

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11016

研究課題名(和文) Runx2のGalnt3発現制御を介したリン代謝調節の生理的意義の検証

研究課題名(英文) Examination of the physiological role of Runx2 in the regulation of phosphorus levels through the regulation of Galnt3 expression

研究代表者

六反田 賢 (ROKUTANDA, Satoshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：60549608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血中のリン濃度は主に、FGF23によって調節される。FGF23は、主に骨から産生されるホルモンで、腎臓でリン再吸収を抑制するとともに、活性型ビタミンDの産生量を抑制、小腸でのカルシウム・リンの吸収を抑制し、血中リン濃度を低下させる。Galnt3(UDP-N-アセチル-D-ガラクトサミン：ポリペプチド N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素 3)は、FGF23にムチン型糖鎖を付加、プロセッシングを阻害、活性を維持する。Runx2によって、Galnt3が骨芽細胞でも軟骨細胞でも発現誘導された。Runx2は、Galnt3のプロモーターを直接制御し、Galnt3を介して一部リン代謝に関与していた。

研究成果の概要(英文)：The serum levels of phosphorus are regulated by FGF23. FGF23, which is mainly produced in bone, inhibits reabsorption of phosphorus in kidney, and inhibits absorption of calcium and phosphorus in intestine by inhibiting the production of active vitamin D. Galnt3 (UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetyl-D-galactosaminyltransferase 3) inhibits the processing of FGF23 by mucin type O-glycosylation of FGF23, and maintains the activity of FGF23. Runx2 induced Galnt3 expression in osteoblasts and chondrocytes. Runx2 was involved partly in the regulation of the serum levels of phosphorus through the regulation of Galnt3 expression.

研究分野：口腔外科学

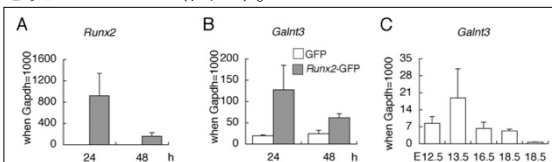
キーワード：Runx2 Galnt3 phosphorus FGF23

1. 研究開始当初の背景

血中のリン濃度は主に、FGF23 によって調節される。FGF23 は、主に骨から産生されるホルモンで、腎臓の近位尿細管細胞膜の 2a 型と 2c 型ナトリウムリン共輸送体 (NTP2a/ 2c) の発現を低下させることにより、リン再吸収を抑制する。ビタミン D3 は、肝臓で蓄積型の 25 D3 に変換され、腎臓で 1 α 水酸化酵素によって生物活性を持った 1, 25 D3 (活性型ビタミン D) に変換される。FGF23 は、近位尿細管で 1 α 水酸化酵素の発現を抑制するとともに、1, 25 D3 濃度を低下させる 24-水酸化酵素発現の促進により、活性型ビタミン D の産生量を抑制、小腸でのカルシウム、リンの吸収を抑制する。したがって、尿細管でのリン再吸収抑制と合わせ、血中リン濃度を低下させる。

Galnt3 (UDP-N-アセチル-D-ガラクトサミン:ポリペプチド N-アセチル-D-ガラクトサミン転移酵素 3) は、セリンやスレオニンの水酸基に N-アセチルガラクトサミンを付加し、O-グリカンを形成する。すなわち、ムチン型糖鎖形成の第一ステップを担う酵素である。FGF23 にムチン型糖鎖を付加し、FGF23 のプロセッシングを阻害して活性を維持する作用が明らかにされている。ヒトでの Galnt3 の異常は、FGF23 のプロセッシングが促進され、FGF23 の活性が低下、家族性高リン血症性腫瘍状石灰沈着症を引き起こす。

Runx2 は骨芽細胞分化および軟骨細胞後期分化に必須な転写因子である。Runx2 が転写調節するターゲット遺伝子をマイクロアレイで検索した結果、Runx2 によって、Galnt3 が骨芽細胞でも軟骨細胞でも発現誘導されることを見いだした (図 1)。



【図 1】
Runx2 による Galnt3 発現の誘導
(A) Runx2^{-/-}軟骨細胞を用いた、Runx2 による Galnt3 発現の誘導。Runx2 はアデノウイルスベクターで導入した。
(B) 胎生 12.5、13.5、16.5、18.5 日の野生型マウス及び胎生 18.5 日の Runx2^{-/-}マウスの四肢から抽出した RNA を用いたリアルタイム RT-PCR 解析。

そこでまず、軟骨細胞特異的 Col2a1 プロモーターを用いて、Galnt3 トランスジェニック (tg) マウスを作製した。tg マウスでは、アグリカンが減少し、矮小化を示した。軟骨内骨化は遅延し、細胞周期は亢進し、アポトーシスが増加していた。これは、グルコサミノグリカン形成の最初のステップであるセリンにキシロースを付加するキシロシルトランスフェラーゼと Galnt3 が競合し、O-グリカンを増加させ、グルコサミノグリカンを減少させるためと考えられた。一方、Galnt3 ノックアウト (ko) マウスでは、胎生期で四肢の軽度の短縮、石灰化遅延が認められた。Galnt3 ko マウスの表現型から、Runx2 の軟骨細胞の成熟促進作用の一部に Galnt3 が関与していると考え

られた。

Runx2、Galnt3、FGF23 の骨組織での発現を免疫組織染色にて検討した。Runx2 と Galnt3 は骨芽細胞および幼若骨細胞に、FGF23 は骨芽細胞および骨細胞全般に発現を認めた。すなわち、Runx2 と Galnt3 の発現はほぼ一致していた。また、Galnt3 の発現をリアルタイム RT-PCR で骨芽細胞分画と骨細胞分画で比較すると、骨芽細胞分画で有意に発現レベルが高かった。さらに、これまで FGF23 は骨細胞に発現していると考えられてきたが、骨芽細胞にも強く発現していた。したがって、Runx2 が Galnt3 の発現を誘導、Galnt3 が FGF23 の活性を維持するという経路で、Runx2 が血中リン濃度を調節している可能性がある。

2. 研究の目的

Runx2 が Galnt3 の発現誘導を介して血中リン濃度を調節しているという仮説およびその生理的意義を検証する。具体的には、

- (1) Galnt3 のプロモーター解析及び chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイにより、Runx2 が Galnt3 発現を直接制御しているか明らかにする。
- (2) 骨芽細胞特異的 Runx2 コンディショナル knock out (cko) マウスおよび骨芽細胞特異的 Runx2 tg マウスで、Galnt3 の発現、intact FGF23 の血中濃度、および血中リン濃度を測定し、Runx2 が Galnt3 の発現制御により血中リン濃度を制御しているか明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) Galnt3 プロモーター解析
 - ① Galnt3 遺伝子の転写開始点より上流 3kb の DNA 断片をクローニングし、ルシフェラーゼベクターに挿入した。さらに、3kb の DNA 断片を順次欠失させたルシフェラーゼベクターを作製した。それぞれを、Mock あるいは Runx2 発現ベクターとともに C3H10T1/2 細胞に導入、ルシフェラーゼ活性を測定した。
 - ② 3kb の DNA 断片を順次欠失させることにより、Runx2 による Galnt3 発現誘導に重要な領域を特定し、Runx2 結合配列を検索した。
 - ③ Runx2 結合配列となりうる候補配列にそれぞれ変異を導入、ルシフェラーゼ活性を測定した。
 - ④ C3H10T1/2 細胞および MC3T3-E1 細胞を用いて、抗 Runx2 抗体による ChIP アッセイを行った。

- (2) 骨芽細胞特異的 Runx2 cko マウスの作製
 - ① Cre 発現レベルと発現細胞を GFP で特定できるように、GFP-Cre の融合蛋白質を高発現する GFP-Cre マウスを、骨芽細胞特異的 2.3kb Col1a1 プロモーターを用いて作製した。このマウスが骨芽細胞特異的に発現することを、凍結切片で GFP を観察することにより確認した。次に、2.3kb Col1a1 プロモーター-GFP-Cre tg マウスを Runx2f1/f1 マウスと交配し、Runx2f1/f1GFP-Cre マウスを作製した。

(3) 血中 Ca, P, FGF23 および Galnt3 mRNA, FGF23 mRNA の測定

①Runx2f1/f1GFP-Cre マウスおよび、すでに小守研究室で作製されている 2.3 kb Colla1 プロモーターを用いた骨芽細胞特異的 Runx2 tg マウス、Galnt3 ko マウスの血中 Ca, P を測定するとともに、ELISA 法を用いて intact FGF23 を測定した。また、頭蓋冠、長管骨、下顎骨より RNA を抽出、リアルタイム RT-PCR で、Galnt3 mRNA, FGF23 mRNA を測定した。骨芽細胞特異的 Runx2 tg マウスでは、免疫組織染色で、Galnt3 の発現を野生型マウスと比較し、骨芽細胞特異的に Galnt3 発現が増強しているか調べた。Runx2f1/f1Cre マウスと Galnt3 ko マウスの血中 P, intact FGF23 を比較した。

4. 研究成果

(1) Galnt3 プロモーター解析

Galnt3 遺伝子の転写開始点より上流 3kb の DNA 断片をクローニングし、ルシフェラーゼベクターに挿入、レポーターアッセイを施行した。Runx2 発現ベクターをトランスフェクションすることにより、レポーター活性が増強された。さらに、3kb の DNA 断片を順次欠失させることにより、Runx2 発現ベクター導入による転写活性化が消失する領域を特定した。この領域には、Runx2 結合配列が 2 箇所存在した。この結合配列にそれぞれ変異を導入することにより、このうちの一つの結合配列が Runx2 による転写誘導に関与していることが明らかになった。

C3H10T1/2 細胞と MC3T3-E1 細胞で、抗 Runx2 抗体を用いた ChIP アッセイを行った。両細胞ともに、上記で特定した Runx2 による転写活性化に必要な Runx2 結合部位を挟むプライマーを用いた PCR により DNA が増幅された。すなわち、Runx2 の Galnt3 遺伝子プロモーターへの結合が確認できた。

(2) 骨芽細胞特異的 Runx2 cko マウスの作製

2.3kb Colla1 プロモーター-GFP-Cre tg マウスの作製では、GFP を強発現する F0 マウスを選択し、系統を樹立した。しかし、兄弟間で発現レベルが異なり、安定した高発現マウスを得るために、7 世代の継代を必要とした。安定して GFP-Cre を発現する tg マウスと Runx2f1/f1 マウスを交配、最終的に Runx2f1/f1GFP-Cre マウスを作製した。さらに、Runx2 ヘテロ変異マウスと Runx2f1/f1 マウスを交配し、Runx2f1/-マウスを作製した。このマウスを Runx2f1/+GFP-Cre マウスと交配し、Runx2f1/-GFP-Cre マウスを作製した。

(3) 血中 Ca, P, FGF23 の測定および Galnt3 mRNA, FGF23 mRNA 発現

まず、頭蓋冠由来の初期培養骨芽細胞を用いて、Runx2 siRNA で、Galnt3 mRNA が低下す

ることを確認した。また、Runx2^{-/-}マウスの頭蓋冠組織で Galnt3 mRNA が著減していることも確認した。さらに、2.3kb Colla1 プロモーターを用いた骨芽細胞特異的 Runx2 tg マウスで、Galnt3 mRNA が上昇していることも確認した。抗 Galnt3 抗体を用いた免疫組織染色でも、骨芽細胞特異的 Runx2 tg マウスの骨芽細胞に Galnt3 の発現上昇が確認された。これらの結果及びレポーターアッセイ、ChIP アッセイの結果から、Runx2 が Galnt3 を直接発現制御していることが明らかとなった。

8 週齢の Galnt3 ko マウスでは、野生型マウスと比較し血清 P は上昇していた。一方、血清中の FGF23 は低下していた。また、17 週齢の Galnt3 ko マウスは、野生型マウスと比較し海綿骨量及び皮質骨量の増加を認めた。6 週齢の Runx2f1/f1GFP-Cre マウスでは、Runx2f1/f1 マウスと比較し、Galnt3 mRNA 及び血清 FGF23 は低下傾向に、血清 P は増加傾向にあったが、ともに有意差を認めなかった。そのため、Runx2f1/-GFP-Cre マウスを作製した。10 週齢のメスの Runx2f1/-GFP-Cre マウスでは、Runx2f1/f1 マウスと比較し、Galnt3 mRNA の有意な低下及び血清 P の有意な上昇を認めた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

六反田 賢 (ROKUTANDA, Satoshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
客員研究員
研究者番号：60549608

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし