

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19654

研究課題名（和文）Runx2による骨におけるI型コラーゲン遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of the regulation of Col1a1 gene expression by Runx2

研究代表者

小守 壽文（KOMORI, Toshihisa）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授

研究者番号：00252677

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：I型コラーゲンは、骨の有機基質の90%以上を占める主要なタンパク質であり、2本の1鎖と1本の2鎖が3重コイルをつくる。1鎖はCol1a1遺伝子、2鎖はCol1a2遺伝子によってコードされている。Col1a1遺伝子では、転写開始点上流2.3 kbが骨芽細胞でのCol1a1発現制御領域であることが明らかにされている。しかし、その遺伝子発現がどのように制御されているかは、未だに明らかになっていない。我々は、Col1a1遺伝子の解析により、骨芽細胞分化のマスター転写因子であるRunx2がその発現制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症は国内だけでも1280万人おり、高齢化に伴いその数は年々増加している。しかし、長期間使える骨形成促進剤は存在しない。I型コラーゲンは、骨の大部分を占める重要な基質タンパク質であり、その発現制御機構の解明は、骨粗鬆症の治療薬の開発や、骨再生療法の開発に非常に重要である。したがって、今回その発現制御機構の一端を明らかにしたことは、今後その全容解明につながり学術的に重要であるのはもちろんであるが、骨形成促進剤の開発にも大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：Type I collagen is a major organic substrate and composes more than 90% of bone. Type I collagen is composed of two 1 strands and one 2 strand forming a triple helical structure. The 1 strand is encoded by Col1a1, and the 2 strand is encoded by Col1a2. 2.3 kb DNA upstream of the transcription start site has been shown to regulate Col1a1 expression in osteoblasts. However, it still remains to be clarified how Col1a1 expression is regulated. We found that Runx2, which is a master transcription factor for osteoblast differentiation, plays an important role in the regulation of Col1a1 expression in osteoblasts.

研究分野：骨・軟骨代謝学

キーワード：I型コラーゲン Runx2 骨粗鬆症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

I型コラーゲンは、骨の有機基質の90%以上を占める主要なタンパク質であり、2本の1鎖(*Col1a1* 遺伝子)と1本の2鎖(*Col1a2* 遺伝子)が3重コイルをつくる。*Col1a1* 遺伝子では、転写開始点より上流2.3 kbのプロモーター領域が、骨芽細胞での発現を制御していることがレポーターマウスによって明らかにされている¹。この2.3 kbプロモーターを用いた *in vitro* レポーターアッセイで、Sp7/OsterixとNFATによる*Col1a1*の発現制御が報告されたが、2.3 kb *Col1a1* プロモーター-Cre トランスジェニック(tg)マウスを用い、骨芽細胞特異的にSp7を欠失させたマウスでは、*Col1a1*の発現低下を認めなかった^{2,3}。一方、Runx2に関しては、*in vitro*のレポーターアッセイ及びEMSAで、*Col1a1*の-1347 bpに位置するRunx2モチーフに結合、*Col1a1*を転写活性化すると報告されたが、のちに否定された^{4,5}。また、2.3 kb *Col1a1* プロモーター-Cre tgマウスを用い、骨芽細胞特異的にRunx2のDNA結合ドメインを欠失させたマウスでは、骨量、骨形成ともに正常であった⁶。一方、同じ由来の2.3 kb *Col1a1* プロモーター-Cre tgマウスを用い、Runx2のエクソン8を欠失させ、DNA結合能を持つ異常なタンパク質を発現するマウスでは、詳細な解析は報告されていないが、骨量減少が起きている。このマウスでは、異常なRunx2タンパク質はドミナントネガティブとして働き、他のRunxファミリー遺伝子の機能も阻害している可能性がある⁷。

すなわち、骨組織で最も重要なI型コラーゲン遺伝子の発現制御機構は、未だ明らかになっていない。これは、2.3 kb *Col1a1* プロモーターが、*in vivo*では活性を示すが、*in vitro*では活性が低いことに起因する。また、世界中で使われている2.3 kb *Col1a1* プロモーター-Cre tgマウスは、発現レベルが不十分で、これを用いた骨芽細胞特異的のノックアウトマウスでは欠失効率が低く、明確な表現型が得られていないことが多い。

我々は、発現レベルと発現パターンが明確に分かるようにGFP(green fluorescent protein)とCreの融合タンパクを発現する、2.3 kb *Col1a1* プロモーター-GFP-Cre tgマウスを独自に作製した。このマウスを野生型マウスと交配すると、3段階の発現レベルのGFP-Creマウスが得られた。これは、トランスジーンが染色体上の複数箇所に組み込まれていることを示唆している。一方、このマウスをRunx2^{f1/f1}マウスと交配し、Runx2^{f1/f1Cre}マウスを作製すると、軽度及び強度の骨量減少を起こすマウスが存在した。凍結切片でGFP発現を観察することにより骨芽細胞でのGFP-Cre発現レベルを見ることができ、面白いことに、顕著な骨量減少を呈し、mRNA及び蛋白レベルで*Col1a1*の著減を示したRunx2^{f1/f1Cre}マウスほど、骨芽細胞でのGFP-Cre発現レベルは低かった。すなわち、低発現のGFP-Creが挿入されたRunx2^{f1/f1Cre}マウスではRunx2の欠失効率は低く、骨量減少は軽度になるはずだが、逆の結果になった。これは、高発現GFP-Cre挿入Runx2^{f1/f1Cre}マウスの骨芽細胞でRunx2の欠失が高効率に起き、大多数の骨芽細胞で*Col1a1*プロモーター活性が低下、GFP-Cre発現低下につながったと考えられた。すなわち、Runx2が、2.3 kb *Col1a1*プロモーター活性を直接制御している可能性が強く示唆された。

1. J Cell Biol 129: 1421, 1995. 2. Nat Med 11: 880, 2005. 3. J Bone Miner Res 24: 1055, 2009. 4. J Biol Chem 276: 7101, 2001. 5. Coll Antropol 30: 401, 2006.

2. 研究の目的

- (1) 1匹の2.3 kb *Col1a1* プロモーター-GFP-Cre tg F0マウスから、発現レベルの異なる3系統のtgマウスが得られた原因を明らかにする。
- (2) 骨芽細胞に分化後、Runx2が*Col1a1* 遺伝子を直接制御しているか明らかにする。すなわち、2.3 kb *Col1a1* プロモーター領域で、Runx2が結合し、制御する領域を特定する。
- (3) 特定した配列に変異を導入したマウスを作製、骨形成及び骨芽細胞での*Col1a1* 発現を調べることにより、Runx2による*Col1a1* 遺伝子発現制御の生理的意義を解明する。

3. 研究の方法

- (1) 2.3 kb *Col1a1* プロモーター-GFP-Cre tgマウスの全ゲノムの塩基配列を決定し、トランスジーンの挿入部位を調べた。
- (2) 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションによりトランスジーンの挿入されている染色体およびその部位を決定した。
- (3) ドロプレートデジタルPCRにより、2.3 kb *Col1a1* プロモーター-GFP-Cre tgマウスに挿入されているトランスジーンのコピー数を調べた。
- (4) Runx2抗体を用いたChIP(chromatin immunoprecipitation)シーケンスを行い、*Col1a1* 遺伝子領域でRunx2が結合する領域を調べた。
- (5) Runx2の結合配列に変異を導入したDNA断片を作成、CRISPR/Cas9システムでゲノムDNAと組み替え、変異を導入したマウスを作製した。
- (6) *Col1a1* プロモーター領域2.3 kbを含むルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、Runx2導入による活性変化を調べた。
- (7) *Col1a1* プロモーター領域DNAを順次欠失させたルシフェラーゼレポーターベクターを作成し、Runx2導入による活性変化を調べた。さらに塩基配列に変異を導入し、Runx2導入による活性変化を調べた。
- (8) Runx2による活性誘導が、変異導入により低下した塩基配列に関して、EMSA(electrophoresis

mobility shift assay)で、Runx2 が直接結合するか調べた。

4. 研究成果

- (1) 2.3 kb *Col1a1* プロモーター-GFP-Cre tg マウスのトランスジーン挿入箇所の特定
2.3 kb *Col1a1* プロモーター-GFP-Cre tg マウスの全ゲノムの塩基配列を調べたが、トランスジーン挿入部位は、14 番染色体の 1 箇所のみであった。蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを行っても 14 番染色体の同部位にのみ蛍光を検出した。すなわち、染色体上の異なる 3 領域にトランスジーンが挿入されたために、1 匹の tg F0 マウスから発現レベルの異なる 3 系統が出現したわけではなかった。そこで、ドロプレットデジタル PCR (絶対定量 PCR) により、発現レベルの異なる 3 系統の 2.3 kb *Col1a1* プロモーター-GFP-Cre tg マウスで、挿入されているトランスジーンのコピー数を詳細に調べた。3 系統ともに複数コピー挿入されていたが、その挿入部位で欠失が起こり、3 種類の発現レベルが生じていることが明らかとなった。さらに、発現の強い tg マウスのみを野生型マウスと交配することにより、最終的に発現の強い tg マウスの系統を樹立することができた。
- (2) 2.3 kb *Col1a1* プロモーターの Runx2 の結合配列に変異を導入したマウスの作製
2.3 kb *Col1a1* プロモーター領域には、3 箇所の典型的な Runx2 結合配列が存在した。この 3 箇所の配列に変異を導入した DNA 断片を作成、CRISPR/Cas9 システムでゲノム DNA と組み替え、変異を導入したマウスを作製した。しかし、ヘテロ変異でも *Col1a1* 発現は低下せず、ホモ変異では胎生早期に致死となった。解析の結果、これはランダムインテグレーションによって変異 DNA が挿入され、挿入部位の遺伝子の破壊に起因する表現型であることがわかった。
- (3) 2.3 kb *Col1a1* プロモーター解析
Runx2 抗体を用いた ChIP シークエンスの結果、Runx2 の理想的な結合配列と、ChIP シークエンスのピークは必ずしも一致しなかった。2.3 kb *Col1a1* プロモーター活性は、in vivo では高いが、in vitro では低いため、各種細胞を比較した。C2C12 細胞が Runx2 による活性誘導が最も強く見られた。C2C12 細胞を用いたレポーターアッセイで Runx2 によりレポーター活性が誘導される領域を絞り込むことにした。2.3 kb を順次欠失させていき、Runx2 による活性の誘導が欠失により低下する領域を特定した。さらにその領域で様々な変異を導入し、Runx2 による活性の誘導を調べた。同時に EMSA により、その領域に Runx2 が結合するか調べた。これらにより、少なくとも in vitro レポーターアッセイで Runx2 による活性の誘導に必要な塩基配列を特定できた。現在、この変異を CRISPR/Cas9 システムでゲノム DNA に導入したマウスを作成している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Qin Xin, Jiang Qing, Miyazaki Toshihiro, Komori Toshihisa	4. 巻 28
2. 論文標題 Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt and Pthlh signaling pathway gene expressions in suture mesenchymal cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 896 ~ 911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/hmg/ddy386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitomo Keisuke, Matsunaga Satoru, Kitamura Kei, Nakamura Takashi, Saito Akiko, Komori Toshihisa, Muramatsu Takashi, Yamaguchi Akira	4. 巻 120
2. 論文標題 Sphenoid bone hypoplasia is a skeletal phenotype of cleidocranial dysplasia in a mouse model and patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 176 ~ 186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.10.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Kazuyuki, Takahashi Katsu, Huang Boyen, Asahara Masakazu, Kiso Honoka, Togo Yumiko, Tsukamoto Hiroko, Mishima Sayaka, Nagata Masaki, Iida Machiko, Tokita Yoshihito, Asai Masato, Shimizu Akira, Komori Toshihisa, Harada Hidemitsu, MacDougall Mary, Sugai Manabu, Bessho Kazuhisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Loss of Stemness, EMT, and Supernumerary Tooth Formation in Cebpb-/-Runx2+/-Murine Incisors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-23515-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Toshihiro, T. Baba Tomomi, Mori Masako, Komori Toshihisa	4. 巻 51
2. 論文標題 Collapsin Response Mediator Protein 1, a Novel Marker Protein for Differentiated Odontoblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 185 ~ 190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1267/ahc.18030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawane Tetsuya, Qin Xin, Jiang Qing, Miyazaki Toshihiro, Komori Hisato, Yoshida Carolina Andrea, Matsuura-Kawata Viviane Keiko dos Santos, Sakane Chiharu, Matsuo Yuki, Nagai Kazuhiro, Maeno Takafumi, Date Yuki, Nishimura Riko, Komori Toshihisa	4. 巻 8
2. 論文標題 Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1038/s41598-018-31853-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Komori Toshihisa	4. 巻 149
2. 論文標題 Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochemistry and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 313 ~ 323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s00418-018-1640-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小守 壽文
2. 発表標題 Runx2による骨格形成制御機構
3. 学会等名 第124回日本日本解剖学会全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小守 壽文
2. 発表標題 Runx2による骨芽細胞分化・増殖の制御機構
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森石武史, 小笹良輔, 中野貴由, 宮崎敏博, 小守壽文
2. 発表標題 オステオカルシンはアパタイト結晶のコラーゲン線維に沿った配向に必須であり、長軸方向の骨強度を維持する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 姜晴, 秦昕, 宮崎敏博, 福山亮, 小守寿人, 森石武史, 伊藤公成, 小守壽文
2. 発表標題 Runx2は骨芽細胞分化後の骨基質蛋白質遺伝子発現に必要である
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秦昕, 姜晴, 宮崎敏博, 森石武史, 小守寿人, 小守壽文
2. 発表標題 Runx2による頭蓋冠形成制御機構
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣瀬勝俊, 宇佐美悠, 佐藤淳, 大家香織, 小守壽文, 豊澤悟
2. 発表標題 骨形成におけるゴルジ体キナーゼFam20Cの役割
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----