

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Runx2** による軟骨細胞肥大分化の転写制御機構に関する研究

指導教員 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 東川 晶郎

### 背景と目的

軟骨細胞の肥大分化は骨格の成長や修復にとって重要なだけでなく、永久軟骨とされる関節軟骨細胞が病的に肥大分化することが、変形性関節症 (OA) の発症にも関わっているという報告がされつつある。

我々は過去にマウス膝関節の不安定性により OA を誘発するモデルを作製した。このモデルにおいては、術後 2 週より関節表面軟骨に RUNX2 が発現、その後 COL10 を発現する肥大軟骨細胞が出現し、さらに蛋白分解酵素が発現して関節軟骨の変性が生じた。軟骨細胞肥大分化に関する重要な転写因子 RUNX2 に着目し、*Runx2* ヘテロノックアウトマウスに OA 誘発手術を施すと、同胞野生型マウスに比し、COL10 の発現、関節軟骨の変性が抑制された。これらのエビデンスからも RUNX2 と COL10 を結ぶシグナルが、生理的な骨格の成長のみならず、OA のような病的な状態においても重要な役割を担っていることが想像される。RUNX2 がマウスの *Col10* 遺伝子 (*Col10a1*) のプロモーター領域に結合してその転写活性を促すことは過去に報告されているが、ヒトの *COL10* 遺伝子 (*COL10A1*) のプロモーター領域に関する報告はない。*COL10* 遺伝子のプロモーター領域は種間での相同性が低く、その転写調節機構も種間で異なることが推察される。本研究ではまず、マウスのモデルにおける RUNX2 と COL10 の発現関与について確認し、次に、両者間のシグナルを骨格成長障害、骨折、OA といった病態に対する臨床応用を目指して、RUNX2 によるヒト *COL10A1* 遺伝子の転写調節機構について調べた。

### 結果

・軟骨内骨化における RUNX2 と COL10 の発現局在  
生直後マウスの四肢の軟骨と成体マウスの骨折仮骨での軟骨内骨化過程における RUNX2 と COL10 の発現パターンを調べたところ、Runx2 は軟骨・骨に

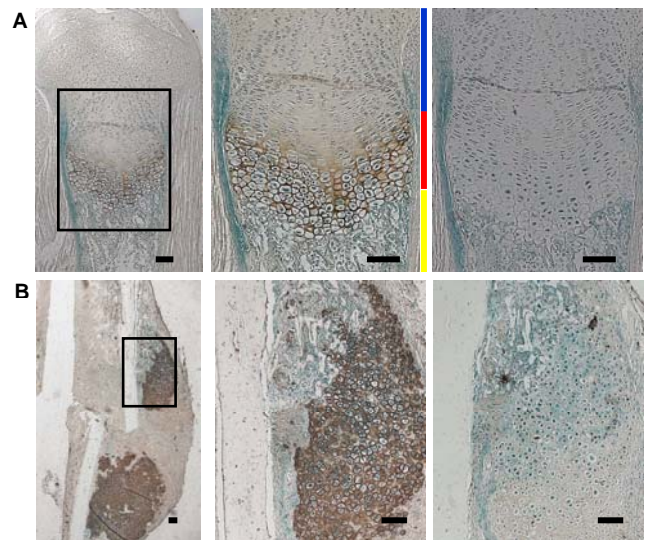


図 1. RUNX2 と COL10 の発現局在、*Runx2*<sup>+LacZ</sup> マウス

A. 生後 1 日マウス脛骨近位成長板

B. 8 週齢マウス大腿骨骨折術後 9 日

左、中央：X-Gal 染色+COL10 免疫染色

右：コントロール抗体、Scale bars, 100 μm.

広く発現していたが、特に肥大軟骨細胞における発現が強くみられた。また Runx2 の発現は、免疫染色で確認される COL10 の発現領域と、共局在していた (図 1)。

・ATDC5 細胞の肥大分化における COL10 発現に対する RUNX2 の機能的役割

軟骨内骨化における RUNX2 の機能を調べるため、マウス軟骨系 ATDC5 細胞への RUNX2 の効果を調べた。ATDC5 細胞は ITS (insulin, transferrin, sodium selenite) と無機リンによる刺激を加えて肥大分化を再現する系を用いた。過剰発現系の解析として、ATDC5 に RUNX2 を導入すると、COL10 の mRNA が上昇し、後期分化の指標となる Alizarin Red と von Kossa の染色性が増加した (図 2A)。発現抑制系としては、ATDC5 細胞にドミナントネガティブ型 RUNX2 を導入したところ、COL10 の mRNA が減少し、上記の染色性がともに低下し、肥大分化が抑制されることが示された (図 2B)。

・RUNX2によるヒト COL10A1 プロモーターの転写活性

ヒトにおける RUNX2 による COL10 誘導のメカニズムを知るために、ヒト COL10A1 遺伝子のプロモーター活性をヒトの細胞 (HeLa, HuH-7, OUMS27) を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイで解析した。4.5 kb の COL10A1 プロモーター領域を含むルシフェラーゼレポーターベクターを RUNX2 と共導入することで、レポーター活性は著明に上昇し、この傾向はコファクター CBFb を共導入することでより顕著にみられ、これは細胞種によらず共通した結果であった (図 3)。次に 5 末端から順次配列を短くすると RUNX2 による活性化は、-81 から -76 の間で減弱した (図 3)。そこで -399/+39 のレポーターベクターで、この領域内に変異を加えたものを 3 種類 (m1: -80, m2: -77, m3: -80 と -77) 作製した (図 4A)。すると RUNX2 単独あるいは RUNX2 と CBFb 両者による転写活性の上昇は m2 と m3 で抑制され、-77 が RUNX2 による COL10A1 の転写活性に重要であることが示唆された。さらに -81 から 1~15 bp を欠失させると、-77 を欠失させたベクターでは RUNX2 による転写活性が抑制された (図 4A)。そこでこの領域を含む 30 塩基の配列 (-89/-60) を HY box (hypertrophy box) と名付け、この配列 (WT) と -77 に変異を加えた (m2) 配列をそれぞれタンデムに繰り返したレポーターベクターを作成すると、WT のベクターはコピー数依存的に RUNX2 による転写活性が上昇したが、m2 ベクターは活性の変化がなかった (図 4B)。

・ヒト COL10A1 プロモーター内の HY box に対する RUNX2 の特異的結合

in vitro における HY box と RUNX2 の結合を確認するため、COS7 細胞に RUNX2 と CBFb 両者を強制発現させた核抽出物を用いて electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を行ったところ、HY box オリゴヌクレオチドプローブとの結合バンドが確認された。このバンドは RUNX2 の抗体でスーパーシフトした。変異体プローブを用いた実験や非標識プローブを用いた競合実験などからも RUNX2 蛋白と HY box 内の R RUNX2 結合モチーフとの in vitro での結合が確認された。

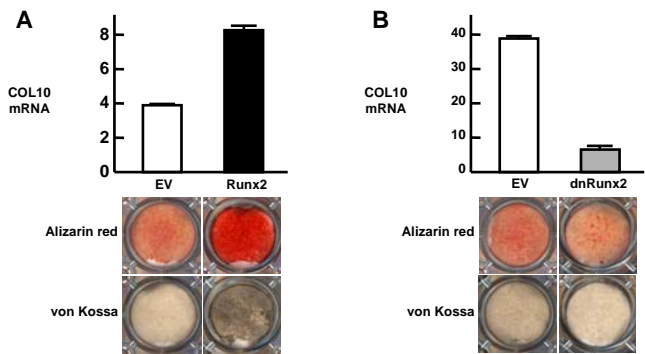


図 2, マウス軟骨系 ATDC5 細胞における COL10 の発現と軟骨後期分化に対する RUNX2 の強制発現と発現抑制の効果

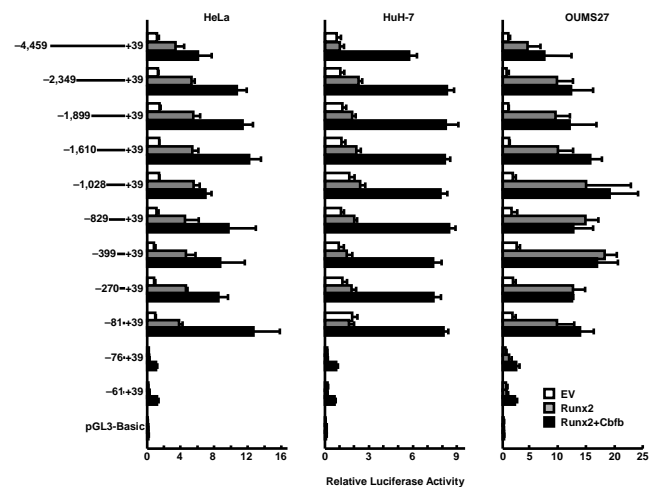


図 3. RUNX2 によるヒト COL10A1 プロモーター活性 (ルシフェラーゼレポーターアッセイ)

Deletion 解析によりすべての細胞において RUNX2 に対する応答領域を同定した。

次にin vivoにおけるHY boxに対するRUNX2タンパクの結合を確認するため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを行った。HuH-7細胞にコントロールベクター、RUNX2+CBFBをトランスフェクションしてIPを行った。HY boxを挟むように-113から+119の範囲でPCRをかけて検出したところ、RUNX2+CBFBでのみPCR産物が確認された。これらの結果はin vivoでもRUNX2タンパクがHY boxに結合することを示唆している。

・ヒトCOL10A1プロモーター領域内の他のRUNX2結合モチーフに関する研究

次に、4.5 kbのヒトCOL10A1プロモーター領域内においてRUNX2結合モチーフを検索したところ、6箇所の領域が存在した。このうちマウスのCol10a1プロモーター内でRUNX2との結合が報告されている配列でヒトCOL10A1プロモーターの配列に相同する

-1,839/-1,834と、6箇所のうち最も転写開始点近傍である-357/-352について解析した。HY boxの解析と同様に、これらの配列を含む30塩基の配列(それぞれA box、B box)をタンデムに重ねたルシフェラーゼレポーターベクターを作成したが、HY boxのようなコピー数依存性のRUNX2に対する反応はなかった。しかしEMSAでは、A boxとB boxはHY boxと同様に、RUNX2とのin vitroの結合が確認された。ところが、ChIPアッセイでは、RUNX2との結合がHY boxを含む配列で見られるのに対して、A boxとB boxを含む配列では確認できなかった。

## 考察

本研究にてヒトCOL10A1プロモーターの活性がRUNX2により上昇し、その効果はco-activatorであるCBFBの共導入でより顕著であること、さらにプロモーター上にHY boxなる重要な応答領域が存在することが示された。ヒトのCOL10A1プロモーター内でのRUNX2に対する応答領域の同定は本研究が最初であるが、マウスのCol10a1プロモーターに関してはHY boxよりはるか上流にRUNX2の応答領域がすでに報告されている。しかし、マウスでの応答領域に相当するヒトCOL10A1プロモーター上の領域(A box)はレポーターアッセイにほとんど反応せず、in vivoでのRUNX2との結合は見られなかった。この結果はヒトとマウスで、COL10の転写調節機構が異なることを示唆するものであった。HY boxはヒトの細胞におけるヒトCOL10A1遺伝子プロモーター内の重要なRUNX2に対する応答領域である。RUNX2によるレポーター活性は-81から-76の間で大きく減少したが、RUNX2を含まない基本活性も減少した。また、site-directed mutagenesis (図4A) やHY boxのタンデムリピート実験 (図4b) では、RUNX2を導入しなくてもある程度活性が変化した。これらの結果はHY boxがRUNX2以外の様々な転写因子に反応する、ヒトCOL10A1プロモーターのユニバーサルなエンハンサーとして機能している可能性を示唆するものであり、HY boxがCOL10A1の転写活性と軟骨細胞の肥大分化に関わる転写因子やコファクターをスクリーニングするツールとして有用であることが期待される。

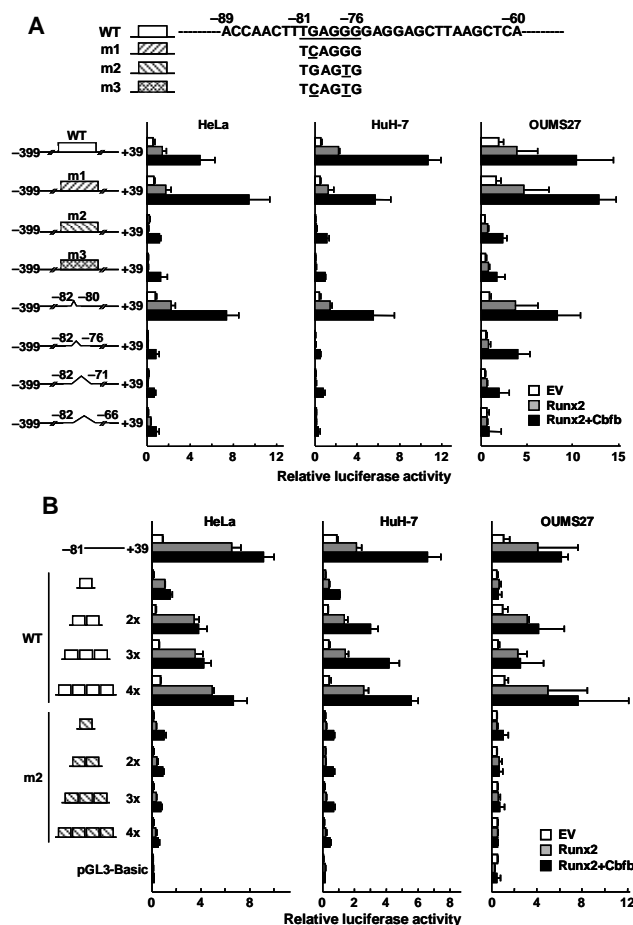


図4. COL10A1プロモーター内の応答領域HY boxに関するルシフェラーゼアッセイ

A. site-directed mutagenesis and deletion

B. dose-response analysis of the tandem repeats