

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09827

研究課題名(和文) 転写因子Runx2の標的遺伝子の同定と骨格形成における機能解析

研究課題名(英文) Identification of target genes of the transcription factor Runx2 and analysis of its function in skeletal development

研究代表者

高畑 佳史 (Takahata, Yoshifumi)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60635845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞分化を支配するマスター遺伝子としてRunx2が同定され、Runx2のノックアウト(KO)マウスは骨形成が完全に阻害される。本研究成果は、Runx2の標的遺伝子としてSmoc1, Smoc2を同定し、骨形成過程に必須であることを示した。Smoc1のKOマウスは腓骨の消失、指の融合を示した。一方、Smoc2のKOマウスは頭蓋形成において短頭型を示したが、全身の骨形成過程に与える影響は軽微であった。続いて、Smoc1とSmoc2の機能的代償性の可能性が考えられるため、Smoc1;Smoc2のダブルKOマウスの解析を行った結果、頭蓋形成が阻害され、長官骨では内軟骨骨形成の遅延が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子Runx2が骨と骨芽細胞の形成と軟骨の成熟に必須的役割を果たしている。その後Runx2が支配する遺伝子が複数同定されたが、骨の形成や軟骨の成熟との関係は不明であった。本研究成果は、最新の遺伝子工学技術を駆使して、骨の形成と軟骨の成熟に関与する重要な遺伝子を発見し、骨や軟骨の形成のメカニズムの理解に大きく貢献することが見込まれる。本研究の成果を基盤として、骨粗鬆症、関節リウマチ、変形性関節症などの骨および軟骨疾患の新規治療法の開発に寄与する可能であり、さらに、鎖骨頭蓋異形成症などの遺伝性骨疾患の病態解明や診断にも応用していく発展性を秘めている。

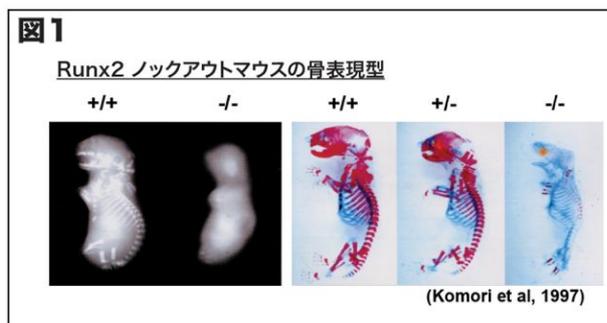
研究成果の概要(英文)：Runx2 is a master transcription factor that regulates osteoblast differentiation, and Runx2 knockout (KO) mice show complete inhibition of osteogenesis. The result of this study identified Smoc1 and Smoc2 as downstream molecules of Runx2 and showed that they are essential for the osteogenic process; Smoc1 KO mice showed loss of fibula and fusion of digits. In contrast, Smoc2 KO mice showed a short head shape in craniogenesis, but the effect on the systemic osteogenic process was minor. Subsequent analysis of Smoc1;Smoc2 double KO mice, due to a possible functional compensatory nature of Smoc1 and Smoc2, showed impaired craniogenesis and delayed endochondral bone formation in the secondary bone.

研究分野：生化学、分子生物学

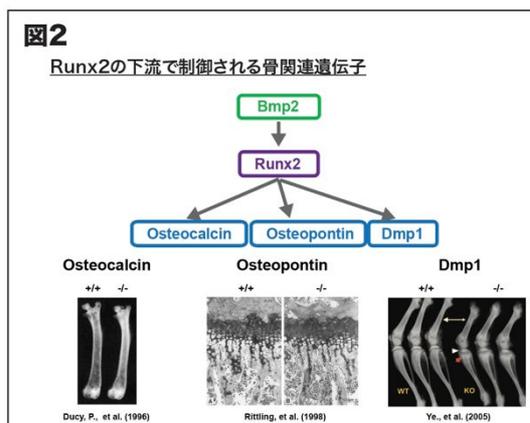
キーワード：骨格形成 発生 Runx2 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

未分化間葉系幹細胞から各種骨格形成細胞への分化は全く異なるファミリーに属する転写因子によって支配されていることが次々と明らかとされ、はじめに basic helix-loop-helix 型の転写因子が筋芽細胞への分化を支配し、筋組織の形成に必須であることが示された。それに引き続き 1997 年、ショウジョウバエの体節形成遺伝子のひとつ runt-related transcription factor 2 (Runx2) が骨芽細胞の分化を支配する遺伝子の一つとして登場し、マウスジェネティクスの遺伝学的研究手法により Runx2 のノックアウトマウスは骨形成が完全に阻害されることが示された (図 1)。



その後の数多くの研究により、Runx2 の発現調節ならびに骨形成機能の制御に、骨形成因子 Bmp2 のシグナル分子である Smad1, Smad4 および Smad5 が深く関与していることが明らかにされ、また Osterix が Runx2 の標的遺伝子であることも見出されている。さらに Bmp2/Smad シグナル、Runx2 あるいは Osterix の標的遺伝子として、オステオカルシン、オステオポンチンおよび象牙質基質酸性リタンパク質 (Dmp1) が同定され、骨芽細胞の主要な分化マーカーとしても用いられている。しかしながら、Runx2, Osterix ノックアウト (KO) マウスでは完全に骨形成が消失するにも関わらず、それらの標的遺伝子の KO マウスで骨形成障害の程度がほとんど見られない、あるいは、非常に軽微であることが報告された (図 2)。



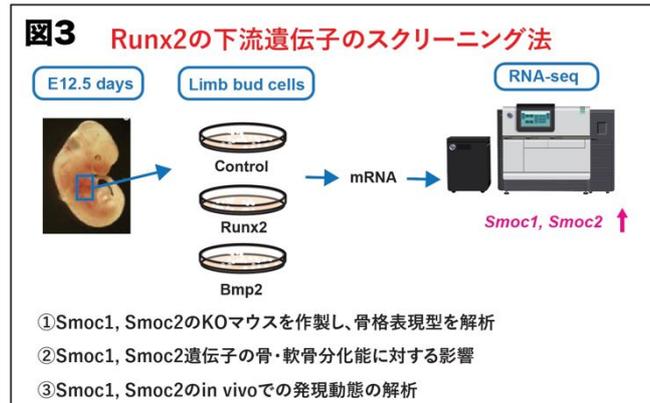
最近の研究では、Runx2 や Osterix の DNA 上への結合をゲノムワイドで解析した ChIP-seq データから、転写因子結合部位の全体像は明らかになりつつあるが (Hojo et al. Dev Cell. 2016)、Runx および Osterix 標的遺伝子の中で “真に” 骨形成にクリティカルな機能を有する遺伝子、シグナル分子の詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、「Runx2 下流の標的遺伝子の中で真に骨形成に重要なものは何か?」という学術的問題点の解決を図る。事前の予備実験として骨芽細胞分化可能を有する C2C12 細胞に対し Bmp2 刺激を行い、マイクロアレイによって遺伝子発現プロファイルを解析した。その結果、発現上昇が認められた遺伝子の中から細胞外マトリックス成分について着目し、骨格形成に対する機能解析を行った。その中の Smoc1 遺伝子について shRNA 処置により骨芽細胞でノックダウンしたところ石灰化の著明な阻害効果が認められた。そこで、本研究では間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化能を検討するには、より生理的な条件が好ましいと考え、細胞株ではなく、初代培養系で転写因子 Runx2 の下流因子の同定を試みるための着想を得た。マイクロアレイよりもより精度の高い RNA-seq によるトランスクリプトーム解析ではサンプル数を増やして統計的処置を行うことで、Smoc ファミリー遺伝子が骨格形成に真に必須の遺伝子として機能し Runx2 の下流シグナルとの関連性が明らかになる可能性が高い。本研究では、Smoc ファミリー遺伝子である Smoc1, Smoc2 の骨格形成に関する機能解析と Runx2, Osterix とのシグナル相互作用について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

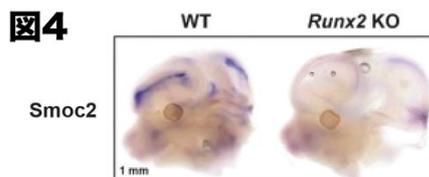
未分化間葉系幹細胞を多く含むマウス肢芽細胞に対して Bmp2, Runx2 のアデノウイルスを作用させ、RNA-seq を用いて遺伝子発現プロファイルの解析を行った。その結果、いくつかの基質タンパク質やコラーゲン関連タンパク質などの Runx2 関連遺伝子として SPARC Family タンパク質である Smoc1, Smoc2 遺伝子の発現が顕著に上昇することを見出した (図 3)。



そこで本研究では Smoc1, Smoc2 の KO マウスを作製し、各々の KO マウスの骨組織での表現型を詳細に解析する。また肢芽細胞への遺伝子過剰発現の影響ならびに、ノックアウトマウス由来肢芽細胞を用いて軟骨細胞分化、骨芽細胞分化能に対する影響を分子細胞生物学的アプローチを駆使して検討し、Bmp2/Smad シグナル、Runx2 および Osterix との関係を明らかにする。さらに Smoc1, Smoc2 の発現動態、特に骨格の発生過程における Smoc1, Smoc2 遺伝子の発現解析を実施し、発現の時空間的プロファイリングを明らかにする。

4. 研究成果

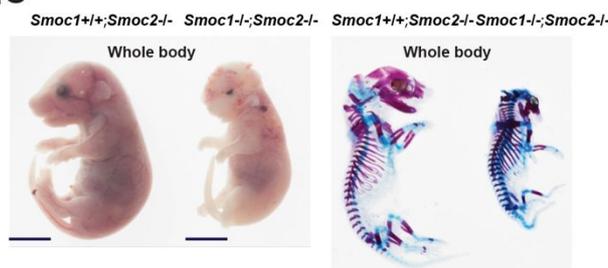
肢芽細胞に対して Bmp2 を作用させると Smoc1, Smoc2 の発現は共に上昇した。この Smoc1, Smoc2 の発現誘導効果は Runx2 の KO マウスから採取した肢芽細胞では消失した。続いて、胎生 12 日目で Whole Mount In situ hybridization を行い、マウス発生過程での遺伝子発現プロファイルを解析した。Runx2 KO マウスでは Smoc1 は脊椎や長官骨での発現レベルが減少し、Smoc2 の発現については頭蓋骨で顕著に抑制された (図 4)。



続いて生後 3 日目のマウス頭蓋骨から骨芽細胞を採取し、shRNA による Smoc1, Smoc2 遺伝子のノックダウンを行い、石灰化能を検討した。その結果、shSmoc1, shSmoc2 導入により Alkaline phosphatase 活性と石灰化の強い抑制効果が観察された。

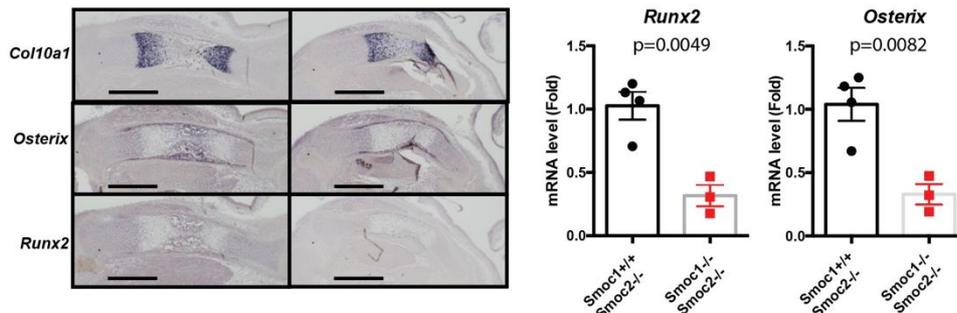
さらに Smoc1, Smoc2 の生体での骨表現型への影響を検討するため、Smoc1 と Smoc2 のノックアウトマウスを作製した。Smoc1 ノックアウトマウスは指の融合、腓骨の消失が認められ、Smoc2 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較して短頭傾向を示したが、骨格形成への影響はほとんど見られなかった。Smoc1 と Smoc2 はタンパク質の相同性が 70%ほどと高く、機能的に代償している可能性が考えられる。したがって、Smoc1 と Smoc2 のダブルノックアウトマウスを作製して骨表現型の解析を行った。その結果、Smoc1, Smoc2 のダブルノックアウトマウスは頭蓋骨の形成が完全に阻害される表現型を示した (図 5)。

図5



さらに内軟骨骨形成に対する影響も検討するため、胎生 15 日目の脛骨から病理組織標本を作製し、in situ hybridization による各種骨・軟骨マーカー遺伝子の発現解析を行った。その結果、軟骨分化の後期マーカーである Col10a1 の発現の遅延と Runx2, Osterix 発現の減少が観察された(図 6)。以上の結果から、本研究では、骨形成に關与する Runx2 標的分子の同定を試み、Smoc1 と Smoc2 の骨格形成に關する膜性骨化および内軟骨骨形成のいずれにおいても重要な機能を持つことを明らかにした。この成果は原著論文として Communications Biology 誌に掲載された。

図6



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 Takahata Yoshifumi, Hagino Hiromasa, Kimura Ayaka, Urushizaki Mitsuki, Yamamoto Shiori, Wakamori Kanta, Murakami Tomohiko, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 23
2. 論文標題 Regulatory Mechanisms of Prg4 and Gdf5 Expression in Articular Cartilage and Functions in Osteoarthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4672
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23094672	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 Yoshifumi Takahata, Hiromasa Hagino, Ayaka Kimura, Mitsuki Urushizaki, Sachi Kobayashi, Kanta Wakamori, Chika Fujiwara, Eriko Nakamura, Kayon Yu, Hiroshi Kiyonari, Kana Bando, Tomohiko Murakami, Toshihisa Komori, Kenji Hata, Riko Nishimura	4. 巻 4
2. 論文標題 Smoc1 and Smoc2 regulate bone formation as downstream molecules of Runx2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications biology	6. 最初と最後の頁 1199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02717-7	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takahata Yoshifumi, Murakami Tomohiko, Hata Kenji, Nishimura Riko
2. 発表標題 Runx2の新規標的分子の同定と骨形成における機能的役割
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

骨と軟骨の形成に、Smoc1とSmoc2遺伝子がセットが必要であることを発見 - 阪大ほか
<https://www.qlife.pro.com/news/20211025/smoc1-smoc2.html>

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