

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22689052

研究課題名(和文) 転写因子 RUNX1 による軟骨細胞の発生・分化の制御機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of transcriptional factor Runx1 in chondrogenic differentiation

研究代表者

矢野 文子 (Yano, Fumiko)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80529040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,200,000 円、(間接経費) 5,160,000 円

研究成果の概要(和文)：転写因子 RUNX1 による軟骨細胞の発生・分化の制御機構の解明のため、転写因子 Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) による軟骨分化の初期から肥大化までの全段階の制御機構を *in vitro*、*in vivo* 両面で詳細に解析した。RUNX1 は 2 型コラーゲンのプロモーター上で直接結合し、2 型コラーゲンの発現を上昇させ、RUNX1 を過剰発現させた軟骨細胞は軟骨の肥大化が抑制されることから、RUNX1 は軟骨の初期分化を促進し、肥大分化を抑制することが示唆された。また、関節軟骨の表層で発現し、関節軟骨の保護作用があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of transcriptional factor Runx1 in chondrogenic differentiation, we analyzed the function of Runx1 from early differentiation to hypertrophy in chondrocytes *in vitro* and *in vivo*. Runx1 directly binds to COL2A1 promoter and enhances Col2a1 expression but inhibits Col10a1 expression. Runx1 is an inducer of chondrogenic differentiation and a suppressor of the subsequent hypertrophy. Runx1 is expressed in articular cartilage surface of normal tissues, but not in degraded cartilage.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：Runx1 変形性膝関節症 軟骨分化

### 1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域において、顔面先天異常や外傷および腫瘍切除後に生じるおける骨・軟骨欠損が生じ、その治療として自家骨・軟骨移植が行われている。自家骨移植は採取部位の選択が幅広いのに対し、自家軟骨移植では、軟骨採取部位が限定され、増殖能力が低く、継代を重ねると分化能が低下し、脱分化するという問題点が存在する。これらの問題を解決するために永久軟骨の性質を維持させ効率的な軟骨再生医療が望まれ、そのためには軟骨基質合成を増強し、かつ肥大化しない軟骨を再生させる遺伝子またはシグナル群の同定が必要である。本研究に先立ち、研究代表者は軟骨細胞の発生分化を制御するシグナル群をさらに解明すべく、様々なスクリーニングを繰り返してきた。その一環として行った2型コラーゲンプロモーターを用いたスクリーニングによって、Runt-related transcription factor (RUNX) ファミリーのうち、RUNX1のみが2型コラーゲンを強く誘導することを突き止めた。研究代表者は世界に先立って2007年から国際学会などでRUNX1の報告を続けているが、RUNX2だけでなくRUNX1あるいはRUNX3も骨軟骨研究分野において注目されることが予想された。事実、他国の研究室からもRUNXファミリーの軟骨における報告が散見されるようになってきており、この研究分野が今後の軟骨代謝研究の最前線になる可能性は高いと予想された。

### 2. 研究の目的

転写因子RUNX1による軟骨細胞の発生・分化の制御機構の解明の研究は転写因子Runt-related transcription factor 1 (RUNX1)による軟骨分化の初期から肥大化までの全段階の制御機構をin vitro, in vivo両面で詳細に解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究に先立ち、研究代表者は成長板軟骨におけるRUNX1の蛋白の局在パターンを検討し、RUNX1が軟骨細胞の初期分化において特異的に発現することを明らかにしている。In vivoでの解析実験のためにRUNX1コンディショナルのノックアウトマウスの作出を行った。本研究では

(1) RUNX1による軟骨初期分化・基質誘導のメカニズム

(2) RUNX1による細胞増殖制御のメカニズム

(3) RUNX1による軟骨細胞の肥大化抑制のメカニズム

の3点について、それぞれ、

(a) RUNX1の標的分子の検索とそのプロモーター解析による応答領域の同定

(b) 培養細胞系を用いた機能解析

を行って分子レベルでの詳細な検討を行い、さらに、

(4) RUNX1コンディショナルノックアウトマウスを用いたin vivoの解析

(5) Runx1Laz Knockin マウスもしくはRunx1GFP Knockin マウスを用いたRunx1の関節軟骨での発現解析

を行うことにより、(1)-(3)の成果をin vivoで検証する。また、

(6) RUNX1の標的分子のスクリーニング

も行い、RUNX1を取り巻くシグナル群の解明にも着手する。

### 4. 研究成果

(1) RUNX1による軟骨初期分化・基質誘導のメカニズム

RUNX1 アデノウイルス、RUNX1 - GFP ベクターを用いた強制発現系において、RUNX1が2型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨基質遺伝子を直接誘導することをReal-time RT-PCR解析によって確認した。次にRUNX1が2型コラーゲンのプロモーターを直接誘導することを、段階的プロモーター解析によって確認したところ、転写開始点約 - 300bp 付近にRUNX1の応答領域(結合モチーフ)があることを見出した。さらに、electrophoretic mobility shift assay(EMSA), chromatin IP assay (ChIP)を行い、それぞれのプロモーター領域におけるRUNX1の応答領域の同定を行うことで再確認した。RUNX1は2型コラーゲンを直接誘導するだけでなく、軟骨マスター因子であるSOX5、SOX6

、SOX9の誘導を介して間接的に誘導する経路も考えられるため、上記と同様にSOX6のプロモーター解析を行ったところ、転写開始点約 - 500bp 付近にRUNX1の応答領域(結合モチーフ)があることを見出し、EMSA、ChIPでRUNX1のSOX6プロモーター応答領域を同定した。

(2) RUNX1による細胞増殖制御のメカニズム

軟骨細胞の増殖抑制に対するRUNX1の作用の程度を検討した。RUNX1 アデノウイルス、RUNX1 - GFP ベクターを用いた強制発現系において、未分化間葉系細胞株C3H10T1/2細胞、軟骨細胞、ES細胞に感染させ、コントロール群と比較したところ、細胞増殖に大きな変化は与えなかった。

(3) RUNX1による軟骨細胞の肥大化抑制のメカニズム

軟骨細胞の3次元培養系において、RUNX1 アデノウイルスでRUNX1を強制発現したところ、肥大化マーカーである10型コラーゲンは発現抑制された。この肥大化を抑制する現象を確認するために、RUNX1-floxed マウスから軟骨細胞を採取し、Cre アデノウイルスを感染させRunx1をノックアウトさせたところ、3次元培養系において10型コラーゲンの発現は上昇することが確認された。Runx1は軟骨細胞の肥大抑制作用があることが示された。この肥大化抑制作用メカニズムは現在も解析中で、10型コラーゲンのプロモーター解析やRunx1のドメイン別にベクターを作成し、解析を行っている。

(4) RUNX1コンディショナルノックアウトマ

## ウスを用いた in vivo の解析

RUNX1 のホモノックアウトマウスは造血系の異常から胎生致死(胎生 10-12 日)である。この理由により、RUNX1 Flox マウスを研究協力先の東京医科歯科大学より譲渡してもらい、申請者の研究室に持ち合わせている Sox9-Cre マウスまたは、Col2-Cre マウスと掛け合わせ、Sox9-Runx1 ノックアウトマウス、Col2-Runx1 ノックアウトマウスを作出した。

Sox9-Runx1 ノックアウトマウスは同腹のコントロール群(Runx1Flox マウス)に比べ、胎生期より矮小型であり、成体期も性別差なく約 20%体重と体長が小さい。解析当初、軟骨内骨化の異常が仮説としてあげられたが、胎生期 1 日齢から生後 1 週齢まで骨格標本と組織切片を作成し、詳細に解析したところ、軟骨内骨化の遅れは見られなかった。おそらく、Runx1 より遅れて発現してくる Runx2 と Runx3 に作用を補償されていることが推察される。

Col2-Runx1 ノックアウトマウスでは軟骨初期分化における Runx1 の作用を検討すると、Sox9-Runx1 ノックアウトマウスに比べると体重と体長差は約 10% 程度である。そこで、マウス変形性膝関節症モデルマウスを作成したところ、体重差があるにも関わらず、明らかに軟骨の変性と骨棘の形成が起こることが判明した。Runx1 の軟骨の変性抑制作用は Runx2 と Runx3 に作用を補償されずに Runx1 が、関節軟骨の保護作用として働いていることが示唆された。

## (5) Runx1Laz Knockin マウスもしくは Runx1GFP Knockin マウスを用いた Runx1 の関節軟骨での発現解析

成長板の組織切片を用いた免疫組織染色法によって RUNX ファミリー (RUNX1,2,3) 全分子の蛋白の局在パターンを明らかにした。本研究では Runx1 について、軟骨発生期からの経時的な発現パターンの推移を、免疫組織学的解析を用いて行った。成長板の組織切片(胎生 12-18 日)を用いた切片で Runx1 の発現を追っていったところ、間葉系の凝集の時期以降で Runx1 は発現し、軟骨細胞が肥大化する直前の前肥大軟骨細胞まで発現していることがあきらかとなった。より、簡便に、Runx1 の発現をトラッキングする目的から海外の研究室より、Runx1Laz Knockin マウスもしくは Runx1GFP Knockin マウスの 2 種類のマウスを取り寄せ、gal 抗体、GFP 抗体で Runx1 の発現を再確認した。

(4) の解析で成体の関節組織で、軟骨の保護作用があることが示唆されたので、関節軟骨の発現をみると、正常軟骨層の表層で Runx1 は発現し、軟骨変性のすすんだ軟骨細胞では Runx1 は発現していないことが明らかとなった。

## (6) RUNX1 の標的分子の網羅的スクリーニング

未知なる RUNX1 の標的分子を検索するため、マイクロアレイの準備を行った。Runx1 の恒

常発現型アデノウイルスを作成し、Runx1 の発現が上昇したときに誘導される遺伝子群を探索する。また、前述の Runx1Flox マウスから軟骨細胞を採取し Cre アデノウイルスを感染させることによって、Runx1 の発現がノックアウトされたときに誘導される遺伝子群を探索する。現在、軟骨細胞における Runx1 の下流の遺伝子群の解析を行っている。

## 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 17 件)

1. Saito T, Yano F, Mori D, Ohba S, Hojo H, Otsu M, Eto K, Nakauchi H, Tanaka S, Chung UI, Kawaguchi H.: Generation of Col2a1-EGFP iPS cells for monitoring chondrogenic differentiation. PLoS One. 2013 Sep 16;8(9):e74137. doi: 10.1371/journal.pone.0074137. 査読有
2. Yano F, Hojo H, Ohba S, Saito T, Honnami M, Mochizuki M, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.: Cell-sheet technology combined with a thienoindazole derivative small compound TD-198946 for cartilage regeneration. Biomaterials. 2013 Jul;34(22):5581-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.008. 査読有
3. Komiyama Y, Ohba S, Shimohata N, Nakajima K, Hojo H, Yano F, Takato T, Docheva D, Shukunami C, Hiraki Y, Chung UI.: Tenomodulin expression in the periodontal ligament enhances cellular adhesion. PLoS One. 2013 Apr 10;8(4):e60203. doi: 10.1371/journal.pone.0060203. 査読有
4. Hojo H, Ohba S, Taniguchi K, Shirai M, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K,

- Mishina Y, Yamada M, Konno T, Takato T, Kawaguchi H, Kambara H, Chung UI.: Hedgehog-Gli activators direct osteo-chondrogenic function of bone morphogenetic protein toward osteogenesis in the perichondrium. *J Biol Chem.* 2013 Apr 5;288(14):9924-32. doi: 10.1074/jbc.M112.409342. 査読有
5. Yano F, Saito T, Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI, Kawaguchi H.: -Catenin regulates PTH/PTHrP receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to its intracellular C-terminal region. *Arthritis Rheum.* 2013 Feb;65(2):429-35. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201745. 査読有
  6. Yano F, Hojo H, Ohba S, Fukai A, Hosaka Y, Ikeda T, Saito T, Hirata M, Chikuda H, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. *Ann Rheum Dis.* 2013 May;72(5):748-53. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201745. 査読有
  7. Ogasawara T, Ohba S, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka T, Mori Y, Takato T, Hoshi K.: Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. *J Cell Physiol.* 2013 Jan;228(1):163-71. doi: 10.1002/jcp.24116. 査読有
  8. Echigo R, Shimohata N, Karatsu K, Yano F, Kayasuga-Kariya Y, Fujisawa A, Ohto T, Kita Y, Nakamura M, Suzuki S, Mochizuki M, Shimizu T, Chung UI, Sasaki N.: Trehalose treatment suppresses inflammation, oxidative stress, and vasospasm induced by experimental subarachnoid hemorrhage. 2012 Apr 30;10:80. doi: 10.1186/1479-5876-10-80. 査読有
  9. Hojo H, Ohba S, Yano F, Saito T, Ikeda T, Nakajima K, Komiyama Y, Nakagata N, Suzuki K, Takato T, Kawaguchi H, Chung UI.: Gli1 protein participates in Hedgehog-mediated specification of osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem.* 2012 May 18;287(21):17860-9. doi: 10.1074/jbc.M112.347716. 査読有
  10. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H.: C/EBP and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet.* 2012 Mar 1;21(5):1111-23. doi: 10.1093/hmg/ddr540. 査読有
  11. Hojo H, Ohba S, Yano F, Chung UI.: Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development. *J Bone Miner Metab.* 2010 Sep;28(5):489-502. doi: 10.1007/s00774-010-0199-7. 査読有
  12. Mori Y, Yano F, Shimohata N, Suzuki S, Chung UI, Takato T.: Trehalose inhibits oral dryness by protecting the cell membrane. *Int J Oral*

- Maxillofac Surg. 2010 Sep;39(9):916-21. doi: 10.1016/j.ijom.2010.04.047. 査読有
13. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H.: Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med.* 2010 Jun;16(6):678-86. doi: 10.1038/nm.2146. 査読有
14. Nakajima K, Komiyama Y, Hojo H, Ohba S, Yano F, Nishikawa N, Aburatani H, Takato T, Chung UI.: Enhancement of bone formation ex vivo and in vivo by a helioxanthin-derivative. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jul 2;397(3):631. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.041. 査読有
15. Hojo H, Yano F, Ohba S, Igawa K, Nakajima K, Komiyama Y, Kan A, Ikeda T, Yonezawa T, Woo JT, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI.: Identification of oxytetracycline as a chondrogenic compound using a cell-based screening system. *J Bone Miner Metab.* 2010 Nov;28(6):627-33. doi: 10.1007/s00774-010-0179-y. 査読有
16. Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa H, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Akt1 in chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiological and pathological conditions. *Arthritis Rheum* 2010 62(3):826-36. doi: 10.1002/art.27296. 査読有
17. Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita K, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung UI, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S.: Runx1 and Runx2 cooperate during sternal morphogenesis. *Development.* 2010 ;137(7):1159-67. doi: 10.1242/dev.045005. 査読有
- [学会発表](計 11 件)
1. 矢野文子, 北條宏徳, 大庭伸介, 深井厚, 保坂陽子, 池田敏之, 斎藤琢, 平田真, 筑田博隆, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: 新規OA治療候補化合物はRunx1をターゲットとしている. 第27回日本軟骨代謝学会 2014.2.28-3.1 京都府医師会館、京都(第19回日本軟骨代謝学会賞受賞口演)
2. 矢野文子, 保坂陽子, 斎藤琢, 北條宏徳, 大庭伸介, 高戸毅, 鄭雄一: 新規OA治療候補化合物はRunx1をターゲットとしている. FIRST 合同国際シンポジウム 2014.2.21 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京(査読なし、口頭・ポスター発表)
3. 矢野文子, 大庭伸介, 鄭雄一: 変形性関節症の新規治療候補薬の発見 東大病院先端医療開発フォーラム 2014.1.24 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京(査読なし、口頭・ポスター発表)
4. Fumiko Yano, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1 第13回東京大学生命科学シンポジウム 2013.6.8 東京大学 伊藤国際学術研究

- センター 伊藤謝恩ホール、東京(査読なし、口頭・ポスター発表)
5. 矢野文子, 大庭伸介, 鄭雄一: 変形性関節症の新規治療候補薬の発見 東大病院先端医療開発フォーラム 2013.1.25 東京大学 伊藤国際学術研究センター 伊藤謝恩ホール、東京(査読なし、口頭・ポスター発表)
  6. 矢野文子, 北條宏徳, 大庭伸介, 池田敏之, 斎藤琢, 本阿彌宗紀, 平田真, 筑田博隆, 望月学, 佐々木伸雄, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: 細胞シート工学を用いた新規軟骨再生誘導剤による膝関節軟骨再生法の開発 第11回日本再生医療学会総会 2012.6.12-14 パシフィコ横浜、神奈川 (若手研究奨励賞受賞者講演)
  7. 矢野文子, 北條宏徳, 大庭伸介, 池田敏之, 斎藤琢, 高戸毅, 川口浩, 鄭雄一: 新規低分子化合物チエノインダゾール誘導体は Runx1 と Sox trio を介して関節軟骨再生を誘導する. 第24回日本動物細胞工学会. 2011.7.22-23 東京大学本郷キャンパス 山上会館、東京 (査読有・ポスター発表)
  8. Fumiko Yano, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Tsuyoshi Takato, Ung-il Chung: A novel disease-modifying osteoarthritis drug candidate targeting Runx1. Frontiers 2013 EPFL Symposium. 2013, 6.21-22 (Swiss Federal Institute of Technology in Lausanne, Lausanne, Switzerland) (査読なし、ポスター発表)
  9. Fumiko Yano, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hiroshi Kawaguchi, Ung-il Chung. Prevention and Repair of

Cartilage Degeneration by A Novel Small Thienoindazole-Derivative Compound. 1<sup>st</sup> Joint Symposium 2012 Bridging Cancer Nanotechnology. 2012.8.13-14 (The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas) (査読なし、ポスター発表)

10. Fumiko Yano, Yoko Hosaka, Atsushi Fukai, Taku Saito, Hironori Hojo, Shinsuke Ohba, Hiroshi Kawaguchi, Ung-il Chung: Prevention and repair of cartilage degeneration by a novel thienoindazole-derivative compound. 2012 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2012. 4 (Barcelona, Spain). (査読有・ポスター発表)
11. Fumiko Yano, A Novel Thienoindazole-Derivative Small Compound Induces Chondrogenic Differentiation without Promoting Hypertrophy through Runx1. 7th Meeting of Bone Biology Forum 2010. 8 (Fuji Institute of Education and Training, Shizuoka) (招待講演)

〔図書〕(計 1件)

1. 矢野文子, 北條宏徳, 鄭雄一: 細胞シート工学を用いた新規軟骨再生誘導剤による関節軟骨再生法の開発. Clinical Calcium vol21. No.6, 2011, 75-82

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)  
取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

鄭雄一研究室

大庭・矢野・鄭グループ

<http://www.tetrapod.t.u-tokyo.ac.jp/med/>

6. 研究組織

(1)研究代表者 矢野文子 (YANO, Fumiko)  
東京大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号: 80529040