

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18947

研究課題名(和文) 骨芽細胞成熟過程におけるRunx2のTln2を介した突起形成制御機能の解明

研究課題名(英文) Mechanism of the regulation of osteoblast process formation by Runx2 through Tln2 regulation during osteoblast maturation

研究代表者

坂根 千春 (SAKANE, Chiharu)

長崎大学・先端生命科学研究所支援センター・助教

研究者番号：40792578

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)：間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に関わる転写因子Runx2は、骨芽細胞の成熟過程において、未熟骨芽細胞では強く発現しているが、成熟骨芽細胞では発現が低下する。I型コラーゲンプロモーターを用いて骨芽細胞にRunx2を強発現させると、骨芽細胞の成熟が抑制され、骨細胞も減少する。この時、骨のコラーゲン繊維の走行がランダムになり、骨芽細胞と骨細胞では細胞突起の数が減少する。Runx2の下流で骨芽細胞突起形成に関わる遺伝子としてTln2を同定したので、本研究では、Runx2がTln2の発現調節を介して突起形成を主とした細胞骨格を制御することにより、骨芽細胞の成熟を調節している可能性を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Tln2の生理的機能を明らかにした報告は少なく、骨芽細胞の分化・形態・機能および骨代謝に関する報告はない。本研究でTln2ノックアウトマウスの骨組織を調べたところ、骨のコラーゲン繊維の走行にTln2が関与している可能性が示唆された。

また、骨芽細胞特異的にRunx2を過剰発現させたトランスジェニックマウスをTln2ノックアウトマウスと掛け合わせることで、骨に見られる異常の一部が回復していた。得られた結果をもとに研究を進展させることは、Runx2による骨格形成制御の分子メカニズムの解明を進展させるとともに、骨の成熟を促進させる方法を提供し、骨代謝研究に大きく貢献する。

研究成果の概要(英文)：Runx2 is an essential transcription factor for the differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts. Runx2 is highly expressed in immature osteoblasts and the expression reduces during osteoblast maturation. In Runx2 transgenic mice under the control of 2.3 kb Col1a1 promoter, osteoblast maturation is inhibited, the number of osteocytes is reduced, the direction of collagen fibers is disturbed, and the number of processes in osteoblasts and osteocytes is reduced.

We identified Tln2 as a target gene of Runx2 in the regulation of osteoblast process formation. In this study, we generated Tln2 knockout mice and crossed them with Runx2 transgenic mice under the control of 2.3 kb Col1a1 promoter, and examined the involvement of Tln2 in the regulation of osteoblast process formation by Runx2.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨芽細胞突起形成 Runx2 Tln2

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、転写因子 Runx2, Sp7 および Wnt シグナルにより、骨芽細胞へと分化する。骨芽細胞の成熟過程では、Runx2 は未熟骨芽細胞に強く発現しており、成熟とともに発現は低下する。2.3 kb I 型コラーゲン (Col1a1) プロモーターを用いて、骨芽細胞特異的に Runx2 を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスでは、骨芽細胞の成熟が抑制された。すなわち Runx2 Tg マウスでは、骨は未熟骨芽細胞で占められ、コラーゲンの走行がランダムな繊維骨を形成しており、成熟骨芽細胞マーカーである osteocalcin 発現の著減と、骨芽細胞突起の著減が認められた。この時、骨細胞はほとんど存在せず、まれに見られる骨細胞では突起数が減少していた。

さらに、骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞に Runx2-IRES-GFP または Runx2 の siRNA を導入し、細胞突起数の定量化を行ったところ、Runx2 の発現レベルと細胞突起数が逆相関しており、Runx2 が骨芽細胞突起数の制御に関与していることが示唆された。そこで、Runx2 の下流で骨芽細胞突起形成を阻害する分子を探索するために、Runx2 Tg マウスの骨芽細胞でマイクロアレイ解析を行なった。野生型マウスと Runx2 Tg マウス間で 2 倍以上差がある cytoskeleton 関連遺伝子を選択、RT-qPCR によって再現性を検討した。さらに、2.3 kb Col1a1 Cre を用いた Runx2 flox/flox/Cre マウスでの発現を調べ、Runx2 によって発現誘導される遺伝子として Tln2 を同定した。

Tln2 は integrin タンパクへの結合を介して、細胞接着のダイナミクスに関する遺伝子の一つである。Tln2 KO マウスは、その発現パターンから、筋組織での表現型が主に解析されてきたが、近年、multiple-promoter から転写された種々のアイソフォームの脳・腎臓・脾臓での発現が見出され、それぞれの臓器の発達に関与する可能性が示唆されている。2012 年頃からは、がん細胞における Tln2 の発現が、細胞の遊走性、浸潤性や転移に影響するという報告がなされ、がん治療の標的因子となる可能性も示唆されている。しかしながら、Runx2 による骨芽細胞突起形成の制御において、Tln2 が果たす役割は明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、Runx2 が Tln2 の発現を介して突起形成を主とした細胞骨格を制御することにより、骨芽細胞の成熟を調節している可能性を検討する。Tln2 ノックアウト (KO) マウスは、skeletal myopathy の表現型を示すことが報告されているが、骨芽細胞の分化・形態・機能および骨代謝に関する報告はない。そこで、骨格形成における Tln2 の生理的意義を明らかにするとともに、Runx2 による骨芽細胞突起形成抑制および骨芽細胞成熟抑制に Tln2 が必須か明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Tln2 KO マウスの表現型を継時的に調べ、その生理的機能を明らかにする。(2) Runx2 Tg マウスと Tln2 KO マウスを交配して得た Runx2 Tg / Tln2 KO マウスを用いて、Runx2 による骨芽細胞の突起形成抑制および骨芽細胞成熟抑制がどのように変化するか調べる。(3) 骨芽細胞特異的に Tln2 を過剰発現する Tg マウスにおける骨芽細胞突起形成および骨芽細胞の成熟 (コラーゲンの走行を含む) を野生型マウスおよび Runx2 Tg マウスと比較する。(2) および(3) の結果を合わせて、Runx2 による骨芽細胞突起形成抑制および骨芽細胞成熟抑制への Tln2 の関与を証明する。

4. 研究成果

(1) Tln2 KO マウスの解析

3 週齢、4 週齢、6 週齢、8 週齢、30 週齢マウスで、大腿骨の遠位骨幹端部と骨幹部を用いてマイクロ CT 解析を行なった。海綿骨では骨密度、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N)、骨梁間隔 (Tb.Sp)、骨梁距離 (Tb.Spac)、海綿骨骨塩量のパラメーターを、皮質骨では骨幅 (Ct.Th)、外周長 (Ps.Pm)、内周長 (Ec.Pm)、皮質骨骨塩量のパラメーターを、野生型マウスと Tln2 KO マウスで比較した。海綿骨のパラメーターでは、骨塩量が 3 週齢雄マウスで Tln2 KO が野生型よりも有意に低値となった。皮質骨のパラメーターでは、皮質骨厚が 6 週齢雌マウスと 8 週齢雄マウスで、骨幹中央部外周長と内周長が 3 週齢雄マウスと 8 週齢雄マウスで、Tln2 KO マウスが野生型マウスよりも有意に低値となった。

4 週齢マウス的大腿骨を用いた組織解析では、H-E 染色標本で骨幹部皮質骨 3 カ所の骨細胞数と皮質骨面積を計測し、骨細胞数の定量を行なった。骨細胞数は野生型マウスと Tln2 KO マウスで有意差を認めなかった。同じ切片を用いて偏光顕微鏡でコラーゲン走行を調べたところ、Tln2 KO マウスで、コラーゲンの走行が揃っているために明るく見える標本がいくつか得られ

た。確認のために、1 週齢、2 週齢、3 週齢マウスの大腿骨を観察したが、幼若マウスではコラーゲンの走行が未熟で個体差も大きく、野生型マウスとの差を検出できなかった。そこで、コラーゲン繊維配向とアパタイト配向性の定量、ナノインデンテーションによる骨強度測定を行うこととし、4 週齢と 10 週齢のマウスを用いて、現在解析中である。

(2) Runx2 Tg / Tln2 KO マウスの解析

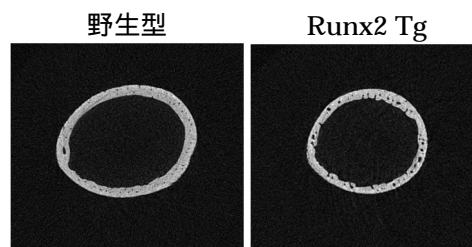
Runx2 Tg マウスの表現型が Tln2 欠損によってレスキューされるか調べた。まず、4 週齢マウスで大腿骨の遠位骨幹端部と骨幹部を用いてマイクロ CT 解析を行なった。皮質骨の骨塩量で雌雄ともに Runx2 Tg マウスが野生型マウスよりも有意に低値となり、この時 Runx2 Tg / Tln2 KO マウスも野生型より有意に低値となった。Runx2 Tg マウスと Runx2 Tg / Tln2 KO マウス間では差を認めず、Tln2 欠損によるレスキューは観察されなかった。

次に、2018 年度に本学に新設された高分解能 X 線マイクロ CT スキャナを用いて撮像を行い、骨小空や血管を調べた(図)。これまで、Runx2 Tg マウスの表現型として、骨折、骨細胞の著減、コラーゲンのランダムな走行を報告した。

本研究では、高分解能 X 線マイクロ CT スキャナで得られた 3D 画像を解析して骨小空や血管の定量を行い、Runx2 Tg マウスの表現型を詳細に解析し、それらが Tln2 欠損によって回復するか観察する。

一方、大腿骨を用いた組織解析では、骨細胞数の定量を行なったところ、Runx2 Tg マウスで野生型マウスよりも有意に低値となったが、Runx2 Tg / Tln2 KO マウスと野生型では差を認めなかった。さらに、コラーゲン走行を調べたところ、Runx2 Tg ではコラーゲン繊維の配向がランダムになっていたが、Runx2 Tg / Tln2 KO では野生型と同様に配向が揃っていた。以上のことから、Runx2 Tg マウスの表現型は、Tln2 欠損によって一部レスキューされることが明らかとなった。

このメカニズムを解明するために、4 週齢マウスの大腿骨組織切片を鍍銀染色し、骨細管の観察を行なった。鍍銀染色に使用するプロテイン銀は、メーカーやロットによっては染色されないことがあるため、製品や濃度の検討を行い、良好な染色像を得ることに成功した。また、骨細管が 3 次元的に伸長しているため、観察では Z スタック撮影を行なった。現在は、取得した鮮明な画像を用いて、骨細管数の定量解析を行なっている。アルコール固定した骨組織では鍍銀染色による骨細管染色ができないので、アルコール固定したサンプルについては、塩酸コラゲナーゼ法で骨質を溶解し、走査型電子顕微鏡観察を行い、骨細胞突起の観察を行う。この方法では、使用する組織の状態によって塩酸コラゲナーゼの処理条件が変わるため、事前に検討を十分に行う。



(図) 高分解能 X 線マイクロ CT 像
大腿骨骨幹部の横断面を示す。
Runx2 Tg では骨小空が大きくなっている。

(3) Tln2 Tg マウスの作製と解析

2.3 kb Col1a1 プロモーターの下流にマウス Tln2 の cDNA を挿入した DNA を、マウス受精卵にインジェクションした。インジェクションした受精卵 321 個を仮親に移植し、47 匹の産仔を得ることができた。産仔の組織からゲノム DNA をそれぞれ抽出し、PCR 法によりトランスジェーンを検出した。

現在は、トランスジェーン陽性個体 13 匹の尾椎から抽出した total RNA を用いて、RT-qPCR 法によりトランスジェーンの発現を調べている。骨芽細胞特異的に Tln2 を過剰発現する Tln2 Tg マウスが得られれば、Tln2 Tg マウスは、Runx2 Tg マウスと同様の表現型またはその一部を有すると予想されるので、下記項目について野生型マウスおよび Runx2 Tg マウスとの比較検討を行う。

骨細胞の観察

4 週齢マウスの大腿骨パラフィン切片で、皮質骨の骨細胞数計測、偏光顕微鏡でコラーゲンの走行を調べる。鍍銀染色で骨細管を、走査型電子顕微鏡で骨細胞突起を調べる。

骨芽細胞分化の解析

4 週齢マウスの大腿骨パラフィン切片で in situ hybridization を行うとともに大腿骨から抽出した total RNA を用いた RT-qPCR 法によって、Runx2, Col1a1, osteocalcin 等の骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を調べる。

本研究では、Runx2 のターゲット遺伝子である Tln2 が、骨芽細胞の突起形成を調節することによって、骨形成に関与するか調べた。骨芽細胞の成熟が抑制されている Runx2 Tg マウスで Tln2

を欠損させることにより、骨細胞数の回復等が観察された。この研究成果は筆頭著者として投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Xin Qin, Qing Jiang, Kenichi Nagano, Takeshi Moriishi, Toshihiro Miyazaki, Hisato Komori, Kosei Ito, Klaus von der Mark, Chiharu Sakane, Hitomi Kaneko, Toshihisa Komori	4. 巻 16
2. 論文標題 Runx2 is essential for the transdifferentiation of chondrocytes into osteoblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009169
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 -

1. 著者名 Matsuura Viviane K. S. Kawata, Yoshida Carolina Andrea, Komori Hisato, Sakane Chiharu, Yamana Kei, Jiang Qing, Komori Toshihisa	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression of a Constitutively Active Form of Hck in Chondrocytes Activates Wnt and Hedgehog Signaling Pathways, and Induces Chondrocyte Proliferation in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2682 ~ 2682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21082682	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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