

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460387

研究課題名(和文) Runx2コンディショナル欠損マウスを使用した成体間葉系幹細胞の機能解析

研究課題名(英文) in vivo analysis of Mesenchymal stem cells using Runx2 conditional KO mouse

研究代表者

宝田 剛志 (Takarada, Takeshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30377428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：組織幹細胞である間葉系幹細胞(MSC)の個体レベルでの性質の多くは謎に包まれている。Runx2コンディショナル欠損マウスを独自に開発し、同マウスでの遺伝学的解析とフローサイトメトリー解析を組み合わせた解析結果から、Prx1とSca1が共陽性なMSCが最も幹細胞性の高いMSCであり、まずSca1陰性となり、次にPrx1陰性なOsterix陽性細胞となり、そして成熟した骨芽細胞となる、という骨形成への分化過程の詳細を明らかにした。つまり、「生体内」でのMSCの細胞生物学的な特徴(どのようなMSCが、どのような系列をたどり、どのような細胞となり、どのような機能を有するか)の一端が見えてきた。

研究成果の概要(英文)：The cellular origin and essential period for Runx2 function during osteoblast differentiation in intramembranous ossification remain poorly understood. Paired related homeobox 1 (Prx1) is expressed in craniofacial mesenchyme, and Runx2 deficiency in Prx1+ derived cells (Runx2prx1-/- mice) resulted in defective intramembranous ossification. Double-positive cells for Prx1-GFP and stem cell antigen-1 (Sca1) (Prx1+Sca1+ cells) in the calvaria expressed Runx2 at lower levels and were more homogeneous and primitive as compared with Prx1+Sca1- cells. These findings indicate that the essential period of Runx2 function on intramembranous ossification would begin at the Prx1+Sca1+ mesenchymal stem cell stage and end at the Osx+Prx1-Sca1- osteoblast precursor stage.

研究分野：幹細胞医学

キーワード：間葉系幹細胞 Runx2

1. 研究開始当初の背景

日本における骨粗鬆症患者は 1,000 万人を超えると推定されており、一方、糖尿病患者数は日本では約 800 万人にのぼると推定されている。二次的に合併症として骨粗鬆症を併発する糖尿病患者も数多く見受けられる。このような事実を勘案すると、両疾患に対する効果的な治療法の確立および治療薬の開発は差し迫った社会的緊急課題である。間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell, MSC)は、自己複製能と、骨芽細胞や脂肪細胞等への多分化能を有する幹細胞である。骨芽細胞は、骨密度恒常性の維持を担うとともに、骨粗鬆症を主とする骨代謝性疾患の病態発症に関与する。脂肪細胞は脂肪組織を構成し、肥満や糖尿病との関連性が深い。一方、Runx2(Runt-related transcription factor 2) は、MSC から骨芽細胞への分化過程に必須の転写制御因子(マスターレギュレーター)として知られている。事実、Runx2 全身性欠損マウスでは骨が全く形成されない。ただし、Runx2 全身性欠損マウスが生後まもなく死亡するため、成体での Runx2 の解析は全く行われていない。この問題を解決するために私は、Runx2 を特定の細胞・時期に欠損させる Cre/loxP システムを利用した Runx2 コンディショナル欠損マウス (Runx2^{flox} マウス) の作製に着手し、それに成功した (Takarada et al, J. Bone Miner. Res., 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、従来分かっていなかった「個体レベル」での、MSC に発現する Runx2 の生理的役割・病態生理的役割(骨粗鬆症や肥満・糖尿病)と、Runx2 による MSC の動態制御機構(どんなときに増殖し、分化するのか?)を分子レベルで明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 各種細胞特異的 Runx2 欠損マウスの作製 Runx2^{flox/+}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。Prx1-Cre;Runx2^{flox/flox} マウス (Prx1 陽性細胞特異的 Runx2 欠損マウス)、Nestin-Cre;Runx2^{flox/flox} マウス (Nestin 陽性細胞特異的 Runx2 欠損マウス)、Osx-Cre;Runx2^{flox/flox} マウス (Osx 陽性細胞特異的 Runx2 欠損マウス)。

(2) フローサイトメトリ法を用いた解析 Prx1+細胞を頭蓋冠から酵素処理により単離し、各種 MSC マーカー (CD29, CD49e, CD51, CD61, CD90, CD105, PDGFR α , Sc α 1) の発現を Flow cytometry 法により単一細胞レベルで解析した。また、各 population を Cell Sorter (Aria, BD) により分取し、自己複製能の指標としての Colony forming unit-fibroblasts (CFU-F) 形成率、多分化能の指標としての骨芽細胞系列、脂肪細胞系列への分化実験を行った。

4. 研究成果

Runx2 を全身的に欠損することで膜性骨化が完全に障害されることを考えると、骨形成過程における Runx2 の役割は、間葉系幹細胞から骨芽細胞へのコミットメント、あるいは分化過程において必須の役割を担うことが強く示唆され、開発した Runx2 コンディショナル欠損マウスを使用することで、「どういった間葉系幹細胞で Runx2 が骨を作るのに重要なのか?」といった問いに答えを出ることができる。また、「その重要な細胞は、どのような集団を形成しているのか?」といった問題に取り組むことで、骨を作り出す間葉系幹細胞の細胞生物学的な特徴づけができるのではないかと考えた。

先の結果から Runx2 は、骨芽細胞以前の分化段階の細胞において重要であると考えられるために、MSC に注目した。しかし、現状では MSC と一言で言っても、多数のマーカーが乱立しており、どのマーカー陽性な MSC が真に骨形成に重要であるのかははっきりしていない。そこで、近年特に注目されている MSC マーカーである Paired related homeobox 1 (Prx1) と Nestin に注目した。先ほど同様のマウス遺伝学にて、Prx1+細胞 (Prx1-Cre マウス) あるいは Nestin+細胞 (Nestin-Cre マウス) それぞれの細胞特異的な Runx2 欠損マウスを作製し (Prx1-Cre;Runx2^{flox/flox}、Nestin-Cre;Runx2^{flox/flox}) 骨格標本を解析した。その結果、Nestin-Cre;Runx2^{flox/flox} では著明な変化認められないのに対して、Prx1-Cre;Runx2^{flox/flox} マウスでは、骨格形成に異常が認められ、特に、膜性骨化が行われる頭蓋冠にて骨化が顕著に障害されていることが分かった。つまり、Prx1+細胞の系譜細胞にて Runx2 が、骨化に重要であることが示唆される。

そこで次に、Prx1+細胞の局在や性質を調べるために、Prx1+細胞が GFP にてラベルされる Prx1-GFP マウスを使用した。同マウスの頭蓋冠を観察すると、GFP にてラベルされた Prx1+細胞が縫合の部位に非常に多く存在することが分かった。この Prx1+細胞を頭蓋冠から酵素処理により単離し、各種 MSC マーカーの発現を Flow cytometry 法により単一細胞レベルで解析した。その結果、Prx1+細胞中での各マーカー陽性な細胞の割合に関しては、高値と低値を示すマーカー種が混在していることが分かり、Prx1+細胞は、均一な集団ではなく、ヘテロな集団を構成することが考えられた。

そこで次に、Prx1+細胞中での陽性細胞の割合が一番低かった Sc α 1 に注目し、Prx1+Sc α 1+細胞と Prx1+Sc α 1-細胞とに分けて解析した。その結果、Prx1+Sc α 1+細胞では、ほとんどの MSC マーカーに対する陽性細胞の割合が 100% 近くに達し、Prx1+Sc α 1-細胞ではそのような傾向は認められなかった。つまり Prx1+Sc α 1+細胞は、均一同一な MSC 集団で

あることが示唆された。更に、Prx1+Sca1+細胞と Prx1+Sca1-細胞を、それぞれ Cell Sorter により分取し、自己複製能の指標としての CFU-F 形成率、多分化能の指標としての骨芽細胞系列、脂肪細胞系列への分化実験を実施した。その結果、Prx1+Sca1+細胞は、Prx1+Sca1-細胞と比べて、CFU-F の形成率は非常に高く、分化実験においては、骨芽細胞系列だけではなく、脂肪細胞系列への分化も認められた。つまり、Prx1+細胞の中でも Prx1+Sca1+細胞が、自己複製能と多分化能を持つ MSC としての性質をもつことが明らかとなった。

これらの研究結果から、MSC から骨芽細胞に至る分化過程においては、Prx1+Sca1+細胞、Prx1+Sca1-細胞、Prx1-Sca1-Osx+前骨芽細胞、そして Prx1-Sca1-Col(1)+成熟骨芽細胞が存在し、これらの細胞が順次分化・成熟化することにより、骨形成が行われることが推察される。では、Runx2 はどの分化段階までの細胞において、骨化に必須の役割を担うのであろうか。それを調べるために、再度マウス遺伝学の手法を利用して、Osx+細胞 (Osx-Cre マウス) 特異的な Runx2 欠損マウスを作製し、骨格標本を解析した。その結果、同マウスでは著明な骨格形成の異常が認められ、特に、膜性骨化が行われる頭蓋冠では、Runx2 全身欠損マウスと同程度に骨化が顕著に障害されていることがわかった。つまり、Osx+細胞においても Runx2 が骨化に重要であることがわかる。

従来は、どういった MSC が、前骨芽細胞や骨芽細胞となり、骨形成に関与するのかが分かっておらず、そのため、Runx2 が骨芽細胞分化系列のどういった段階で重要であるのかも長らく不明であった。既存の複数の MSC マーカーを用いた研究の結果から、その内の 2 つ、Prx1 と Sca1 が共陽性な MSC が最も幹細胞性の高い MSC であり、まず Sca1 陰性なり、次に Prx1 陰性 な Osx 陽性細胞となり、そして成熟した骨芽細胞となる、という骨形成への分化過程の詳細を明らかにした。また、Prx1+Sca1+細胞から Prx1-Sca1-Osx+細胞になる段階までの間に、Runx2 が骨形成のうえで必須の働きを持つことが分かった。

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 13 件)

- [1] Takarada T. (corresponding author), et al. (他 6 名、1 番目) Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. *Development*, 143, 211-218. (2016) 査読有
- [2] Takarada T. (corresponding author), et al. (他 8 名、1 番目) Protective upregulation of activating transcription factor-3 against glutamate neurotoxicity in neuronal cells under ischemia. *J. Neurosci. Res.* 94, 378-388. (2016) 査読有
- [3] Nakazato R., Hotta S., Takarada T. (corresponding author), et al. (他 12 名、14 番目) The intrinsic microglial clock system regulates interleukin-6 expression. *Glia* 65, 198-208. (2016) 査読有
- [4] Takarada T., et al. (他 9 名、1 番目) Possible activation by the green tea amino acid theanine of mTOR signaling in undifferentiated neural progenitor cells in vitro. *Biochem. Biophys. Rep.* 5, 89-95. (2016) 査読有
- [5] Takarada T., et al. (他 10 名、1 番目) Upregulation of Slc38a1 gene along with promotion of neurosphere growth and neuronal specification in undifferentiated neural progenitor cells exposed to theanine. *Neurochem. Res.* 41, 5-15. (2016) 査読有
- [6] Iezaki T., Onishi Y., Takarada T., et al. (他 10 名、8 番目) The transcriptional modulator Ifrd1 in osteoblasts suppresses bone formation and promotes bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 31, 573-584. (2016) 査読有
- [7] Xu C., Ochi H., Takarada T., et al. (他 6 名、6 番目) Circadian clock regulates bone resorption in mice. *J. Bone Miner. Res.* 31, 1344-1355. (2016) 査読有
- [8] Iezaki T., Ozaki K., Takarada T., et al. (他 10 名、12 番目) ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development. *J. Pathol.* 239, 426-37. (2016) 査読有
- [9] Fukasawa K., Park G., Takarada T., et al. (他 10 名、10 番目) ATF3 controls proliferation of osteoclast precursor and bone remodeling. *Sci. Rep.* 6, 30918. (2016) 査読有
- [10] Iezaki T., Fukasawa K., Takarada T., et al. (他 11 名、10 番目) The transcriptional modulator Ifrd1 regulates osteoclast differentiation through enhancing NF- κ B/NFATc1 pathway. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2451-2463. (2016) 査読有
- [11] Wei J., Shimazu J., Takarada T., et al. (他 8 名、7 番目) Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 161, 1576-1591. (2015) 査読有
- [12] Nakazato R., Takarada T. (co-first author), et al. (他 5 名、同等 1 番目) Upregulation of Runx2 through CCAAT enhancer binding protein-beta signaling pathway in microglial BV-2 cells exposed to ATP. *J. Cell. Physiol.* 230, 2510-2521. (2015) 査読有
- [13] Nakazato R., Takarada T. (co-first author), et al. (他 5 名、同等 1 番目) Constitutive and functional expression of runt-related

transcription factor-2 by microglial cells.
Neurochem. Int. 74, 24-35. (2014) 査読有

〔学会発表〕(計7件)

- [1] **宝田 剛志**：創薬・再生医療を指向した幹細胞の階層法/系譜の分子理解、第90回日本薬理学会年会、長崎(長崎ブリックホール)、2017年3月17日(Symposium organizer)
- [2] **宝田 剛志**：生体内の幹細胞を視る、操る、理解する、そして医学へ貢献する、第63回岡山大学医学部技術部研修会、岡山(岡山大学医学部)、2017年1月12日
- [3] **宝田 剛志**：遺伝子改変マウスを利用した生体内間葉系幹細胞の階層性の理解、第72回岡山実験動物研究会例会、岡山(岡山大学医学部)、2016年12月9日
- [4] **宝田 剛志**：組織機能修復を指向した間葉系幹細胞の細胞生物学的特徴づけ、第153回ECM Society、第2回Craniofacial and Stem Cell Biology Seminar、岡山(岡山大学歯学部)、2016年10月14日
- [5] **宝田 剛志**：組織再生を指向した間葉系幹細胞の細胞生物学的特徴づけ、組織再生セミナー、京都(京都大学再生医科学研究所)、2016年8月2日
- [6] **Takarada, T.**：The role of Runx2 in endochondral and intramembranous ossification during skeletogenesis. The 3rd Seoul Symposium on Bone Health, Seoul (Korea), May 29, 2015
- [7] **宝田 剛志**：骨関節組織におけるアミノ酸シグナルの役割、福島県立医科大学研究連携セミナー2014、福島、2014年7月4日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/syuufuku/Home.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宝田 剛志 (TAKARADA, Takeshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：30377428

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者

檜井 栄一 (Hinoi, Eiichi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：70360865

(4)研究協力者：なし