

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22249062

研究課題名(和文) Runx2 遺伝子の転写制御機構と骨格形成プログラム

研究課題名(英文) The mechanism of transcriptional regulation of Runx2 gene and the program of skeletal development

研究代表者

小守 壽文 (Komori, Toshihisa)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00252677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,500,000円、(間接経費) 10,950,000円

研究成果の概要(和文)：Runx2は、骨芽細胞分化と軟骨細胞の後期分化に必須な転写因子である。Runx2の転写制御機構を解明するため、Runx2のゲノム領域を順次欠失させたGFPトランスジェニックマウスを作製し、343bpの骨芽細胞特異的エンハンサーを特定した。この89bpに、Dlx5/Dlx6とMef2が直接DNA結合、さらに Tcf7, Ctnnb1, Sp7, Smad1, Sox5/Sox6が蛋白-蛋白相互作用により結合し、複合体を形成、エンハンサーを活性化していることを明らかにした。このエンハンサーの活性化により、Runx2発現が誘導され、間葉系幹細胞から骨芽細胞へと分化すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Runx2 is an essential transcription factor for osteoblast differentiation at an early stage and chondrocyte differentiation at a late stage. To elucidate the mechanism of the transcriptional regulation of Runx2 gene, we generated GFP transgenic mice using the BAC clone of Runx2 gene locus. By deleting the BAC clone, we identified osteoblast-specific enhancer. The enhancer directed GFP expression specifically to osteoblasts. Dlx5/Dlx6, Mef2, Tcf7, Ctnnb1, Sp7, Smad1, and Sox5/Sox6, which localized on the enhancer region, synergistically upregulated the enhancer activity. Dlx5 and Mef2 directly bound to the enhancer, while the other factors bound to the enhancer by protein-protein interaction. Thus, Dlx5/Dlx6 and Mef2, which formed an enhanceosome with Tcf7, Ctnnb1, Sp7, Smad1, and Sox5/Sox6, play an essential role in the osteoblast-specific activation of the enhancer, leading to the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Runx2 エンハンサー 骨芽細胞 転写制御 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は Runx2 を中心とした骨と軟骨の形成・維持の分子機構の全容解明を進めている。これまでに、Runx2 が Cbfb とともに間葉系幹細胞より骨芽細胞分化に必須であり、未熟骨芽細胞を供給するが、骨芽細胞の成熟は抑制すること (Cell 1997; J Cell Biol 2001; Nat Genet 2002; Dev Biol 2006; Dev Dyn 2007)、Runx2 と Runx3 が、軟骨細胞の後期分化に必須であるとともに Ihh を誘導し軟骨細胞の増殖を促進させること (Dev Dyn 1999; J Biol Chem 2000; J Cell Biol 2001; Genes Dev 2004)、Runx2 は、関節軟骨等の永久軟骨の性格を失わせ、永久軟骨細胞を成熟させる働きがあり、関節軟骨細胞の成熟とそれに伴う軟骨破壊によって発症する変形性関節症の原因分子の一つであること (J Cell Biol 2001; Arthritis Rheum 2006) を明らかにした。Runx2 は、間葉系幹細胞より未熟骨芽細胞を動員し、まず未熟骨が形成される。Runx2 の発現が低下するとともに、未熟骨芽細胞は成熟し、未熟骨は成熟骨へと置換されていく。また軟骨では、Runx2 は軟骨細胞へ分化後に発現上昇し、軟骨細胞を成熟させ、骨へ置換させる (J Cell Biochem 2005; Front Biosci 2008)。したがって、Runx2 遺伝子自身の、時間的・空間的発現制御が、骨芽細胞・軟骨細胞分化および骨格形成プログラムに必須である。

(2) Runx2 は、2つのプロモーター(遠位および近位)によって転写調節されている。我々は以前、近位プロモーター領域では7 kb までの各種 DNA 断片を、遠位プロモーター領域では20 kb までの各種 DNA 断片を用い、大腸菌 λ ガラクトシダーゼ遺伝子をレポーターとしてトランスジェニックマウスを作製したが、骨格組織での組織特異的発現パターンを得ることはできなかった。これは、Runx2 遺伝子の発現調節領域が、イントロンを含む広い範囲に存在していることを示唆している。そこで我々はバクテリア人工染色体 (BAC:bacterial artificial chromosome) クローンを用いて、エクソン1上流130 kb、イントロン1, エクソン2を含む約200 kb のゲノム DNA の下流に高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP:enhanced green fluorescent protein)をつないだコンストラクトを構築、生理的な発現パターンをEGFPで再現できるトランスジェニックマウスの作製に成功した。さらに、この200 kb の領域を6つに分け、それぞれを欠失する6種類のtgマウスを作製し、骨芽細胞あるいは軟骨細胞にのみEGFPを発現するトランスジェニックマウスを得た。さらに、欠損させた領域から、1.3 kb の骨芽細胞特異的エンハンサー領域を特定した。この1.3 kb エンハンサーにHsp68 最小プロモーターを連結させたEGFP トランスジェニックマウスでは、骨芽細胞にのみ発現が検出された。

2. 研究の目的

本研究期間内に1) Runx2 遺伝子の骨芽細胞特異的及び軟骨細胞特異的プロモーター・エンハンサー領域をそれぞれ確定する。2) プロモーター・エンハンサー領域における組織特異的発現に必要な転写因子を特定する。3) 共役因子を特定し転写複合体を解明する。4) 骨芽細胞特異的エンハンサーおよび軟骨細胞特異的エンハンサーを用いて Runx2 トランスジェニックマウス、Runx2 コンディショナルノックアウトマウスを作製、骨格形成機構の解明を進めるとともに、それぞれのエンハンサーの特異性、有用性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞特異的発現に必要なエンハンサーの最小必要領域の特定

骨芽細胞特異的エンハンサー1.3 kb の中でエンハンサーとして特に重要な領域を特定するために、異なる種(ヒト、マウス、ラット、オポッサム、馬、犬、鶏、カエル)で塩基配列が高度に保存された領域を検索した。また、1.3 kb を順次欠失させ、骨芽細胞系細胞株 SaOS2 細胞を用いたレポーターアッセイで、エンハンサー活性のある領域を特定した。

種間で保存されかつレポーターアッセイでエンハンサー活性が認められた塩基配列をHsp68 最小プロモーターにつなぎ、EGFP を挿入したトランスジェニックマウスを作製した。胎生16.5日のF₀ トランスジェニックマウスを蛍光顕微鏡下で観察、EGFPを発現するトランスジェニックマウスを選択した。凍結切片を作製、EGFP 発現細胞を同定した。これにより骨芽細胞特異的エンハンサーの最小必要領域を特定した。

(2) 骨芽細胞特異的エンハンサーの活性化機序の解明

骨芽細胞特異的エンハンサーの最小必要領域を用いて、発現 cDNA ライブラリーのスクリーニングを SaOS2 細胞で行い、エンハンサーを活性化する分子群を同定するとともに、それぞれの発現ベクターを発現 cDNA ライブラリーより単離した。エンハンサー-DNA に結合配列を有する転写因子で、骨芽細胞発現に関与しうる転写因子も、発現ベクターを構築した。エンハンサー-DNA が挿入されたレポーターベクターとともに、発現ベクターを個々で、あるいは様々なコンビネーションで導入、ルシフェラーゼ活性を調べ、エンハンサー活性を上昇させる分子群を同定するとともに、コンビネーションによる相乗効果を調べた。

上記で同定された分子群がエンハンサー領域に結合しているか、それぞれの抗体を用いた chromatin immunoprecipitation (ChIP) を初期培養軟骨細胞で行った。特に転写因子に関しては、electrophoresis mobility shift assay (EMSA) でエンハンサー-DNA に直接結合

するか調べた。EMSA で結合が認められず、ChIP で結合が認められた分子は、GST 融合蛋白質を発現するベクターおよび flag タグを付けた発現ベクターを構築、GST-pull down 実験で、蛋白-蛋白結合を調べた。

最小必要 DNA の転写因子結合配列に対して、個々あるいはコンビネーションで変異を導入、上記の発現ベクターを導入、変異によりレポーター活性が低下するか調べた。著明な発現低下が見られた変異 DNA を挿入した Hsp68 最小プロモーター-EGFP トランスジェニックマウスを作製、発現パターンを凍結切片で調べた。

エンハンサー領域でのヒストンのメチル化、アセチル化を ChIP 法で調べた。

これらの結果を総合し、どのような転写複合体がエンハンサーに形成されているか検討した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞特異的発現に必要なエンハンサーの最小必要領域の特定

骨芽細胞特異的エンハンサー領域 1.3kb を順次欠失させ、レポーターアッセイを行った。その結果 343bp で活性が維持された。この 343bp は、種間で高度に保存されていた。343bp を Hsp68 最小プロモーターにつないだ EGFP トランスジェニックマウスでは、骨芽細胞に特異的に発現を認めた。軟骨細胞や他の組織には発現を認めなかった。さらにこの 343bp を順次欠失させ、89bp でもレポーター活性が維持されることが明らかとなった(図 1)。この 89bp は種間で特に高度に保存されていた。89bp を用いて EGFP トランスジェニックマウスを作製した。骨芽細胞での発現は維持されたが、その発現強度は低下した(図 2)。

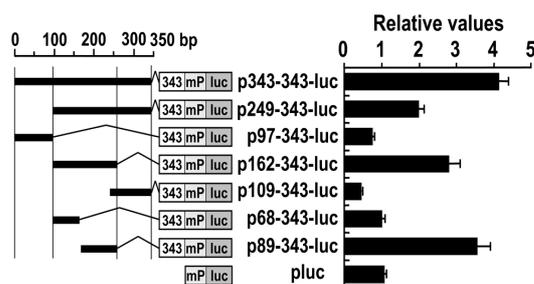


図 1 343bp およびその欠失 DNA を用いたレポーターアッセイ

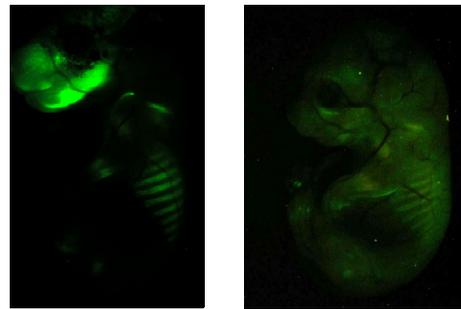


図 2 1.3kb エンハンサー-EGFP トランスジェニックマウス(左)と 89bp エンハンサー-EGFP トランスジェニックマウス(右)

(2) 骨芽細胞特異的エンハンサーの活性化機序

骨芽細胞特異的エンハンサー-343bp を 4 つタンデムに結合させたルシフェラーゼレポーターベクターを用いて、発現 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、Sp7, Ctnnb1, Smad1, Sox5, Sox6 が活性促進分子として同定された。Ctnnb1 が同定されたため、Tcf/Lef ファミリーの遺伝子を検討した結果、Tcf7 が最も活性を強く誘導した。骨芽細胞での発現を誘導できた 89bp にはホメオボックスモチーフと Mef2 結合配列が存在した。ホメオボックス遺伝子では、Dlx5 と Msx2 が骨芽細胞分化に重要な役割を果たす。Dlx5 は、343bp のエンハンサー活性を促進、Msx2 は抑制した。また、Mef2 ファミリーの中では、Mef2c が最も強くエンハンサーを活性化した。Dlx5, Mef2c, Tcf7, Ctnnb1, Sp7, Smad1, Sox6 の 7 分子はエンハンサーの活性化に相乗効果を示した(図 3)。また、Dlx5, Mef2 結合配列の変異は、エンハンサーによる骨芽細胞への発現を消失させた。

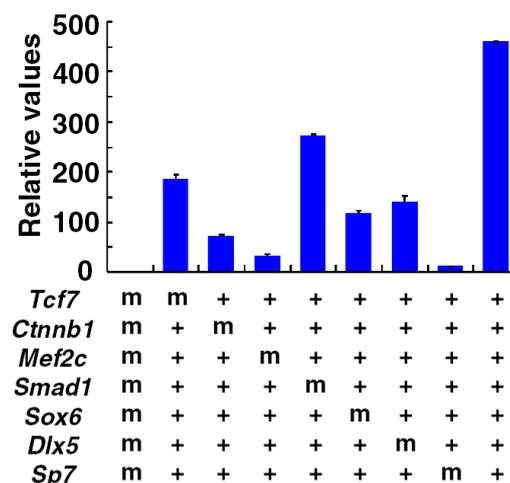


図 3 7 因子による相乗的エンハンサーの活性化 (m:mock)

EMSA では、Dlx5 と Mef2c が直接 DNA に結合したが、その他の 5 分子は結合しなかった。

プルダウンアッセイによって、Tcf7, Ctnnb1, Sp7, Smad1, Sox6 は蛋白-蛋白相互作用によって、エンハンサーに結合することが明らかになった。また、ChIP アッセイによって、これら7分子が、染色体上でエンハンサーに結合していることが確認された。これらの因子は Runx2 mRNA も誘導した。Msx2 も直接 DNA 結合していたが、Msx2 は多能性間葉系細胞で、Dlx5 は骨芽細胞で結合が認められた。したがって、Msx2 はエンハンサーを抑制していると考えられた。初期培養骨芽細胞では、このエンハンサー領域にヒストンバリエント H2A.Z が存在、ヒストン H3 の4番目のリジンがモノ、ジメチル化され、トリメチル化されていなかった。また、18番目と27番目のリジンはアセチル化されていた。これらは、エンハンサーに特徴的なクロマチン修飾である。また、18番目と27番目のリジンのアセチル化は、上記7分子によって増強された。これらの結果より、89bp に、Dlx5/Dlx6 と Mef2c が直接 DNA 結合、さらに Tcf7, Ctnnb1, Sp7, Smad1, Sox5/Sox6 が蛋白-蛋白相互作用により結合し、複合体を形成、エンハンサーを活性化していることが明らかとなった(図4)。

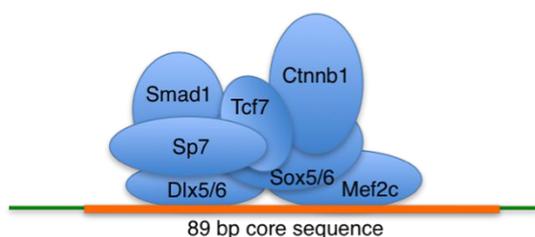


図4 骨芽細胞特異的エンハンサーにおける転写複合体

したがって、343bp は Runx2 を骨芽細胞特異的に発現させるエンハンサーであり、Dlx5/Dlx6, Mef2, Tcf7, Ctnnb1, Sp7, Smad1, Sox5/Sox6 により活性化、Runx2 発現が誘導され、間葉系幹細胞は骨芽細胞へと分化すると考えられる。

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)

[雑誌論文](計28件)

Moriishi T, Kawai Y, Komori H, Rokutanda S, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Asahina I, Komori T. Bcl2 deficiency activates FoxO through Akt inactivation and accelerates osteoblast differentiation. PLoS One. 9(1):e86629. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0086629 (査読有)
 Mizuhashi K, Komori T, Furukawa, T(他7名,9番目). Filamin-interacting proteins, Cfm1 and Cfm2, are essential for the formation of cartilaginous skeletal

elements. Hum Mol Genet. Vol.23, 2953-67, 2014. (査読有)

Ito K, Maruyama Z, Sakai A, Izumi S, Moriishi T, Yoshida CA, Miyazaki T, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of Cdk6 and Ccnd1 in chondrocytes inhibited chondrocyte maturation and caused p53dependent apoptosis without enhancing proliferation. Oncogene. Vol.33, 1862-71, 2013. (査読有)

Watanabe T, Komori T, Asahara H(他10名,11番目). MAML1 enhances the transcriptional activity of Runx2 and plays a role in bone development. PLoS Genet. 9(1):e1003132. doi: 10.1371/journal.pgen.1003132. 2013. (査読有)

Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Maeno T, Kawai Y, Komori H, Komori T. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. PLoS One. 7(6):e40143. doi:10.1371/journal.pone.0040143. 2012. (査読有)

Masuyama R, Mizuno A, Komori H, Kajiya H, Uekawa A, Kitaura H, Okabe K, Ohshima K, Komori T. Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass. J Bone Miner Res. Vol.27, 1708-1721, 2012. (査読有)

Yoshida CA, Takada K, Komori T(他13名,ラスト). SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. PLoS One. 7(3):e32364. doi: 10.1371/journal.pone.0032364. 2012. (査読有)

Moriishi T, Masuyama R, Komori T(他11名,ラスト). Overexpression of bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. PLoS One. 6 (11): e27487. doi: 10.1371/journal.pone.0027487. 2011. (査読有)

Maeno T, Moriishi T, Yoshida CA, Komori H, Kanatani N, Izumi S, Takaoka K, Komori T. Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects. Bone. Vol.49, 673-682. 2011. (査読有)

Wang Y, Masuyama R, Komori T(他12名,ラスト). Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. Bone. Vol.50, 409-419, 2012. (査読有)

Mikasa M, Rokutanda S, Komori H, Ito K, Tsang YS, Date Y, Yoshida CA, Komori T. Regulation of Tcf7 by Runx2 in chondrocyte maturation and

proliferation. J Bone Miner Metab. Vol.29, 291-299, 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計 10 件)

小守壽文: “骨細胞ネットワークによるメカニカルストレス応答” 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会.(20130920-20130922).

岡山コンベンションセンター(岡山県)

小守壽文: “Roles of Cbfb in bone development during embryonic stage and after birth” The EMBO Workshop RUNX transcription factors in development and disease.(20130616-20130619).

Wilsede, Germany.

小守壽文: “Osteocyte network and mechanical stress” 第 22 回国際リウマチシンポジウム.(20130418-20130420). 国立京都国際会館(京都府)

小守壽文: “Regulation of Bone Mass through an Osteocyte Network” 1st Bio-Rheumatology International Congress.(20111115). ヒルトン東京ベイ(東京都)

小守壽文: “Regulation of osteoblast differentiation and bone angiogenesis by RUNX2 and SP7” 第 17 回国際 RUNX ワークショップ.(20100711-20100714). オリエンタルホテル広島(広島県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 荷重感知遺伝子

発明者: 小守壽文

権利者: 長崎大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-138935

出願年月日: 2011 年 6 月 22 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 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

<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokujii/kaihou-2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小守 壽文 (Komori Toshihisa)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 00252677

(2) 研究分担者

林 日出喜 (Hayashi Hideki)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 10218589

研究分担者

増山 律子 (Masuyama Ritsuko)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 60297596

(3) 連携研究者

宮崎 敏博 (Miyazaki Toshihiro)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 101774161

連携研究者

森石 武史 (Moriishi Takeshi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 20380983