

審査の結果の要旨

氏名 東川 晶郎

本研究は、骨格の成長や修復だけでなく変形性関節症の発症にも関わっているとされる軟骨細胞の肥大分化に重要な役割を演じていると考えられる転写因子 RUNX2 に着目し、RUNX2 による軟骨細胞肥大分化の転写制御機構を明らかにすることを目的とした。このために、肥大軟骨細胞のマーカー遺伝子とされる 10 型コラーゲン(COL10)と RUNX2 の *in vivo* での発現局在を調べ、RUNX2 の肥大分化に対する機能を *in vitro* で解析し、さらにヒト *COL10A1* 遺伝子のプロモーター領域を用いた解析を試み、下記の結果を得ている。

1. *Runx2* を欠失した allele に *LacZ* 遺伝子を組み込むことで、X-gal 染色を行うことにより RUNX2 の局在を知ることができる *Runx2^{+/LacZ}* マウスにおいて、出生直後の脛骨成長板と成体マウス大腿骨骨折モデルで形成された仮骨を観察した。この検体に X-gal 染色と COL10 の免疫染色を同時に行ったところ、生直後脛骨成長板と成体大腿骨骨折仮骨のいずれとも、RUNX2 は軟骨および骨に広く発現していたが、特に COL10 の免疫染色で染まる領域すなわち肥大軟骨細胞に強く発現していた。これは過去に報告した変形性関節症誘発モデルにおけるパターンと一致しており、軟骨内骨化の過程において RUNX2 と COL10 の間に分子間相互作用が存在することを示唆する結果であった。
2. 軟骨内骨化における RUNX2 の機能を *in vitro* で解析するために、マウス軟骨細胞系細胞株 ATDC5 に RUNX2 を安定導入したものと、そのドミナントネガティブ型 (RUNX2-DN) を安定導入して機能を抑制したものをそれぞれ ITS サプリメントや無機リンを用いて分化を誘導する条件下に培養したところ、RUNX2 導入した強制発現系においては、空ベクターを導入したコントロール細胞に対して COL10 の mRNA レベルが有意に上昇し、また Alizarin red や von Kossa の染色性が増して後期肥大分化が促進されていた。一方、RUNX2-DN を導入した発現抑制系においては、コントロールに対して COL10 の mRNA レベル、Alizarin red、von Kossa の染色性がいずれも減少し、後期分化が抑制されることが示された。これらの結果より、RUNX2 は COL10 の発現や後期肥大分化に促進的に働く重要な因子であることが示された。
3. ヒト *COL10A1* 遺伝子のプロモーター領域を用いて、その転写調節機構を解析したところ、ヒト *COL10A1* プロモーターの転写活性は RUNX2 によって上昇し、その作用はコファクターである CBFβ と組み合わせることにより増強されることを示した。さらに、deletion 解析や site-directed mutagenesis により、HeLa、HuH-7、OUMS27 などのヒトの細胞において重要でかつ特異的な応答領域として転写開始点より上流 80 bp

付近に HY box を同定した。この領域は過去にマウスのプロモーター領域で報告されている RUNX2 に対する応答領域とは異なる新たに同定した領域であり、ヒトとマウス間で比較的相同性の高い領域内に存在する。RUNX と HY box の結合は、EMSA、ChIP assay により確認した。また、RUNX2 による COL10 の転写活性に関するメカニズムはヒトとマウスで異なり、RUNX2 はヒトの細胞に存在する特異的な微小環境において HY box と結合して活性化することが示唆された。さらに、HY box はヒトの細胞において、RUNX2 だけでなく様々な転写刺激にも反応するユニバーサルエンハンサーとして機能する可能性を秘めており、軟骨細胞肥大化に関わる転写因子やコファクターを包括的にスクリーニングするためのツールとして利用でき、軟骨再生医療の発展へとつながる可能性があることが示唆された。

以上、本論文はヒト *COL10A1* 遺伝子のプロモーター領域を用いた解析から、転写開始点より上流 80 bp 付近に RUNX2 の応答領域 HY box を同定した。また、この領域は RUNX2 以外の様々な因子にも反応するユニバーサルエンハンサーとして機能する可能性を秘めていた。本研究はヒト *COL10A1* 遺伝子において RUNX2 の応答領域を同定した初めての研究であり、この領域を軟骨細胞肥大化に関わる因子スクリーニングのためのツールとして利用することで軟骨再生医療の発展へとつながる可能性があることから、学位の授与に値するものと考えられる。