

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
窪木 拓男 印	研究統括
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	インプラント再生補綴学分野	身分	大学院生	氏名	土佐 郁恵
<p>論 文 題 名</p> <p>Postnatal Runx2 deletion leads to low bone mass and adipocyte accumulation in mice bone tissues (マウスにおける生後Runx2欠損は骨量減少および骨髄脂肪細胞の増加を引き起こす)</p>					
<p>論文内容の要旨 (2000字程度)</p> <p>【緒言】</p> <p>Runx2-related transcription factor (Runx)ファミリーに属する転写因子は、細胞分化の制御により個体の発生において重要な役割を果たすことが知られており、Runx1, Runx2, Runx3の3つが同定されている。中でもRunx2は、その全身欠損マウスでの骨格発生の完全な阻害が報告されて以降、骨格発生に必須な転写因子であると広く認識されるようになった。さらに、その後の細胞種特異的Runx2欠損マウスの解析により、どの細胞におけるRunx2の発現が骨格発生に寄与しているのかが明らかにされてきた。しかし、前述のRunx2全身欠損マウスが呼吸不全により生後間もなく死亡してしまうため、成体におけるRunx2の機能については未だに明らかではないのが現状である。そこで本研究では、Runx2を時期特異的に全身欠損させることが可能なコンディショナルノックアウトマウスを用いて、Runx2が成体の骨代謝や骨髄環境の恒常性維持においてどのような役割を担っているか解明を試みた。</p> <p>【方法】</p> <p>1) 生後Runx2欠損マウスの作製</p> <p>① Tamoxifen (TAM)誘導性時期特異的Runx2全身欠損マウスの作製</p> <p>成体におけるRunx2の機能を明らかにするために、Cre/loxPシステムを利用した時期特異的Runx2全身欠損マウスを作製した。Runx2のExon4を含む遺伝子領域をloxPで挟んだmutant alleleを持つRunx2コンディショナル欠損マウス (Runx2^{lox/lox}マウス)と、マウスの全身に存在しているROSA26陽性細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するROSA26-CreER^{T2}マウスを交配することにより、TAM誘導性の時期特異的Runx2全身欠損マウス (ROSA26-CreER^{T2};Runx2^{lox/lox})を作製した。</p> <p>② TAM投与によるRunx2欠損</p> <p>4週齢のROSA26-CreER^{T2};Runx2^{lox/lox}マウスに対して、コーンオイルに溶解させたTAM 1 mgを5日間連続腹腔内投与し、投与終了6週間後に解析を行った。対照群としてROSA26-CreER^{T2};Runx2^{w^t/w^t}マウスを使用した。</p> <p>③ Runx2欠損の確認</p> <p>作製した生後Runx2欠損マウスの組織においてRunx2が欠損しているかを評価する目的で、骨髄組織および骨組織を回収し、western blotting法を用いてRunx2タンパク質の発現解析を行った。</p>					

論文内容の要旨（2000字程度）

2) 生後 Runx2 欠損マウスの解析

① 骨代謝の解析

成体の骨代謝における Runx2 の役割を評価するために、脛骨の海綿骨量および皮質骨幅を micro-CT にて解析した。Hematoxylin and eosin (HE) 染色像、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色像を用いて、骨芽細胞数、破骨細胞数を算出し、Alkaline phosphatase (ALP) 染色像より骨芽細胞活性を解析した。前骨芽細胞のマーカーである Sp7 (Osterix) および骨基質タンパク質である Osteopontin (OPN) の免疫組織化学染色を行った。さらに、新生骨の形成を確認するため、屠殺 2 日および 5 日前のマウスに Calcein を投与し、骨形成速度を算出した。また、骨組織より total RNA を回収し、定量性 RT-PCR にて、骨形成マーカーおよび骨吸収マーカーの発現解析を行った。

② 骨髄脂肪細胞の解析

HE 染色像を用いて、骨髄内の脂肪細胞数を計測し評価した。さらに、骨髄脂肪細胞のマーカーである Perillipin (PLIN) の免疫組織化学染色を行った。

【結果】

1) 生後 Runx2 欠損マウスの作製

TAM 投与により Runx2 の発現が欠損されているかを western blotting 法にて評価した。その結果、*ROSA26-CreER^{T2};Runx2^{lox/lox}* マウスの TAM 投与群から回収した骨髄組織および骨組織において Runx2 タンパク質の発現はほぼ完全に消失していた。一方、*ROSA26-CreER^{T2};Runx2^{wt/wt}* マウスにおいて、TAM 投与により骨髄組織、骨組織における Runx2 タンパク質の発現に変化は認められなかった。そこで、*ROSA26-CreER^{T2};Runx2^{lox/lox}* マウスに TAM を投与した群を Runx2 欠損群、*ROSA26-CreER^{T2};Runx2^{wt/wt}* マウスに TAM を投与した群を対照群とし、以降の実験を実施した。

2) 生後 Runx2 欠損マウスの解析

① 骨代謝の解析

Micro-CT 解析の結果、対照群と比較し、Runx2 欠損群では海綿骨量 (0.4 倍, $p < 0.001$) および皮質骨幅 (0.4 倍, $p < 0.001$) が有意に低下していた。また、Runx2 欠損群では、骨表面に配列した骨芽細胞 (0.6 倍, $p < 0.01$) および TRAP 陽性の破骨細胞 (0.5 倍, $p < 0.001$) が有意に低下し、骨芽細胞活性を表す ALP 染色の染色性も低下していた。免疫組織化学染色の結果、Runx2 欠損群において前骨芽細胞のマーカーである Sp7 および骨基質タンパク質である OPN の発現が低下していた。また、Calcein を標識とした骨形成速度解析を行った結果、Calcein で標識された新生骨は Runx2 欠損群において著明に減少し、骨形成速度は有意に低下 (0.1 倍, $p < 0.01$) していた。定量性 RT-PCR の結果、*Sp7* (0.3 倍, $p < 0.1$)、*Coll1a1* (0.5 倍, $p < 0.1$)、*Spp1* (0.2 倍, $p < 0.1$)、*Alpl* (0.3 倍, $p < 0.1$) といった骨形成マーカーだけでなく、*Tnfrsf11* (RANKL) (0.2 倍, $p < 0.1$)、*Acp5* (0.3 倍, $p < 0.1$)、*Ctsk* (0.4 倍, $p < 0.1$) などの骨吸収マーカーについても mRNA 発現の有意な低下を認めた。

② 骨髄脂肪細胞の解析

HE 染色の結果、Runx2 欠損群において脂肪細胞数の有意な増加 (5 倍, $p < 0.01$) を認めた。さらに、免疫組織化学染色の結果、骨髄脂肪細胞のマーカーである PLIN の発現は増加していた。

【結論】

本研究では、時期特異的 Runx2 全身欠損マウスを用いて、骨芽細胞分化の必須転写因子である Runx2 の成体における役割について解析した。その結果、成体マウスにて Runx2 の発現を欠損すると、低代謝回転型の骨量低下および脂肪髄を示すことが明らかとなった。

今後は、間葉系幹細胞特異的に Cre を発現する *LepR-Cre* マウスや、前骨芽細胞特異的に Cre を発現する *Osterix-CreER* マウス、骨芽細胞特異的に Cre を発現する *Coll1a1-Cre* マウスと *Runx2^{lox}* マウスを交配し、細胞特異的 Runx2 欠損マウスを作製・解析し、本表現型に寄与する細胞種を同定する予定である。