

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17217

研究課題名(和文) 骨折治癒過程での転写因子Runx2獲得による細胞運命決定機構の解明

研究課題名(英文) Cell fate determination mechanism by acquisition of transcription factor Runx2 during fracture healing process

研究代表者

田澤 美樹(柏木美樹)(Miki, Kashiwagi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70803360

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)：本研究は、胎生期骨発生において必須となる転写因子Runx2とヘッジホッグシグナルの骨折治癒過程での働きに関してそのメカニズムの解明を目的に行われた。CAGCre-ERTM; Runx2^{fl/fl}; R26RTomatoマウスを作製し、骨折治癒過程における骨修復に関わる因子の解明を目指した。また、Runx2^{+/-}マウスの骨折モデルを作製し、Runx2の骨折治癒における役割について探究をおこなった。さらにシングルセル解析によりRunx2陽性の細胞集団が骨格系前駆細胞から成熟骨芽細胞まで連続的に発現していることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた日本にとって、骨折などを含む骨疾患は社会的に取り組むべき大きな課題と考えられる。しかしながら、骨折治癒のメカニズムや治療法に関しては明らかとなっていない点も多数存在する。そこで、本研究による、骨折治癒のメカニズム(HhシグナルやRunx2の役割)が明らかとなれば、将来的な骨折を含む骨疾患の治療法に大きな進歩をもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of the transcription factor Runx2-related transcription factor 2 (Runx2), which is essential for embryonic bone development, and the function of hedgehog signaling in the fracture healing process. We created CAGCre-ERTM; Runx2^{fl/fl}; R26RTomato mice and aimed to elucidate the factors involved in bone repair during the fracture healing. We also created a fracture model of Runx2^{+/-} mice and investigated the role of Runx2 in fracture healing. Furthermore, single cell analysis confirmed that the Runx2-positive cell population was continuously expressed from skeletal progenitor cells to mature osteoblasts.

研究分野：外科系歯学

キーワード：Runx2 骨折治癒 骨疾患 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

これまでに遺伝子改変マウス等を用いた遺伝学的な解析から、骨芽細胞分化の各段階に必須の因子が明らかとなってきた (*Nature* **423**:332-355, 2003; *Development* **133**:3231-3244, 2006)。四肢・体幹の多くの骨が形成される軟骨内骨化においては、骨芽細胞と軟骨細胞は共通の Sox9 陽性の前駆細胞 (骨軟骨前駆細胞) から生じるとされている。Runx2 欠失マウスでは全身の骨形成が消失することから、Runx2 は骨芽細胞分化のマスター制御因子とされている。骨芽細胞への運命決定プロセスにおいては、ヘッジホッグ (Hh) シグナルが Runx2 陽性骨芽細胞前駆細胞の形成に必須である。また、Hh 刺激を受けられずに Runx2 の発現を獲得しなかった軟骨膜細胞は、骨芽細胞に分化することなく、Sox9 陽性の軟骨細胞に分化することが知られている (*Development*, **131**:1309-1318, 2004)。一連のデータは、骨軟骨前駆細胞から骨形成性細胞 - 骨芽細胞への運命決定プロセスには Runx2 の獲得が鍵であること、この Runx2 の獲得には Hh シグナルが関与すること、の 2 点を示している。

胎生期の骨発生に加え、成体における骨折治癒過程においても軟骨内骨化が認められる。したがって、骨折治癒過程においても、骨軟骨前駆細胞が主要な役割を果たしており、その根幹に上記の Runx2 を鍵とした骨芽細胞への運命決定プロセスが存在すると考えられる。このプロセスのメカニズムを細胞レベル・分子レベルで正確に理解することは、骨修復機構のさらなる理解のみならず、新しい骨疾患治療・骨再生医療の開発へとつながる。しかしながら、上で述べた 2 点 (Runx2 獲得の意義と Runx2 獲得における Hh シグナルの関与) が、骨折治癒における骨芽細胞への運命決定においても成立するか否かについては不明なままである。

近年、医学・生物学において、細胞運命や遺伝子発現プロファイルを一細胞レベルで検索する Single Cell 解析が注目されている。一見均質に見える細胞集団の多様性を明らかにし、組織の発生や修復における遺伝子や細胞内シグナルの機能を、一細胞レベルで、より緻密に理解することが可能となる。Single Cell 解析の手法を、骨折治癒における骨芽細胞への運命決定プロセスの解析に応用することができれば、そのメカニズムの理解を飛躍的に高めるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究は、Runx2 獲得の意義と Runx2 獲得における Hh シグナルの関与に焦点を絞り、骨折治癒における骨芽細胞への運命決定プロセスに関わる基本原理の一部を明らかにすることで、骨再生療法・骨疾患治療へと展開する基礎的知見の収集を目的とする。まず、Runx2 獲得の意義を検討するため、成獣マウスの骨折治癒過程において時期特異的に Runx2 を欠失させ、Runx2 欠失細胞の細胞運命を *in vivo* で追跡するとともに、遺伝子発現プロファイルを一細胞レベルで明らかにする。次に、Runx2 獲得における Hh シグナルの関与 (Hh-Runx2 連関) を明らかにするため、骨折治癒過程において Hh シグナルを外因性に活性化させた状態で、上記と同様の追跡を行う。

これまで骨折治癒過程における Runx2 の機能解析に関する報告はあるが、本研究のように *in vivo* lineage tracing に基づいた検討はこれまでになされてこなかった。さらに、骨折治癒過程に関わる細胞集団の性状と挙動を、一細胞レベルで取得した遺伝子発現プロファイルに基づいて理解することは、過去のバルク細胞による研究と比較し、単細胞をターゲットとした創薬や疾患治療法、骨再生療法へとつながる新たな知見となり得る。

3. 研究の方法

(1) CAGCre-ERTM; Runx2^{fl/fl}; R26RTomato マウスの作製

Runx2 ノックアウトマウスは、通常胎生致死となるため、本研究では、CreER-loxP システムを利用して、異なる時期に成体マウスにタモキシフェンを投与することで、時期特異的 Runx2 機能解析および lineage tracing 解析を行うことを目標に研究をすすめた。タモキシフェン存在下において全身性に Cre を発現する CAGCre-ERTM マウス、Rosa26tdTomato (R26RTomato) マウス、Runx2-flox マウスを交配させることで、CAGCre-ERTM; Runx2^{fl/fl}; R26RTomato マウスを作製した。

骨組織における Tomato 発現を指標に Cre recombination 効率を検討し、解析に最適なタモキシフェン投与量を決定した。

Runx2^{+/-}マウスを使用した骨折モデルと WT の骨折モデルを比較する実験も予備実験から継続して行った。WT、Runx2^{+/-}マウス各々骨折モデルを作製し、骨折後 7 日目にマイクロ CT にて仮骨形成を評価した。BMD の違いによるマッピングを行い、仮骨形成の比較を行った。

(2) 骨欠損モデルにおける Runx2 機能のシングルセル解析

これまでに組織学的解析から認められた知見を一細胞遺伝子発現レベルで検証した。Runx2 野生型の CAGCreERTM; R26RTomato マウスを用い、組織を回収し、酵素処理により細胞を単離した後、10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞バーコード付与を行った。その後、cDNA を合成し一細胞 RNA-seq 解析を行った。

4. 研究成果

(1) CAGCre-ERTM; Runx2^{fl/fl}; R26RTomato マウスの作製

本研究で必要となる遺伝子改変マウスの作製を行った。Runx2 の機能解析のため、CAGCre-ERTM; Runx2^{fl/fl}; R26RTomato マウスを作製。まず、CAGCre-ERTM; R26RTomato マウスと、Runx2^{fl/fl}; R26RTomato マウスを作製し、さらに掛け合わせを行って、CAGCre-ERTM; Runx2^{fl/fl}; R26RTomato マウスを作製した。同時に、コントロールとして使用する CAGCre-ERTM; Runx2^{+/+}; R26RTomato マウスも作製した。また、実験には雄マウスを使用するため、交配により雄マウスの数を増やしつつ、骨折モデルを作製した。また、タモキシフェンの投与量についても検討実験を行った。

追加で、予備実験として行っていた Runx2^{+/-}マウスを使用した骨折モデルのマイクロ CT による評価も行った。骨折後 7 日目の CT 画像を BMD の違いによりマッピングし比較したところ、Runx2^{+/-}マウスでは軟性仮骨の形成が WT に比べ、少量しか認められなかった (図 1)。

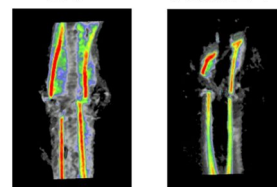
WT と Runx2^{+/-}マウスの骨折治療過程の比較 (図 1)

WT, Runx2^{+/-} mice (8 w, ♀)

POD7

WT

Runx2^{+/-}



BMD
1 1200
(mg/cm³)

(2) Runx2 機能のシングルセル解析

骨修復における Runx2 の寄与を一細胞単位で解析するため一細胞 RNA-seq 解析 (scRNA-seq) を行った。まずは Runx2 野生型の CAGCreERTM; R26RTomato マウスを用いた解析を行った。骨欠損作製後、骨修復部位における細胞集団を酵素処理により回収し、フィルトレーションにより単離した。10x Genomics 社の Chromium 解析プラットフォームにおいて、一細胞ごとに異なる分子バーコード含有ビーズと液滴を、マイクロ流路において反応させた。これにより、各細胞に異なる分子バーコードを付加した後、逆転写酵素により cDNA を合成し、さらに cDNA を増幅しライブラリーを作製した。パイオアナライザーにてライブラリーのサイズと量を確認した後、次世代シーケンサー-Novaseq 用いた解析を行った。得られたシークエンスデータは東京大学医科学研究所スーパーコンピューター-Shirokane を用いて解析した。Cell Ranger ソフトウェアを用いてマウスリファレンスゲノム mm10 へマッピングした後、Seurat を用いてさらなるバイオインフォマティクス解析を行った。データ正規化およびクラスタリング解析を行った後、得られた各クラスターのアノテーションを行った。さらに Monocle 3 パッケージを用いて、pseudo time(偽時系列)解析により、骨格系前駆細胞から成熟骨芽細胞までのダイナミックな遺伝子発現変化を解析した。その結果、Runx2 陽性の細胞集団が、骨格系前駆細胞から成熟骨芽細胞まで連続的に発現していることが確認された。現在、tdTomato 遺伝子の発現解析を通じた、細胞系譜解析を進めている。また、今後は Runx2 欠損マウス (CAGCreERTM; Runx2^{fl/fl}; R26RTomato マウス) を用いた解析についても準備を進めている。

上記に加えて、本研究に関連する骨関連疾患、Runx2 やヘッジホッグシグナルに関する知見の情報収集を各学会にて行ってきた。また、他施設への訪問も行き、ディスカッションを通して、研究におけるアドバイスをいただいた。研究計画をすべて完了することが困難であったため、これらの新たな知見をもとに、今後も本研究をさらにすすめていきたいと考えている。また、骨関連疾患に関する学会発表や論文執筆を行い、世界に向けて情報発信も行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamakawa D, Kawase-Koga Y, Fujii Y, Kanno Y, Sato M, Ohba S, Kitaura Y, Kashiwagi M, Chikazu D	4. 巻 1:21(23)
2. 論文標題 Effects of Helioxanthin Derivative-Treated Human Dental Pulp Stem Cells on Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 9158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21239158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miki Kashiwagi, Takahiro Abe, Yuske Komiyama, Noriko Komatsu, Shoko Tateishi, Kazuto Hoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Efficacy of Etanercept with Jaw-Training for Rheumatoid Arthritis with Firstly Temporomandibular Joint Symptoms: A Case Report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Rheumatic Diseases and Treatment Journal	6. 最初と最後の頁 6-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 柏木美樹、安部貴大、藤原夕子、小笠原徹、西條英人、星和人	4. 巻 30
2. 論文標題 成人Still病に併発した顎関節症状に対する治療経験	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本顎関節学会雑誌	6. 最初と最後の頁 202-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柏木美樹、瀬田修平、藤原夕子、阿部雅修、安部貴大、星和人
2. 発表標題 顔面動静脈血管奇形術後瘢痕に起因する開口障害に対し下顎骨区域切除術および人工下顎頭置換術を施行した1例
3. 学会等名 第210回(公社)日本口腔外科学会関東支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柏木美樹、杉山円、菅家康介、西條英人、星和人
2. 発表標題 両側口唇口蓋裂児における口腔内異物の1例
3. 学会等名 小児口腔外科学会
4. 発表年 2018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
---------	---------