

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861748

研究課題名(和文) 骨格形成におけるRunx2によるFGFシグナル調節機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of the regulation of FGF signaling by Runx2 in skeletal development

## 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)・助教

研究者番号：60549608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：fibroblast growth factor receptor (FGFR)1, FGFR2, FGFR3の機能獲得型変異では、Apert, Crouzon, Pfeiffer, Muenke症候群やThanatophoric dysplasiaのように頭蓋縫合早期癒合を呈する。そして、Apert症候群とPfeiffer症候群では、合指症(骨性の癒合)等の四肢形成異常を示す。Runx2を頭蓋および四肢に過剰発現させたマウスでは、頭蓋縫合早期癒合と四肢形成異常を呈した。このマウスでは、FGFの発現に異常をきたしており、Runx2がFGFシグナルの調節に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Gain of function mutations of fibroblast growth factor receptor (FGFR)1, FGFR2, FGFR3 cause craniosynostosis such as Apert, Crouzon, Pfeiffer, Muenke syndromes and Thanatophoric dysplasia. Further, Apert syndrome and Crouzon syndrome show limb defects. The mice, in which Runx2 was overexpressed in carvaria and limbs, showed craniosynostosis and limb defects. In the mice, FGF expression in limbs was abnormal, indicating that Runx2 is involved in the regulation of FGF signaling.

研究分野：口腔外科学

キーワード：頭蓋縫合早期癒合 四肢形成異常 Runx2 FGFシグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) fibroblast growth factor receptor (FGFR) は 4 つあるが (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4) そのうち FGFR1, FGFR2, FGFR3 の機能獲得型変異では、Apert, Crouzon, Pfeiffer, Muenke 症候群や Thanatophoric dysplasia のように頭蓋縫合早期癒合を呈する。Runx2 は骨芽細胞・軟骨細胞分化に必須な転写因子であるが、FGFR1, FGFR2 の機能獲得型変異では、骨芽細胞で Runx2 の発現が亢進している (Hum. Mol. Genet. 9, 2001-2008, 2000; Development. 129, 3783-3793, 2002; Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 12555-12560, 2004; J. Biol. Chem. 279, 45926-45934, 2004)。さらに in vitro では、FGF2 による Runx2 mRNA の誘導およびリン酸化を介した Runx2 の転写活性の増強が報告されている (J. Biol. Chem. 277, 36181-36187, 2002; J. Biol. Chem. 278, 319-326, 2003)。したがって、FGF シグナルは、Runx2 を誘導、活性化させると考えられる。また、FGF シグナルは四肢形成においても重要な役割を果たす。図 1 に示すように、間葉と上皮で FGF10 と FGF8, 4 が相互に発現を維持し、FGF8, 4 が間葉系細胞の増殖を促し、肢芽が伸張する。そして Apert 症候群と Pfeiffer 症候群では、合指症 (骨性の癒合) 等の四肢形成異常を示す (Am. J. Med. Genet. 112, 266-278, 2002)。

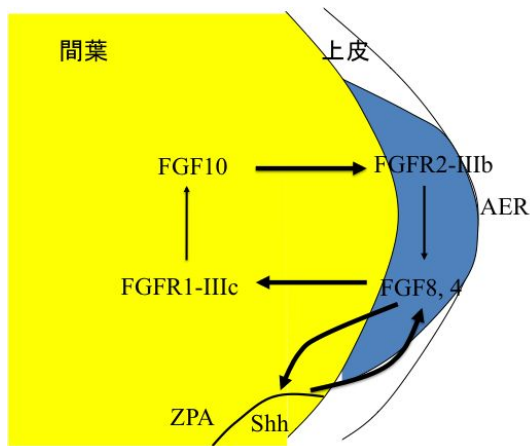


図1 四肢発生における FGF シグナルの役割

一方、FGF2 と FGF18 のノックアウトマウスでは骨形成が低下しているが、FGFR1 の骨芽細胞特異的ノックアウトマウスでは、骨量が増加している (J Clin Invest 105, 1085-1093, 2000; Genes Dev 16, 859-869, 2002; Genes Dev 16, 870-879, 2002; Dev Biol 296, 315-328, 2006)。したがって、FGF シグナル、特に個々の FGFR の骨芽細胞分化・増殖に対する機能は明らかになっていない。

(2) 我々が作製した Prrx1 プロモーターを用いて頭蓋と四肢の未分化間葉系細胞に Runx2 を過剰発現したマウスでは、頭蓋縫合早期癒合と四肢の形成異常を呈する (Bone 49, 673-682, 2011) (図 2)。四肢の形成異常

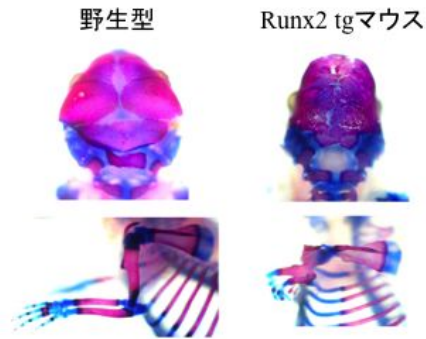


図2 胎生18.5日の野生型および中等度発現レベルのPrrx1プロモーターRunx2 tg マウスの骨格標本

は Runx2 の発現レベルによって、四肢の形成不全から、合指症に至るまでの様々な表現型を示し、発現レベルの低いマウスは、FGFR1, FGFR2 の機能獲得型変異と類似した表現型であった (図 3)。したがって、私はこれまで言われてきた FGF シグナルによる Runx2 の調節だけでなく、逆に Runx2 が FGF シグナルを調節し、Runx2 と FGF シグナルには相互調節機構があるのではないかと考えた。私は骨格形成機構を解明するため、Runx2 が骨芽細胞・軟骨細胞分化において転写調節するターゲット遺伝子の探索とターゲット遺伝子の機能解析を行ってきた (Dev Biol 328: 78, 2009; J Bone Miner Metab 29, 291-299, 2011)。今回、Prrx1 プロモーターRunx2 tg マウスの解析を起点として、Runx2 による FGF シグナル調節機構を検討することとした。

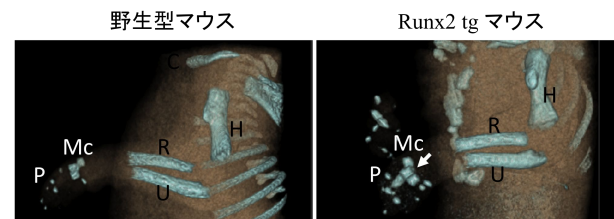


図3 胎生18.5日の野生型および弱発現Runx2 tgマウスのマイクロCT像。

Runx2 tgマウスでは、中手骨の肥大と癒合が認められる(矢印)。H: humerus, R: radius, U: ulna, Mc: metacarpal bone, P: phalanx

2. 研究の目的

Runx2 によって転写調節される遺伝子を探索し、骨格形成過程を解明する全体構想の中で、本申請では Runx2 による FGF シグナル調節機構を明らかにする。本研究期間中に以下の3点を解明する。1) Prrx1 プロモーター下での肢芽の未分化間葉系細胞における Runx2 の強制発現が、上皮および間葉系細胞での FGF および FGFR の発現をどの様に変化させるか。2) 骨芽細胞分化・増殖において、Runx2 が FGF および FGFR の発現を制御しているか。3) FGFR1-3 が、骨芽細胞分化・増殖にどのような役割を果たしているか。

### 3. 研究の方法

#### (1) Prrx1 プロモーターRunx2 tg マウスの肢芽形成過程の解析

肢芽の間葉に発現する FGF10 は、上皮に発現する FGFR2 に結合し、上皮の AER に FGF4 と FGF8 の発現を誘導する。一方、AER に発現誘導された FGF4 と FGF8 は、間葉に発現する FGFR1 に結合、間葉に FGF10 の発現を誘導し、相互に発現を維持する。また、zone of polarizing activity (ZPA) での Shh と AER の FGF4、FGF8 はお互いに発現を誘導、維持する (図 1)。したがって、これらの発現を調べることによって、肢芽形成過程で FGF シグナルが正常に働いているか検討する。

胎生 10 日および 10.5 日の野生型および Runx2 tg マウスの胎児を用いて、whole mount in situ hybridization にて、FGF10、FGF4、FGF8、Shh の発現を比較検討する。(FGF10 は、FGF4、FGF8、Shh より少し早く発現が始まると考えられるため胎生 10 日で、FGF4、FGF8、Shh は胎生 10.5 日で検出する)。

上記の胎児の切片を用いて、Runx2 抗体を用いた免疫組織染色を行い、Runx2 の発現細胞を特定する。また、FGF シグナルに異常が認められた場合、AER でのアポトーシスが亢進すると考えられるので、TUNEL 染色にて AER でのアポトーシスのレベルを調べる。

#### (2) Runx2 tg マウスのトランスジーン発現細胞における FGF、FGFR の発現解析

Runx2 tg マウスでは、green fluorescent protein (GFP) と Runx2 を結合し、Runx2 発現を GFP でトレースできるようにしてある (Bone 49, 673-682, 2011)。コントロールとして用いる Prrx1 プロモーター-GFP tg マウスと Runx2 tg マウスの胎生 10.5 日の肢芽の部分から細胞懸濁液を調整、FACS を用いて、GFP 陽性細胞を集める。RNA を抽出後 cDNA に逆転写、リアルタイム PCR にて、FGF10、FGF4、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3 の発現を調べる。また、アイソフォーム特異的なプライマーを用いて、FGFR1、FGFR2、FGFR3 それぞれの IIIb と IIIc アイソフォームの発現を調べる。

#### (3) 骨芽細胞における Runx2 による FGF シグナル調節機構の検討

新生児の頭蓋冠をコラゲナーゼ処理して集めた骨芽細胞に Runx2 発現アデノウイルスを感染させ、リアルタイム RT-PCR にて、FGF10、FGF4、FGF8、FGFR1、FGFR2、FGFR3 の発現を調べる。また、アイソフォーム特異的なプライマーを用いて、FGFR1、FGFR2、FGFR3 それぞれの IIIb と IIIc アイソフォームの発現を調べる。

上記初代培養骨芽細胞に、Runx2 の siRNA を導入、上記で誘導された遺伝子が抑制されるか検討する。

#### (4) FGFR1、FGFR2、FGFR3 による骨芽細胞分化・増殖調節機構の解析

初代培養骨芽細胞に FGFR1、FGFR2、FGFR3 の siRNA を導入、MTT アッセイで細胞増殖に対する効果を検討する。

上記と同様に siRNA を導入、アルカリホスファターゼ染色および von Kossa 染色により骨芽細胞分化に対する効果を検討する。また、アルカリホスファターゼ活性および Ca 量の測定により定量解析する。さらに、RNA を抽出、骨芽細胞マーカー (Runx2、Osterix、I 型コラーゲン、オステオポンチン、骨シアロ蛋白、オステオカルシン) の発現を調べる。

### 4. 研究成果

#### (1) Prrx1 プロモーターRunx2 tg マウスの肢芽形成過程の解析

胎生 10 日および 10.5 日の野生型および Runx2 tg マウスの胎児を用いて、whole mount in situ hybridization にて、FGF10、FGF4、FGF8、Shh の発現を比較検討した。野生型マウスでは、肢芽の間葉系細胞に FGF10、AER に FGF4、FGF8、ZPA に Shh を発現していた。一方、Runx2 tg マウスでは、肢芽の間葉系細胞に FGF10 を発現していたが、AER での FGF4、FGF8 の発現、ZPA での Shh の発現を認めなかった。また、胎生 10.5 日の組織切片で、野生型マウスでは、Runx2 は検出されず、AER に FGF8 を検出した。また TUNEL 染色で AER に少数の陽性細胞を検出した。一方、Runx2 tg マウスでは、肢芽全体に Runx2 が検出され、AER には FGF8 を検出しなかった。また、AER の TUNEL 陽性細胞は増加していた。

#### (2) Runx2 tg マウスのトランスジーン発現細胞における FGF、FGFR の発現解析

Prrx1 プロモーター-GFP tg マウス (コントロール) と Runx2 tg マウスの胎生 10.5 日の肢芽の部分から細胞懸濁液を調整、FACS を用いて、GFP 陽性細胞を集めた。RNA を抽出後 cDNA に逆転写、リアルタイム PCR にて、FGFR1、FGFR2、FGFR3 の発現を調べた。Runx2 tg マウスでは、FGFR1b、FGFR1c、FGFR2c、FGFR3b、FGFR3c の発現上昇を認めた。

#### (3) 骨芽細胞における Runx2 による FGF シグナル調節機構の検討

Runx2 の siRNA を頭蓋冠由来初代骨芽細胞に導入すると、アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、I 型コラーゲン、Osterix の発現低下を認めた。FGFR では、培養 1 日目より FGFR1、FGFR2、FGFR3 の発現低下

を認めた。アイソフォームでは、培養1日目より FGFR1b, FGFR1c の低下を認めた。培養3日目より FGFR2b の低下、培養1日目より FGFR2c の低下を認めた。培養6日目で FGFR3b と FGFR3c の著明な発現低下を認めた。

(4) FGFR1, FGFR2, FGFR3 による骨芽細胞分化・増殖調節機構の解析

FGFR1, FGFR2, FGFR3 それぞれの siRNA を頭蓋冠由来初代骨芽細胞に導入後、FGF2 を 1ng/mL, 5ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL の濃度で加え、細胞増殖を MTT アッセイでコントロールと比較した。FGFR1 siRNA はコントロールと差がなかった。FGFR2 siRNA と FGFR3 siRNA を導入した細胞では、コントロールと比較し、細胞増殖が抑制されていた。頭蓋冠由来初代骨芽細胞を用いた骨芽細胞分化実験では、FGF2 を 1ng/mL あるいは 5ng/mL 加えた場合、アルカリホスファターゼが発現上昇したが、10ng/mL あるいは 50ng/mL 加えた場合、その発現を抑制した。また、これらの濃度では、Runx2, Osterix の発現も低下した。一方、FGFR1, FGFR2, FGFR3 の siRNA を3種類とも加えても、骨芽細胞分化に明確な影響は見られなかった。

したがって、Runx2 が FGFR を調節することは明らかに出来た。FGFR は、骨芽細胞の増殖に関与したが、FGFR の骨芽細胞分化に対する作用は、FGFR の siRNA を改良する等してさらなる検討が必要である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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)・助教

研究者番号: 60549608

(2)研究分担者  
なし ( )

研究者番号:

(3)連携研究者  
なし ( )

研究者番号: