

## 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24年 6月 1日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790297

研究課題名（和文）造血関連因子 Runx1 の骨軟骨組織における新規生物作用の解明

研究課題名（英文）A role of hematopoiesis-associated transcription factor, Runx1/AML1, in murine skeletal development

研究代表者

平居 貴生（HIRAI TAKAO）

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80389072

研究成果の概要（和文）：ヒト白血病発症において高頻度に遺伝子変異の標的となる転写制御関連分子として Runx1（AML1）が知られている。本研究では、骨格系形成細胞における Runx1 に特異的な新規機能を明らかにするために、組織特異的 Runx1 遺伝子欠損マウス（*Prx1-Cre:Runx1<sup>fllox/fllox</sup>*）を作製し、これらマウスの解析をおこなった。その結果、10 週齢 Runx1-cKO の海綿骨の骨密度は、野生型と比較して有意に減少していることが明らかとなった。また、Runx1 は間葉系幹細胞において、骨関連因子 Osterix の発現制御を介して骨芽細胞分化メカニズムに何らかの関与を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Runx1(AML1) encodes a hematopoiesis-associated transcription factor, the mutations of which are frequently encountered in human leukemia. To investigate the potential role of Runx1 in bone development, therefore, we systematically analyzed the skeleton of the mice in which Runx1 was removed using a Cre-loxP system (*Prx-Cre; Runx1<sup>fl/fl</sup>*: Runx1-cKO, fl: floxed allele). In these mice, Runx1 should be abolished selectively from the early mesenchyme of the calvaria and the limb primordium.  $\mu$ CT analysis showed that Runx1-cKO had significantly lower trabecular bone mineral density compared with controls. In addition, bone marrow-derived stromal cells cultures (BMSCs) from 10-week-old Runx1-cKO mice showed that bone marrow stromal osteogenic colony number relative to total colony forming number (colony-forming unit alkaline phosphatase/ CFU-fibroblast) in Runx1-cKO mice was decreased in comparison to those observed for the control mice. Taken together, these results suggest that Runx1 contributes to the murine osteogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：骨代謝学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：生体分子医学

## 1. 研究開始当初の背景

Runx1 は造血幹細胞に必須の転写関連因子であり、特に Runx1 は遺伝子破壊個体の作出と解析によって、造血系において決定的な役割を果たしていることが示され、多くの関連報告によって支持されてきた (Hayashi 他, *J. Immunol.*, 2000; Taniuchi 他, *Cell*, 2002; Ichikawa 他, *Nature Med.*, 2004)。また、Runx1 を標的とする染色体転座は白血病患者全体の 20%あまりで検出され、そのキメラ型変異遺伝子が白血病発症の根本的な原因となることが明らかにされている (Look, *Science*, 1997)。一方で、Runx1 の遺伝子破壊は初期発生段階で胚性致死となり、後期発生段階や成体での正常な機能を解析するには方法論的に限界がある。また、Runx はアミノ酸配列や分子構造のよく似た類縁分子が複数存在しファミリーを構成しており、哺乳動物では 3 種のファミリー分子 Runx1, Runx2, Runx3 が存在する。各 Runx 分子は極めてよく保存された DNA 結合モチーフ runt ドメインを持ち、いずれも CBFb を二量体形成の唯一のパートナーとして転写因子複合体を形成する。Runx1 ノックアウト (KO) が造血系に主な異常を示すのに対し、Runx2 KO では骨形成に、Runx3 KO では消化管や神経系発生に異常が見られ (Komori 他, *Cell*, 1997; Li 他, *Cell*, 2002)、各ファミリー分子それぞれの機能特異性が伺える。一方で、Runx1 が後期発生段階や成体で、正常あるいは疾患発症時に未知の機能を有する可能性は高い。事実、現所属教室の研究グループのこれまでの成果 (Fukushima-Nakase 他, *Blood*, 2005) から Runx ファミリーの分子間補償性が強く示唆されているところである。すなわち、Runx1 KO で欠失させた部位に Runx2, 3 の相同な cDNA を挿入した Targeted ノックイン (KI) マウス (Runx1-2/1-3 KI マウス) は Runx1 KO の造血障害を回復し、胎生致死も回避して成体まで育成することを現所属教室の研究グループが示している。しかしながら、造血障害がレスキューされた機能低下型 Runx1/AML1 変異体マウス (Runx1 分子のカルボキシル末端側をそのファミリー分子である Runx2 由来のものに置き換えたもの: Runx1-2 KI) は正常体と比べて個体サイズが小さく、更に胸腺及び脾臓が著しく縮退するという新たな異常が観察された。これは、KI による不十分な Runx 機能レスキューに起因する分子作用機序、標的遺伝子などの混乱によるものと推察されるが、Runx1 が特異的な造血系以外の新規機能の存在を有する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

これまでの Runx1 に関する報告例と Runx1-2 KI マウスの観察所見から、Runx1-2 KI マウスにおいても骨組織の成長に何らかの異常が生じていることが強く推察された。また、ファミリー分子間の機能補償性や Runx1 の新規機能などを明らかにするためにはシンプルな遺伝子破壊だけでなく、組織特異的・誘導的遺伝子標的実験などによるより高度な遺伝学的手法、すなわち異なった視点からのより複合的なアプローチによる解析が重要であると考えられるが、そのようなアプローチによる解析は十分になされたとは言えない。したがって、本研究計画では分子レベルおよび個体レベルの両面から Runx ファミリーの制御、作用機序、生物作用を明らかにし、特に骨組織における Runx1 の新規機能の探索を目的とした。さらに、Cre-loxP システムを利用した組織特異的 Runx1 遺伝子欠損マウスを解析し、Runx ファミリーの持つ機能補完性、特異性を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

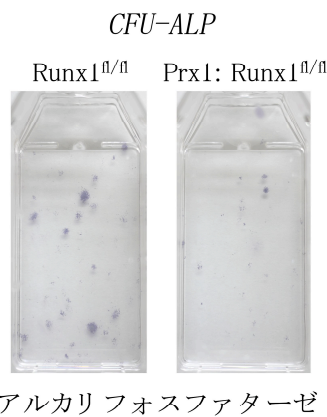
- (1) 骨組織における Runx1 に特異的な新規機能を明らかにするために、Cre-loxP システムを用いた間葉系組織特異的 Runx1 遺伝子欠損マウス (*Prx1-Cre:Runx1<sup>lox/lox</sup>*: Runx1-cKO) を作製し、これらマウスの解析を行い、Runx ファミリーの持つ機能補完性、特異性を明らかにすることを目指した。
  1. Runx1-cKO から大腿骨と頸骨を取り出し、X 線 CT 装置を用いた骨密度測定を行った。また、Runx1-cKO 由来の骨髓由来間葉系幹細胞 (bone marrow-derived stromal cells: BMSC) を培養して RNA とタンパク質を回収した後、定量的 RT-PCR により遺伝子発現について検討を行った。
  2. 骨分化誘導時における Runx1 の機能解析をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色と von Kossa 染色を用いて行った。
  3. BMSC の脂肪分化を Oil Red O 染色を指標に評価した。
- (2) Runx1<sup>lox/lox</sup> マウスから調製した BMSC に対して、組換えアデノウイルスを用いて Cre リコンビナーゼを強制的に過剰発現させ、*in vitro* における誘導的 Runx1 機能低下システムを構築した。これらの細胞について骨関連遺伝子である *Osx*、オステオポンチン mRNA の発現変動等、細胞生物学的解析を行った。

- (3) Runx ファミリーの標的分子の同定を目的とした解析を行った。Runx1 機能低下システムを用いて、マイクロアレイ法による解析を行い、Runx1 の標的候補分子を絞り込んだ。最終的に、Runx1 の標的候補分子については、レポーターアッセイを行い Runx1 が標的候補分子の発現にどのような影響を与えるのかを検討し、Runx1-cKO により影響を受ける分子カスケードの絞込みと同定を試みた。

#### 4. 研究成果

- (1) 骨格系形成細胞における Runx1 に特異的な新規機能を明らかにするために、Cre-loxP システムを用いた間葉系細胞特異的 Runx1 遺伝子欠損マウス (Runx1-cKO) を作製し、これらマウスの表現型の解析をおこなった。その結果、生後3週齢までの Runx1-cKO における胸骨剣状突起の形体異常と骨化遅延が明らかとなった。さらに、X 線 CT 装置を用いた骨密度測定の結果、10 週齢 Runx1-cKO における海綿骨の骨密度は、野生型と比較して有意に減少していることが明らかとなった。また、間葉系幹細胞の CFU-F (線維芽細胞コロニー形成単位) 活性を測定した結果、Runx1-cKO から採取した骨髄細胞の CFU-ALP (ALP 陽性 CFU) は、野生型に比べ有意に減少することが明らかとなった (図1)。

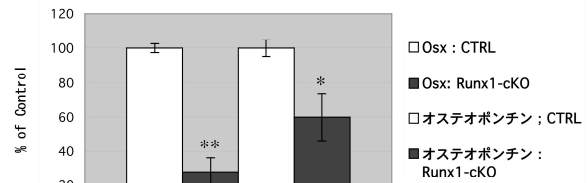
図1



- (2) Runx1-cKO から調製した BMSC を骨分化誘導し ALP 染色を用いて骨分化能を評価した結果、Runx1-cKO においては、野生型から調製した細胞と比べて、ALP 活性の低下が観察された。また、定量的 RT-PCR により分化マーカーの発現を検討した結果、骨関連因子 Osx、オステオポンチン mRNA の発現低下が確認された (図2)。すなわち、Runx1 が間葉系幹細胞から骨芽細胞への細胞分化を制御している可能性が示唆された。一方

で、Runx1-cKO から調製した BMSC の脂肪分化を Oil Red O 染色によって評価したが、Runx1 機能低下による脂肪細胞分化能への影響は見られなかった。

図2



- (3) 間葉系幹細胞に発現する Runx1 の機能的役割を検討する目的で、BMSC を Runx1<sup>fl/fl</sup> マウスから調製し、組換えアデノウイルスを用いて Cre リコンビナーゼを強制的に過剰発現させ、*in vitro* における誘導的 Runx1 機能低下システムを構築し、定量的 RT-PCR による解析を行った結果、骨関連遺伝子である Osx、オステオポンチンの mRNA 発現低下が確認された。
- (4) Runx1 は間葉系幹細胞において、骨芽細胞分化メカニズムに何らかの関与を有する可能性が示唆されたので、次に、Runx1 の標的分子【Runx1 により発現制御される遺伝子群】の同定を目指した。具体的には、BMSC において誘導的に Runx1 の機能低下を誘導したときの遺伝子変動を DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、骨関連遺伝子である Osx、Periostin、Osteoglycin, Semaphorin-3A mRNA の発現低下が観察された。また、BMSC に対する Runx1 の強制過剰発現によって Osx の mRNA 発現が有意に上昇することを定量的 RT-PCR によって確認した。以上の結果より、Runx1 は間葉系幹細胞において、Osx mRNA の発現制御を介して骨芽細胞分化メカニズムに何らかの関与を有する可能性が示唆される。
- (5) 現在、Runx1 による Osx 転写活性化への影響を検討するために、マウス線維芽細胞 C3H10T1/2 を用いて転写活性の測定を行い、Runx1 による Osx mRNA の発現制御機構に関して詳細に検討中である。また、Runx1 の標的候補分子に関しても同様の解析を継続して行う。具体的な手法は、注目する遺伝子の転写調節領域をルシフェラーゼなどのレポーターにつないだもの (レポーターベクター) を作製する。レポーターベクターと共に Runx1 発現クローンを細

胞に導入し過剰発現させる。Runx1 発現クローンが注目する遺伝子の転写調節領域に及ぼす作用をルシフェラーゼ活性などで評価する。本研究成果は Runx 分子の新たな機能・生物作用についての理解のみならず骨粗鬆症といった疾患発生における Runx 分子の作用機序理解に必要な不可欠な情報を提供することが期待される。

## 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)

[学会発表] (計 2 件)

1. 平居 貴生, 西尾 廣昭、5-HT inhibits cellular differentiation and maturation in osteoblasts. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 日, 京都.
2. 平居 貴生, 谷内 一郎, 奥田 司、A role of hematopoiesis-associated transcription factor, Runx1/AML1, in murine skeletal development. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 7 日, 神戸.

[その他]

ホームページ

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/doc/classes/basicmedicine/molecule/236.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

平居 貴生 (HIRAI TAKAO)

京都府立医科大学・医学研究科・

助教

研究者番号：80389072