

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500330

研究課題名（和文）骨制御分子 Runx2 による中枢制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of central nervous system by Runx2

研究代表者

宝田 剛志（TAKARADA TAKESHI）

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：30377428

研究成果の概要（和文）：200 文字程度

我々は、骨芽細胞特異的表現型を特徴付ける Runt-related transcription factor 2 (Runx2) 分子が、中枢神経系にも機能的に発現する事実を報告した。本研究では、個体レベルでの Runx2 の脳機能解析を実施する目的で、Cre/loxP システムを利用した Runx2 conditional 欠損マウスの作製に取り組み、Runx2 遺伝子の exon 4 を loxP 配列にて挟んだ Runx2^{lox/+}のマウス作製に成功した。

研究成果の概要（英文）：

We have previously shown the functional expression of glutamatergic and GABAergic signaling machineries in different osseous cells including osteoblasts. Runt-related factor 2 (Runx2) is the master regulator of osteoblastic differentiation with ability to accelerate differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts, while we have also demonstrated the expression of mRNA and corresponding protein for Runx2. In this study, we for the first time generated mice carrying a conditional Runx2 allele with exon 4, which encodes the Runt domain, flanked by loxP sites. These mice were crossed with *α1(I)-collagen-Cre* or *α1(II)-collagen-Cre* transgenic mice to obtain osteoblast- or chondrocyte-specific Runx2 deficient mice, respectively. In newborn *α1(II)-Cre;Runx2^{lox/lox}* mice, mineralization impairment was restricted to skeletal areas undergoing endochondral ossification including long bones and vertebrae. In contrast, no apparent skeletal abnormalities were seen in mutant embryo, newborn, and 3- to 6-week old-mice in which Runx2 had been deleted with the *α1(I)-collagen-Cre* driver. The Runx2 floxed allele established here is undoubtedly useful for investigating the role of Runx2 in particular cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子薬理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経細胞、アストロサイト、Runx2、コンディショナル欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、ダイナミックに破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返し、再構築(リモデリング)を営むことにより形態や機能を維持している。このリモデリング過程を調節する代表的な骨制御分子である Runt-related transcription factor 2 (Runx2) は、

それ自体には DNA 結合能を有さない Cbfb とヘテロ二量体を形成して、骨芽細胞特異的表現型を特徴付ける各種遺伝子 (type I collagen, osteopontin, osteocalcin, matrix metalloproteinase13) の転写制御を担い、骨芽細胞分化のマスターレギュレーター転写制御因子として機能する。実際、Runx2 null 欠

損(KO)マウスでは完全に骨芽細胞を欠失しており、骨形成が全く認められず、生後 1-2 日で死亡する。

我々は、中枢神経系の興奮性情報伝達物質であるグルタミン酸や D-セリンが、骨組織を構成する細胞においても、シグナル分子として機能することを多数報告してきた。これらの研究成果から、「骨」と「中枢」との恒常性維持メカニズムの共通性に気付き、中枢神経系において骨制御分子が機能しているという逆転の構想に至った。

中枢神経系における複数の骨制御因子の発現解析の結果、骨形成における最も重要な転写因子 Runx2 が中枢神経系においても発現していることを見出した。Runx2 に関してさらに解析を行ったところ、以下に示すように非常に興味深い知見が得られた。

- ① マウス脳組織の免疫染色の結果、Runx2 は神経細胞に強く発現している。
- ② 培養アストロサイトに、小胞体ストレスが惹起されると、Runx2 の mRNA 発現が、小胞体ストレスセンサーである ATF6 依存的に誘導される。さらに Runx2 のアストロサイトへの強制発現によりグルタミン酸取り込み活性が抑制される。

したがって Runx2 は、正常時、神経細胞で生理的機能を発揮し、病態時はアストロサイトにおいて病態の発現に関与する可能性が考えられる。さらに、Runx2 がアストロサイトでのグルタミン酸取り込み能を抑制することから、ストレス下で誘導された Runx2 は、グルタミン酸誘発性神経細胞死を伴う病態の憎悪に関与することが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、上記研究仮説を基にして、骨制御分子 Runx2 の中枢神経系における生理学的・病態生理学的役割を解明することを研究目的とし、Cre/loxP システムを利用した Runx2 conditional 欠損マウスを作製し、個体レベルでの Runx2 の脳機能解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) Runx2 conditional 欠損マウスの作製
Runx2 遺伝子の exon 4 を loxP 配列にて挟んだ Targetting vector を作製し、それを ES 細胞である TT2 細胞に遺伝子導入した。組み換えをおこした ES 細胞クローンを Southern blotting により選別し、選別した ES 細胞を胚盤胞にインジェクションし、キメラマウスを得た。得られたキメラマウスは、C57BL6/J マウスと交配し、変異型遺伝子が germline transmission したことを確認し、その後 FLP マウスと交配することにより、薬剤耐性遺伝子である neo 配列を除いたマウス (Runx2^{lox/+}) マウスを得た。

(2) 各種細胞特異的 Runx2 欠損マウスの作製

Runx2^{lox/+}マウスと、各種細胞特異的 Cre recombinase 発現マウスとを交配して、以下のマウスを作製した。Col(I)-Cre;Runx2^{lox/lox} マウス (骨芽細胞特異的 Runx2 欠損マウス)、Col(II)-Cre;Runx2^{lox/lox} マウス (軟骨細胞特異的 Runx2 欠損マウス)、SynapsinI-Cre;Runx2^{lox/lox} マウス (神経細胞特異的 Runx2 欠損マウス)、S100b-Cre;Runx2^{lox/lox} マウス (アストロサイト特異的 Runx2 欠損マウス)。

4. 研究成果

Runx2 conditional 欠損マウスの作製・解析を実施した。Runx2 の Runt domain を有する exon 4 の両端に loxP 配列を有するマウス (Runx2^{lox/+}マウス) を作製した。同マウスの有用性を判断する目的で、まずは同マウスと骨芽細胞特異的 Cre マウス (Col(I)-Cre マウス) や、軟骨細胞特異的 Cre マウス (Col (II)-Cre マウス) とを交配し、骨芽細胞特異的 Runx2 欠損マウス (Col(I)-Cre;Runx2^{lox} マウス) と、軟骨細胞特異的 Runx2 欠損マウス (Col(II)-Cre;Runx2^{lox} マウス) を作製した。その結果、Col(I)-Cre;Runx2^{lox/lox} マウスでは著明な表現系は認められなかったが、Col(II)-Cre;Runx2^{lox/lox} マウスにおいて、内軟骨性骨化の障害が確認された(Takarada et al, *J Bone Miner Res*, 2013)。本研究成果により、我々の作製したマウスの有効性・有用性が確認された。

続いて、中枢組織での Runx2 の脳機能に与える影響を個体レベルで解析する目的で、神経細胞特異的 Cre マウスである SynapsinI-Cre マウスや、アストロサイト特異的 Cre マウスである S100b-Cre マウスを利用して、SynapsinI-Cre;Runx2^{lox/lox} マウス (神経細胞特異的 Runx2 欠損マウス)、S100b-Cre;Runx2^{lox/lox} マウス (アストロサイト特異的 Runx2 欠損マウス) を作製した。現在、これらマウスにて、行動学的解析を実施中である。学習・記憶解析では、放射状迷路試験、モリス型水迷路試験、音恐怖条件付け試験およびロータロッドテスト、不安・恐怖解析ではオープンフィールドテスト、また赤外線検出型専用ケージを用いて自発運動性や概日リズムの解析を行っている。

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 29 件)

- [1] Takeshi Takarada, Eiichi Hinoi, Ryota Nakazato, Hiroki Ochi, Cheng Xu, Azusa Tsuchikane, Shu Takeda, Gerard Karsenty, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, and Yukio Yoneda (2013) An analysis of skeletal

- development in osteoblast- and chondrocyte-specific Runx2 knockout mice. *J. Bone Miner. Res.* 査読有、in press. doi: 10.1002/jbmr.1945.
- [2] Takeshi Takarada, Miki Kou, Noritaka Nakamichi, Masato Ogura, Yuma Ito, Ryo Fukumori, Hiroshi Kokubo, Gabriela B. Acosta, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2013) Myosin VI reduces proliferation, but not differentiation, in pluripotent P19 cells. *PLoS ONE* 査読有、in press. doi: 10.1371/journal.pone.0063947.
- [3] Takeshi Takarada, Mika Takarada-Iemata, Yoshifumi Takahata, Daisuke Yamada, Tomomi Yamamoto, Yukari Nakamura, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2012) Osteoclastogenesis is negatively regulated by D-serine produced by osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* 査読有、227:3477-87. doi: 10.1002/jcp.24048.
- [4] Ryo Fukumori*, Takeshi Takarada*(*Equally contributed), Yuki Kambe, Ryota Nakazato, Koichi Fujikawa and Yukio Yoneda (2012) Possible involvement of mitochondrial uncoupling protein-2 in cytotoxicity mediated by acquired N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neurochem. Int.* 査読有、61:498-505. doi: 10.1016/j.neuint.2012.03.019.
- [5] Takeshi Takarada, Noritaka Nakamichi, Hirofumi Kawagoe, Masato Ogura, Ryo Fukumori, Ryota Nakazato, Koichi Fujikawa, Miki Kou and Yukio Yoneda (2012) Possible neuroprotective property of nicotinic acetylcholine receptors in association with predominant upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor in astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 査読有、90(11):2074-2085. doi: 10.1002/jnr.23101.
- [6] Takeshi Takarada, Noritaka Nakamichi, Seiya Kitajima, Ryo Fukumori, Ryota Nakazato, Nguyen Quynh Le, Yeong-Hun Kim, Koichi Fujikawa, Miki Kou and Yukio Yoneda (2012) Promoted neuronal differentiation after activation of alpha4/beta2 nicotinic acetylcholine receptors in undifferentiated neural progenitors. *PLoS ONE* 査読有、7:e46177. doi: 10.1371/journal.pone.0046177.
- [7] Takeshi Takarada, Ayumi Kodama, Shogo Hotta, Michihiro Mieda, Shigeki Shimba, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2012) Clock genes influence gene expression in growth plate and endochondral ossification in mice. *J. Biol. Chem.* 査読有、287:36081-36095. doi: 10.1074/jbc.M112.408963.
- [8] Mika Takarada-Iemata*, Takeshi Takarada*(*Equally contributed), Yukari Nakamura, Eri Nakatani, Osamu Hori and Yukio Yoneda (2011) Glutamate preferentially suppresses osteoblastogenesis than adipogenesis through the cystine/glutamate antiporter in mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 査読有、226, 652-665. doi: 10.1002/jcp.22390.
- [9] Masato Ogura, Takeshi Takarada, Noritaka Nakamichi, Hirofumi Kawagoe, Aya Sako, Ryota Nakazato and Yukio Yoneda (2011) Exacerbated vulnerability to oxidative stress in astrocytic C6 glioma cells with stable overexpression of the glutamine transporter slc38a1. *Neurochem Int.* 査読有、58, 504-511. doi: 10.1016/j.neuint.2011.01.007.
- [10] Kyosuke Uno, Takeshi Takarada, Mika Takarada-Iemata, Yukari Nakamura, Hiroyuki Fujita, Eiichi Hinoi and Yukio Yoneda (2011) Negative regulation of osteoblastogenesis through downregulation of runt-related transcription factor-2 in osteoblastic MC3T3-E1 cells with stable overexpression of the cystine/glutamate antiporter xCT subunit. *J Cell Physiol.* 査読有、226, 2953-2964. doi: 10.1002/jcp.22642.
- [11] Yoshifumi Takahata*, Takeshi Takarada*(*Equally contributed), Eiichi Hinoi, Yukari Nakamura, Hiroyuki Fujita and Yukio Yoneda (2011) Osteoblastic GABA(B) receptors negatively regulate osteoblastogenesis toward disturbance of osteoclastogenesis mediated by receptor activator of nuclear factor-kB ligand in mouse bone. *J. Biol. Chem.* 査読有、286, 32906-32917. doi: 10.1074/jbc.M111.253526.
- [12] Takahisa Gono*, Takeshi Takarada*(*Equally contributed), Ryo Fukumori, Yasushi Kawaguchi, Hirota Kaneko, Masanori Hanaoka, Yasuhiro Katsumata, Yukio Yoneda and Hisashi Yamanaka (2011) NR2-reactive antibody decreases cell viability through augmentation of Ca²⁺ influx in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 査読有、63, 3952-3959. doi: 10.1002/art.30616.

[学会発表] (計 24 件)

- [1] 宝田剛志 (2013) アミノ酸シグナルに

- よる骨格維持機構 日本薬学会第133年会、3月27-30日、パシフィコ横浜（神奈川県）
- [2] 宝田剛志、福森良、米田幸雄（2013）グルタミン酸神経毒性を規定するミトコンドリア因子 第86回日本薬理学会年会、3月21-23日、福岡国際会議場（福岡県）
- [3] 宝田剛志、福森良、米田幸雄（2012）NMDA receptor and uncoupling protein 第22回日本臨床精神神経薬理学会・第42回日本神経精神薬理学会合同年会、10月18日-20日、栃木県総合文化センター（栃木県）
- [4] Takeshi Takarada (2012) A role of the osteoblastic master regulator, runt-related factor 2 (Runx2), in astrocytes. Joint Symposium of 11th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry and 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry (APSN/JSN 2012), Invited Young Investigator Colloquia, 12 Oct. 神戸国際会議場（兵庫県）
- [5] 宝田剛志、堀田彰悟、棒葉繁紀、米田幸雄（2012）ミクログリア細胞に発現するIL-6の時計遺伝子による発現制御、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2012、9月1日、神戸学院大学（兵庫県）
- [6] 宝田剛志、堀田彰悟、棒葉繁紀、米田幸雄（2012）ミクログリア細胞における時計遺伝子の機能解析、生体機能と創薬シンポジウム2012、8月30-31日、神戸学院大学（兵庫県）
- [7] 宝田剛志（2012）グルタミン酸トランスポーターの転写制御因子 Runx2 による調節機構、第7回トランスポーター研究会年会/JTRA2012、6月10日、京都大学（京都府）
- [8] 宝田剛志、藤川晃一、米田幸雄（2012）アストロサイトのグルタミン酸輸送能に対する Runx2 の調節機能、第85回日本薬理学会年会、3月14-16日、国立京都国際会館（京都府）
- [9] Takeshi Takarada, Koichi Fujikawa, Yukio Yoneda (2011) Regulation of glutamate transport by runt related transcription factor-2 in astrocytes. Society for Neuroscience 2011, 12-16 November, Walter E. Washington Convention Center (USA)
- [10] 宝田剛志（2011）スタディグループテーマ ～神経精神疾患の治療標的としてのアストロサイト～ 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会 10月27日-29日、京王プラザホテル（東京都）
- [11] Takeshi Takarada, Yukio Yoneda (2011) Possible regulation of adult neurogenesis by Myosin VI responsive to traumatic stress in murine hippocampus. The 2nd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP), 23-25 September, Grand Hilton Hotel (Korea)
- [12] 宝田剛志、児玉歩美、檜井栄一、棒葉繁紀、米田幸雄（2010）軟骨細胞に発現する時計遺伝子による Indian hedgehog の発現制御、第17回日本時間生物学会、11月20-21日、早稲田大学（東京都）
- [13] 宝田剛志、宝田美佳、米田幸雄（2010）Runx2によるアストロサイトグルタミン酸トランスポーター制御、第118回日本薬理学会近畿部会、11月14日、千里ライフサイエンスセンター（大阪府）
- [14] Takeshi Takarada, Ryota Nakazato, Yukio Yoneda(2010) A Role of the Osteoblastic Master Regulator, Runt-related Factor 2(Runx 2) in Glutamate Transport in Astrocytes. 第29回内藤コンファレンス、10月5-8日、湘南国際村センター（神奈川県）
- [15] 宝田剛志、小西志歩、米田幸雄（2010）新規因子 Ifrd1 による神経系前駆細胞の分化制御、Neuro2010、9月2-4日、神戸コンベンションセンター（兵庫県）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：神経細胞とグリア細胞を共培養する方法

発明者：米田幸雄、宝田剛志

番号：特願2011-154155号

出願年月日：平成23年7月12日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~yakubutu/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宝田剛志 (TAKARADA TAKESHI)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：30377428

(2)研究分担者

檜井 栄一 (HINOI EIICHI)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865