

平成 30 年 5 月 29 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：15K11048

研究課題名(和文) Runx2アイソフォームの発現と機能解析

研究課題名(英文) Studies for expression and function of Runx2 isoforms

研究代表者

川根 徹也 (KAWANE, Tetsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員

研究者番号：00265208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞分化および軟骨細胞の後期分化における主要な制御因子で骨形成に必須な転写因子であるRunx2には、N末端側の19 アミノ酸が異なる2つのアイソフォームが存在し、上流側および下流側プロモーターからそれぞれType II Runx2およびType I Runx2が転写・翻訳される。本研究では、マウスの胎生期におけるType I Runx2の発現調節を調べたところ、四肢長管骨の骨芽細胞および増殖軟骨層に強く発現していたが、肥大軟骨層にはほとんどみられなかった。これより、Runx2の両アイソフォームで発現制御が異なることが予想された。

研究成果の概要(英文)：Runx2 is the essential transcription factor for osteoblast differentiation and latter term of chondrocyte differentiation involved in bone formation. Runx2 is expressed as two isoforms (type I and type II) encoded by two different mRNAs with distinct 19 N-terminal amino acids sequence. The type I and type II Runx2 are expressed from the upper stream promoter (P2) and downstream promoter (P1), respectively. In this study, we investigate the regulation of Type I Runx2 expression through prenatal period in mice. As a result, strong expression were detected in osteoblasts and expanded cartilage layer chondrocytes, although little signal was detected in hypertrophic chondrocytes. Therefore, these two isoforms were regulated by different manner.

研究分野：細胞生物学 生化学

キーワード：Runx2 isoform 骨・軟骨

1. 研究開始当初の背景

Runx2は、骨芽細胞分化および軟骨細胞の後期分化における主要な制御因子で、骨形成に必要な転写因子である。Runx2 遺伝子には2つの異なるプロモーター (上流側から P1 および P2) が存在し、N 末端側の 19 アミノ酸が異なる2つのアイソフォーム (P1、P2 からそれぞれ Type II および Type I Runx2) が転写・翻訳される。さらに、その上流には我々が同定したエンハンサー領域が存在する (図1) (文献1)。

これらのアイソフォームが骨芽細胞・軟骨細胞分化過程にどのように関与しているかを知ることは、骨代謝を理解する上で非常に重要である。現在のところ、生体におけるこの2つのアイソフォームの発現部位および発現時期に関する解析はいくつか試みられているが結果は全く一致しておらず、統一的な結論に至っていない (文献2, 3)。

それは、間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化する初期においてRunx2 は必要な働きをするが、この段階でのRunx2 発現が低いことが最も大きな原因と考えられる。また、N 末端の19 アミノ酸のみが異なるため、両者を区別する *in situ* hybridization のプローブ設計が困難であること、抗体の作製が困難であり未だ成功例がないことなども、結果の不一致につながっていると考えられる。さらに、Runx2 遺伝子に関しては、現在のところ Runx2 ko マウス (両アイソフォームとも発現しない ko マウス) および Type II Runx2 ko マウスのみが報告されている。それによると新生児において Type II Runx2 ko マウスの骨形成は野生型に比べて阻害されているものの、Runx2 ko マウスに比べ、予想外に軽度であった (文献3, 4)。よって、Type I Runx2 も骨形成に重要な機能を果たしていると考えられるが、未だ Type I Runx2 ko マウスは作製されておらず、生体におけるこのアイソフォームの機能はわかっていない。

(参考文献)

1. Kawane, T, Komori, H et al (2014) J. Bone Miner. Res. 29, 1960-1969
2. Park, M, H et al (2001) J. Bone Miner. Res. 16, 885-892
3. Liu, J, C et al (2011) J. Biol. Chem. 286, 30057-30070
4. Zhang, S et al (2009) J. Bone Miner. Res. 24, 1889-1904

2. 研究の目的

(1) Runx2 の2つのアイソフォーム各々の発現部位および発現時期を明らかにする。すなわち、BAC クローンを用いて、各アイソフォームの翻訳開始点からの塩基配列をそれぞれ異なる蛍光タンパク質に置き換えたベクターを作製し、これらアイソフォームの発現をモニターできる tg マウスを別個に作製する (図1)。このマウスを用いることで、両アイソフォームの胎生期における発現の経時的変化を

明らかにする。

(2) Type I Runx2 を選択的に欠損させたマウスを作製し、Type I Runx2 の機能を明らかにする。すなわち、P2 プロモーターを挟む位置に相同組換えによって loxP 配列を挿入したマウスを作製し、これを Cre マウスと交配させることで P2 プロモーターが欠損し Type I Runx2 を発現しないマウスを作製する。具体的には germline Type I Runx2 ko マウスに加え、組織特異的 Type I Runx2 ko マウス、を作製する。これによって Type I Runx2 が担っている胎生期の骨格形成過程における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) CRISPR 法による Type I Runx2 flox/flox マウスの作製

報告されている P2 プロモーター上の転写開始点候補 (P2 は不明な点が多く、複数の転写開始点が報告されている) を全て網羅した約 2.5kb の領域の両端に loxP 配列を挿入する。具体的には、2.5kb の5' 端、3' 端を認識する2種類の guide RNA、5' 端、3' 端の相同配列をそれぞれ組み込んだ2種類の loxP オリゴを Cas9 mRNA とともに受精卵に注入する。偽妊娠させたマウスの卵管に移植し、マウスを得る。この方法で、P2 flox/flox マウス、P2 flox/+マウス、P2 +/-、P2 -/-マウスが生まれてくる。PCR、サザンブロット法にて、これらの genotype を決定する。マイクロインジェクションに用いる hCas9 mRNA, gRNA および一本鎖オリゴヌクレオチドの濃度は初期値として 100ng/μl, 50ng/μl, 50ng/μl とし、至適条件を検討しながら進める。

(2) Runx2 アイソフォームの発現をモニターする tg マウスの作製

① ベクターの作製

Red/ET 相同組換え法を用いて、プロモーター・エンハンサー領域を網羅する約 300kb の BAC クローン (RP23-71N21) 中の各々のアイソフォームの翻訳開始点からの塩基配列を、異なる蛍光タンパク質に置き換えたベクターをそれぞれ作製する (図1)。

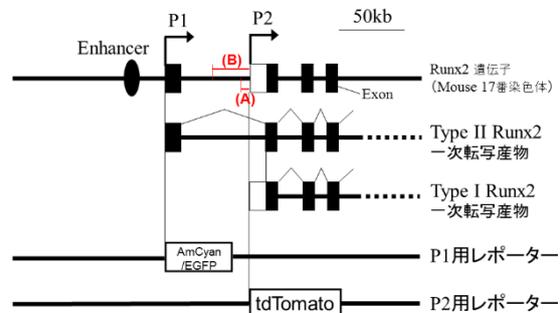


図1 マウスRunx2遺伝子の構造と作製するレポーターコンストラクト

② tg マウスの作製

上記ベクターを受精卵に導入し tg マウスを作製する。蛍光タンパク質の発現を実体顕微鏡で観察、発現マウスをスクリーニングする。

このスクリーニングでは、レポーター遺伝子の挿入しか検出できない。そのため、TaqManプローブをベクターのN端、中央部、C端で作製、ゲノム定量PCRでトランスジーンのコピー数を決めるとともに全長が挿入されているか確認する。

4. 研究成果

(1) (CRISPR法による) Type I Runx2 flox/flox (f1/f1) マウスおよび germline Type I Runx2 ko マウスの作製

Runx2 P2 プロモーターの転写開始点は単一ではなく散在しているが、翻訳開始点の約 2.4kb 上流までに集中していると考えられている。そこで、P2 プロモーター(約 2.5kb)を loxP 配列で挟むターゲティングベクターを構築し、ES 細胞を用いた相同組換え法により、Type I Runx2 (f1/f1)マウスの安定な 2 系統を作製した(図1の(A))。そして、CAG-Cre マウスと交配させることで germline Type I Runx2 hetero (ht) マウスを、さらにこの ht マウス同士を交配させて Type I Runx2 hetero ko マウスを作製した。しかし、この ko マウスの Type I Runx2 mRNA 発現は消失しておらず、50%程度は発現しており、脛骨の Runx2 mRNA レベルは野生型に比べほとんど減少していなかった。CAGE 解析による発現頻度にも大きな変化はみられなかった。

そこで、近傍に存在する他の遺伝子(Supt3)の発現に影響しない範囲で Type I Runx2 翻訳開始点より上流の領域を欠失させる目的で、作製した ko マウスに、その翻訳開始点より約 24kb 上流の位置に loxP 配列を CRISPR 法で挿入し、新たな Type I Runx2 (24kb) (f1/f1) マウスを作製した(図1の(B))。そして、先の 2.5kb ko マウスと同じ方法で、Type I Runx2 (24kb)ht マウスを得た。この ht マウスの脛骨の Runx2 mRNA レベルは野生型に比べ 20%ほど減少していたが、Type I Runx2 mRNA が完全に消失しているかは、更に解析が必要である。

(2) Runx2 アイソフォームの発現をモニターする tg マウスの作製

① ベクターの作製

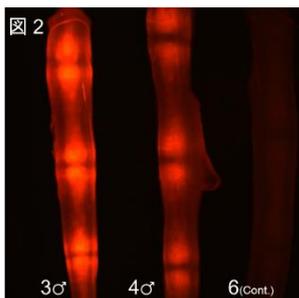
Runx2 遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域を網羅すると考えられる約 300kb の BAC クローン(RP23-71N21in pBACe3.6)を用いて、Type I Runx2 に関しては、Runx2 遺伝子の第 3 エクソン中(ggctgttgATGcgtattcctg)領域の翻訳開始点からの塩基配列を tdTomato の翻訳領域(+ polyA 付加シグナル)に置き換えた改変 BAC クローンを Red/ET 相同組換え法を用いて作製し、単一クローンとして純化した(図1)。同様に、Type II Runx2 に関して、Runx2 遺伝子の第 2 エクソン中(aggaggactATGgcgtcaaaca)領域の翻訳開始点からの塩基配列を AmCyan の翻訳領域(+ polyA 付加シグナル)に置き換えた単一の改変 BAC クローンを作製した(図1)。いずれもシ

ーケンシングによって計画されたコンストラクトであることが確認できた。

② tg マウスの作製

①で作製したレポーター-BAC クローンを F1 マウスの受精卵にインジェクションし、ICR マウスを仮親として移植し出産させ、4 週令まで授乳させて指を genotyping、尾部を蛍光顕微鏡による蛍光観察のために採取し解析することで発現マウスをスクリーニングした。

Genotyping の結果、Type I Runx2 レポーター DNA が組み込まれたマウスの出現率は 22 匹中 8 匹、Type II Runx2 レポーター DNA が組み込まれたマウスの出現率は 128 匹中 6 匹であった。



蛍光観察の結果、Type I Runx2 レポーターマウスに関しては、蛍光強度の強いものが 8 匹中 2 匹得られた(図2)。この 2 系統は世代を重ねても蛍光強度は減衰しなかった。また

このうち 1 系統(No. 4)は、ゲノム定量 Real-Time PCR の結果、BAC クローンのほぼ全長が組み込まれているものと考えられた。一方、Type II Runx2 レポーターマウスに関しては、蛍光強度の強いものは得られなかった。Type I Runx2 レポーターマウスの胎児における Type I Runx2 の組織分布を観察したところ、胎令 13.5 日においては、四肢の増殖軟骨部分の細胞に強く発現していた。胎令 16.5 日においては、四肢長管骨の骨芽細胞および増殖軟骨層に強く発現していたが、肥大軟骨層には発現がほとんどみられなかった。また、頭骨、顎骨においても比較的強い発現がみられた。胎令 18.5 日においては四肢長管骨の骨芽細胞および増殖軟骨層に強く発現していた。

(3) 今後の展望

胎令 16.5 日において total の Runx2 は増殖軟骨層にも強く発現していることから、Runx2 の両アイソフォームで発現制御が異なることがわかった。このため今後は、両アイソフォームで異なることが予想されるプロモーター活性化制御様式の解明が重要な課題となる。さらに、Type I Runx2 コンディショナル ko マウスや Type II Runx2 レポーターマウスを利用することで、骨格形成・維持に関わる様々な分子が、どのように Runx2 アイソフォーム発現を制御するかを解析することにより、骨格形成・維持に関わるかを明らかにでき、骨代謝の解明に大きく貢献できる。

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 13 件)

- ① Komori T: Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem Cell Biol.* 2018 Jan 22. doi: 10.1007/s00418-018-1640-6. [Epub ahead of print] [査読有]
- ② Yang M, Arai A, Udagawa N, Hiraga T, Lijuan Z, Ito S, Komori T, Moriishi T, Matsuo K, Shimoda K, Zahalka AH, Kobayashi Y, Takahashi N, Mizoguchi T: Osteogenic Factor Runx2 Marks a Subset of Leptin Receptor-Positive Cells that Sit Atop the Bone Marrow Stromal Cell Hierarchy. *Sci Rep.* 2017 Jul 10;7(1):4928. doi: 10.1038/s41598-017-05401-1. [査読有]
- ③ 川根徹也, 小守壽文: 骨形成を制御する転写因子 Runx2 と Osterix, 分子リウマチ治療, 10(2):28-32, 2017
- ④ Miyazaki T, Inoue M, Baba T, Komori T: Overexpression of Sp7 in odontoblasts results in dentinogenesis imperfecta due to the inhibition of odontoblast maturation. *J Oral Biosci.* 59(2)113-120, 2017 [査読有]
- ⑤ Oya K, Ishida K, Nishida T, Sato S, Kishino M, Hirose K, Ogawa Y, Ikebe K, Takeshige F, Yasuda H, Komori T, Toyosawa S: Immunohistochemical analysis of dentin matrix protein 1 (Dmp1) phosphorylation by Fam20C in bone: implications for the induction of biomineralization. *Histochem Cell Biol.* 2017 Mar; 147(3):341-351 [査読有]
- ⑥ Komori T: Roles of Runx2 in skeletal development. *Adv Exp Med Biol.* 962:83-93, 2017 [査読有]
- ⑦ Komori T: Glucocorticoid signaling and bone biology. *Horm Metab Res.* 48(11):755-763, 2016 [査読有]
- ⑧ Togo Y, Takahashi K, Saito K, Kiso H, Tsukamoto H, Huang B, Yanagita M, Sugai M, Harada H, Komori T, Shimizu A, MacDougall M, Bessho K: Antagonistic functions of USAG-1 and RUNX2 during tooth development. *PLoS One* 11(8): e0161067, 2016 [査読有]
- ⑨ Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, Furuichi T, Ito M, Komori T: Overexpression of BCLXL in osteoblasts inhibits osteoblast apoptosis and increases bone volume and strength. *J Bone Miner Res.* 31(7):1366-80, 2016 [査読有]
- ⑩ Jiang Q, Qin X, Kawane T, Matsuo Y, Taniuchi I, Komori H, Ito K, Izumi S, Komori T: Cbfb2 isoform dominates more potent Cbfb1 and is required for skeletal development. *J Bone Miner Res.* 31(7):1391-404, 2016 [査読有]
- ⑪ Miyazaki T, Baba T, Mori M, Moriishi T, Komori T: Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed in terminally differentiated odontoblasts and severely down-regulated in morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice. *Cell Tissue Res.* 361(2):457-66, 2015 [査読有]
- ⑫ Komori T: Animal models for osteoporosis. *Eur J Pharmacol.* 759:287-94, 2015 [査読有]
- ⑬ Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Taniuchi I, Ito K, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori T: Cbfb regulates bone development by stabilizing Runx family proteins. *J Bone Miner Res.* 30(4):706-14, 2015 [査読有]

[学会発表] (計6件)

- ① 姜晴, 小守壽文: Functions of Runx family transcription factors and Cbfb in skeletal development, 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎, 3月, 2017
- ② 山本 知真也, 長谷川 智香, 小守 壽文, 網塚 憲生: 骨芽細胞特異的 PTHrP 過剰発現マウスの下顎骨・長管骨における組織化学・微細構造学的解析, 第36回日本骨形態計測学会, 新潟, 6月, 2016
- ③ 小守 壽文: 骨細胞ネットワークによる骨量調節, 第36回日本骨形態計測学会, 新潟, 6月, 2016
- ④ 姜晴, 秦昕, 小守寿人, 松尾友紀, 宮崎敏博, 森石武史, 小守壽文: Cbfb1 と Cbfb2 アイソフォームは骨格形成過程において重要な役割を果たす, 第58回歯科基礎医学学会学術大会, 札幌, 8月, 2016
- ⑤ 楊孟雨, 溝口利英, 宇田川信之, 松尾光一, 小守壽文, 森石武史, 小林泰浩, 高橋直之: PTH アナボリック作用に対する骨髄間葉系幹細胞の寄与, 第34回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7月, 2016
- ⑥ 森石武史, 福山亮, 古市達哉, 伊東昌子, 小守壽文: アポトーシス抑制遺伝子 BCLXL を骨芽細胞に過剰発現させると骨量が増加し生涯を通して骨量が維持される, 第34回日本骨代謝学会学術集会, 大阪, 7月, 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川根 徹也 (KAWANE, Tetsuya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・技術職員

研究者番号: 00265208

(2) 研究分担者

小守 壽文 (KOMORI, Toshifumi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
教授
研究者番号：00252677

(3) 連携研究者

① 宮崎 敏博 (MIYAZAKI, Toshihiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
准教授
研究者番号：10174161

② 森石 武史 (MORIISHI, Takeshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
助教
研究者番号：20380983