マウスの作製

① Cbfb flox/+マウスの交配によってすでに得られている *Cbfb*^{f1/f1} マウスと Dermo1 に Cre をノックインしたヘテロマウスを交配、Cbfb flox/+:Cre (*Cbfb*^{f1/+/Cre}) マウスを得る。このマウスと *Cbfb*^{f1/f1} マウスをさらに交配、*Cbfb*^{f1/f1/Cre} マウスを得る。*Cbfb*^{f1/f1} マウスをコントロールとして用いる。遺伝子型の解析は PCR 法により行う。

② 胎生 14.5 日の胎児の四肢、胎生 18.5 日の頭蓋扁平骨より RNA を抽出、real time RT-PCR 法により、Cbfb の発現を *Cbfb*^{f1/f1} マウスと *Cbfb*^{f1/f1/Cre} マウスで比較する。また、同組織よりタンパク質を抽出、Western blot 法により、Cbfb の発現を比較する。

(2) *Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスの解析

① 胎生 16.5 日で骨格標本作製、膜性骨化、軟骨内骨化が起きているか検討する。

② 胎生 16.5 日の組織切片にて、HE 染色にて、四肢の軟骨形成および軟骨内骨化のプロセスを調べる。また、頭蓋の膜性骨化のプロセスを調べる。さらに、切歯および臼歯の発生過程を調べる。①, ②ともに Runx2 ノックアウトマウスと比較検討する。

③ 胎生 16.5 日の組織切片にて、軟骨細胞分化マーカー (II 型コラーゲン、Ihh、X 型コラーゲン、オステオポンチン) プローベを用いた in situ hybridization を行い、軟骨細胞分化を調べる。

④ 生存した成獣の *Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスの骨格をマイクロ CT を用いて調べる。

4. 研究成果

骨芽細胞、軟骨細胞両者の前駆細胞で、*Cbfb* のエクソン 5 を *derm1-Cre* で欠失させた *Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスを作製した。*Cbfb* には、182 アミノ酸、187 アミノ酸、148 アミノ酸、155 アミノ酸の 4 つのアイソフォームが存在し、このうち、182 アミノ酸と 187 アミノ酸のアイソフォームが、Runx2 とともに転写活性を促進させる。*Cbfb*^{fl/fl/Cre} の四肢の骨格より RNA を抽出、RT-PCR で調べた結果、この 2 つのアイソフォームともに検出されなかった。

胎生 15.5 日と 18.5 日で、*Cbfb*^{fl/fl} マウス、*Cbfb*^{fl/+Cre} マウス、*Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスの骨格標本作製し比較した。胎生 15.5 日の *Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスでは、頭蓋骨、蝶形骨、脊椎骨、肋骨、前肢・後肢の骨、鎖骨で、石灰化が *Cbfb*^{fl/fl} マウス、*Cbfb*^{fl/+Cre} マウスと比較し、遅延していた。胎生 18.5 日の *Cbfb*^{fl/fl/Cre} マ

ウスでは、頭蓋骨、下顎骨、胸郭が小さく、四肢は短かった。また、全ての骨格での石灰化の遅延が見られた。

胎生 16.5 日の *Cbfb*^{fl/fl} マウス、*Cbfb*^{fl/+Cre} マウスでは、大腿骨の骨幹部での血管進入および海綿骨形成が認められたのに対し、*Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスでは、血管進入も海綿骨形成も認められなかった。Von Kossa 染色でも、軟骨基質の軽度の石灰化を認めるのみで、骨形成を認めなかった。次に In situ hybridization で軟骨細胞分化を検討した。*Cbfb*^{fl/fl} マウス、*Cbfb*^{fl/+Cre} マウスでは、II 型コラーゲンが骨端部に、X 型コラーゲンが骨幹部に、オステオポンチンが骨幹部に発現していた。これに対し、*Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスでは、II 型コラーゲンの発現が骨端部から骨幹部部に認められ、X 型コラーゲンとオステオポンチンの発現は、骨幹部に非常に弱く認められた。これに一致して、四肢から抽出した RNA を用いた、リアルタイム RT-PCR では、II 型コラーゲンは、*Cbfb*^{fl/fl} マウス、*Cbfb*^{fl/+Cre} マウス、*Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスで同程度検出されたが、Ihh、X 型コラーゲンの発現は *Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスで著減していた。

Cbfb^{fl/fl/Cre} マウスは出生直後に呼吸できずに死亡したが、遺伝子型のスクリーニングで意外にも 460 匹中 2 匹が生存していた。1 匹は 20 週齢で死亡した。このマウスは体も小さく、マイクロ CT 解析では、泉門の開大、頭蓋の前後径の短縮、鎖骨の低形成が認められた。肋骨の石灰化は低下しており、椎体は短縮していた。もう 1 匹は 33 週齢でマイクロ CT 解析を行った。このマウスも体が小さく、頭蓋の前後径が短縮、椎体の短縮が認められた。また、肋骨の強度の変形が認められ、四肢骨では海綿骨が著減していた。

Cbfb^{fl/fl/Cre} マウスの骨形成および軟骨細胞分化は著明に遅延していたが、Runx2 ノッ

クアウトマウスに比較すると、少し軽度であった。また、切歯および臼歯の発生は、Runx2のノックアウトマウスでは、帽状期で停止するのに対し、*Cbfb*^{fl/fl/Cre} マウスではほぼ正常に発生が進んでいた。

以上の結果より、Cbfb は Runx2 依存性の骨形成、軟骨細胞分化に重要な働きをすることが明らかとなった。また、生後の骨形成、維持にも Cbfb が重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

六反田 賢 (ROKUTANDA SATOSHI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：60549608

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし