

論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 *Runx2* の近位プロモーター誘導型アイソフォームの骨形成への影響の解析

氏 名 大倉 英明

概要

転写因子 *Runx2* は骨形成のマスターレギュレーターであり、骨芽細胞分化並びに軟骨細胞の成熟に関わることが知られている。*Runx2* を完全に欠損するマウスは完全な骨化不全の表現型を示し、ヘテロ接合型でも穏やかな骨形成不全を呈する。ヘテロの表現型はヒトにおける頭蓋鎖骨異形成症 (Celidocranial Dysplasia; CCD) の病態と類似しており、事実、CCD の患者の多くは *Runx2* 遺伝子の翻訳領域に変異を有していることが分かっている。この *Runx2* には二つのスプライシングバリエーションが存在する。遠位プロモーター (P1) に制御される *P1Runx2* と近位プロモーター (P2) に制御される *P2Runx2* であり、それぞれ異なるスプライシングの結果 *Runx2-II*、*Runx2-I* という N 末端のアミノ酸配列の異なるタンパク質を生成する。この両者の間に機能的な差異があるか否かについて解析するため、これまで多くの試みが行われてきているが、現在に至るまで議論は明確な決着を見ていない。その理由の一つに、これまで両 *Runx2* アイソフォームと *P1Runx2* の改変マウスが作製されながらも、*P2Runx2* をターゲットにした遺伝子改変マウスが存在しなかったことが挙げられる。*P1Runx2* と *P2Runx2* の翻訳領域の大部分は共通の配列にコードされており、P2 が P1 と異なるのは N 末端側のわずか 5 アミノ酸に過ぎない。さらに P2 の翻訳領域の内部に P1 のスプライスアクセプターが存在し、以後が両者の共通配列となるため、P2 の転写・翻訳を特異的に阻害することは困難な課題であった。

本研究では、まず P2 アイソフォームを特異的に欠失したマウスの作製を試みた。作製したマウスは *Runx2* 欠損マウスと同様に、新生仔期での致死性を示した。胎仔マウス頭蓋細胞の遺伝子発現解析、ならびに骨形成の形態的観測から骨芽細胞の分化不全と骨形成の著しい遅れが明らかになった。さらに *in vitro* での骨芽細胞誘導実験の結果、*P2Runx2* 発現不全マウスの未分化間葉系細胞は骨芽細胞分化能が有意に減少していることが明らかになった。以上の結果とこれまでの報告を合わせると、*Runx2* の機能を制御する上で P2 アイソフォームが P1 に比べてより支配的である可能性が示唆された。

方法と結果

【マウスの作製】

P2Runx2 を特異的に欠損するマウスの作製にあたっては、既に骨形成への関与の報告がなされている *P1Runx2* の発現への影響を極力減らすため、改変を最小限にとどめた。すなわち、*P2Runx2* の翻訳開始コドンである ATG を終止コドンである TGA に変異させた。ゲノムをクローニング後、点変異を導入して構築したのが (図 1) に示すターゲティングベクターである。このベクターをマウス胚性幹細胞クローン E14-1 に電気穿孔法によって導入、相同組み換えを起こしたクローンを得た。さらにこの ES 細胞を C57B/6J マウスの胚盤胞に導入してキメラマウスを得た。このマウス

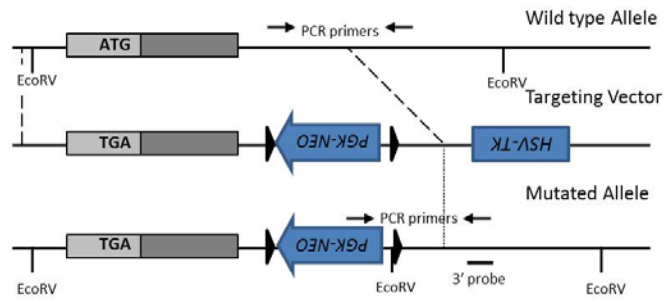


図1 ベクター構築図

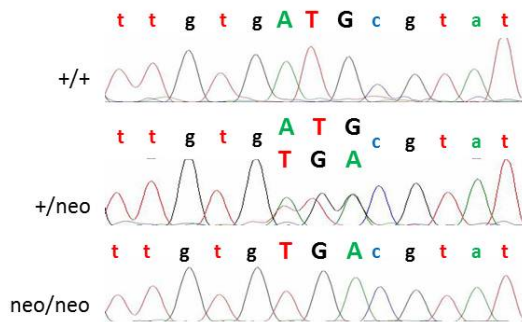


図2 点変異部のシーケンス解析

スを掛け合わせることで、ヘテロ遺伝子型のマウスを得ることができたが、マウスの掛け合わせを続けてもホモ遺伝子型マウスを得る事は出来なかった(野生型 44 匹、ヘテロ 68 匹、ホモ 0 匹)。過去に作製された *Runx2* 欠損マウスの多くが新生仔期に致死性を示すことが報告されていたため、出生直後に死亡していた個体の遺伝子型を調べたところホモ遺伝子型であった。これらのマウスに関して、ターゲティングベクターの相同組み換えを PCR 法、サザンブロット法、また *P2Runx2* の翻訳開始コドンに導入した点変異のシーケンス (図 2) により確かめた。これらの結果より、作製したマウスがホモ遺伝子型では新生仔期に致死であることがわかった。

【遺伝子発現解析】

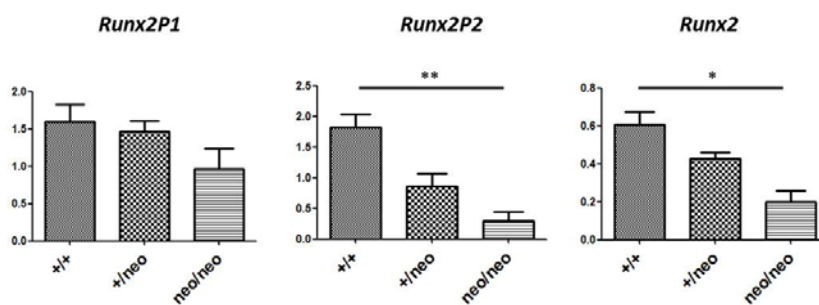


図3 Runx2の発現パターン

次にホモ遺伝子型マウスの遺伝子発現プロファイルを解析するため、妊娠 18.5 日目のマウスを解剖して胎仔を取り、その頭蓋骨を酵素処理することによって未分化間葉系前駆細胞、軟骨細胞、骨芽細胞などを含む頭蓋細胞画分を精製した。この頭蓋細胞画分から RNA を回収し、Oligo dT プライマーを用いて逆転写した後、定量的 PCR に供した。*Runx2* の各アイソフォームの発現量を定量したところ、*P1Runx2* には変化がなかった一方で *P2Runx2* の発現量は有意に減少しており、作

製したマウスが意図したとおりに *P2Runx2* 特異的発現減少を示すことが確認された。さらに両アイソフォームを区別しない *Runx2* の総量も有意に減少していた (図 3)。

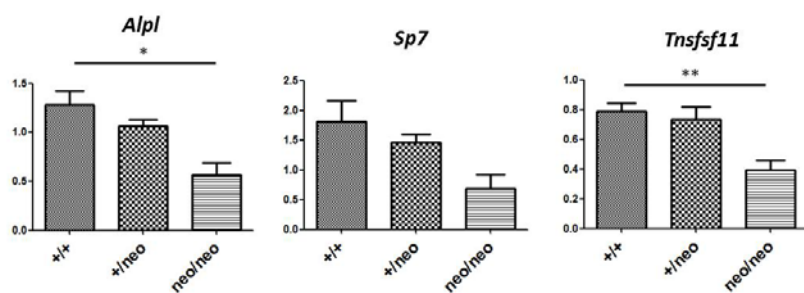


図4 骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現の現象

次にマウスの死亡原因として骨形成不全が疑われたため、骨芽細胞分化のマーカー遺伝子の定量を行った。この結果、一部の骨芽細胞分化マーカー遺伝子 (*Alpl*, *Tnfsf11*) の発現に有意な減少が見られ (図 4)、ホモ遺

伝子型マウスでは骨芽細胞分化不全に伴う骨形成異常が起きている可能性が示唆された。

【骨形成の確認】

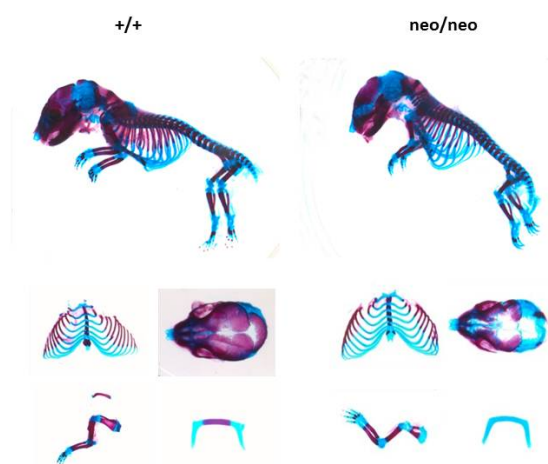


図5 全身骨格標本の染色像

次に遺伝子発現解析で得られた結果を踏まえて、その表現型として骨形成が遅れていることを確認するため、胎仔マウスの全身骨格標本作製した。軟骨を青く染める Alucian Blue と硬骨を赤く染める Alizarin Red で染色したところ、ホモ遺伝子型マウスでは野生型に比べ著明な骨形成の遅れを観察した (図 5)。これらの表現型は、過去の *Runx2* 欠損マウスの表現型と同様の傾向を示しており、*P2Runx2* の発現量減少が骨形成不全を招いたことを示唆する結果である。さらに、これらの知見を定量的に評

価するため μ CT 解析を行い組織当たりの骨量、骨梁形成パラメータを定量した。大腿骨を計測した結果、骨量や骨梁数の有意な減少の一方で骨梁間隔はホモ遺伝子型では野生型に比べて有意に上昇しており、いずれもホモ遺伝子型マウスの骨形成の遅れを示していた (図 6)。興味深いことに、骨芽細胞マーカー遺伝子発現や骨格標本上では野生型とホモ遺伝子型の間での表現型を示していたヘテロ遺伝子型マウスが、定量的形態計測においては全ての項目で野生型との差を示さなかった。この理由として、*Runx2* のアイソフォームが関わる骨形成の部位特異性、もしくは骨形成における *Runx2* 発現必要量の部位間での閾値の相違の存在が想定される。

【*in vitro* 骨芽細胞分化】

さらに観察された骨形成の遅れが、実際に骨芽細胞分化不全に起因する

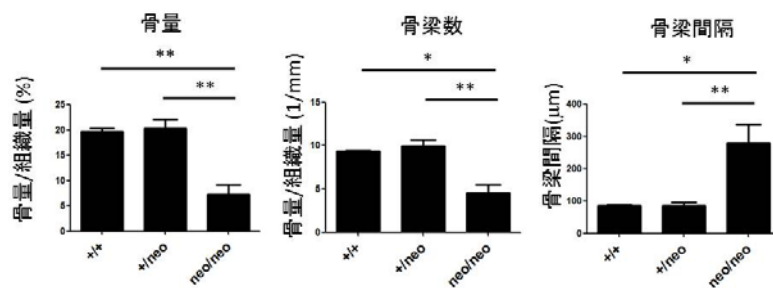


図6 骨形態パラメータ

ものかどうかを調べるため、胎生 18.5 日目の胎仔頭蓋細胞を酵素処理して得られた細胞群を骨芽細胞分化培地で 2 週間培養し、Alizarin Red で染色することにより bone nodule の形成を確認、またその個数を計数した。ホモ遺伝子型では野生型に比べて bone nodule の形成数が減少していた (図 7)。(検体の

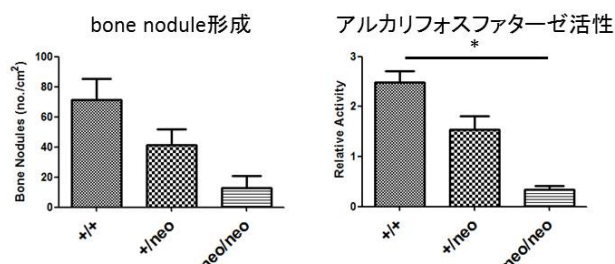


図7 in vitro骨芽細胞分化アッセイ

入手可能数が安定しないため、有意差検定は行えていない。) また、同時に細胞を溶解して、骨芽細胞分化マーカーの一つであるアルカリフォスファターゼの活性測定を行ったが、このアッセイにおいても bone nodule 形成と同様にホモ遺伝子型において野生型に比べて有意な活性の低下が見られた (図 7)。これらの結果より、ホモ遺伝子型マウスにおいては骨芽細胞分化能が野生型に比べて不全に陥っており、ホモ遺伝子型マウスで見られた骨形成不全の表現型が骨芽細胞分化異常の結果であることが強く示唆された。

結論・考察・今後の展開

Runx ファミリー転写因子にはそれぞれ P1、P2 のアイソフォームが存在しており、特に *Runx2* においては P1 の発現が骨組織に厳しく制限される一方、P2 は全身の様々な組織から検出可能で、両者の異なる転写制御が予想される。しかしながらこれまで進められてきた解析の大部分は P1 に焦点を当てていた。その理由としては、翻訳領域の内部にスプライスアクセプターを持つ P2 をターゲットにしたマウスモデルの作製困難さが想定される。そこで今回私は、P2 のみを特異的に欠損するマウスの作製を行った。作製したマウスでは計画した通りに P2 特異的な *Runx2* 欠損が見られ、さらにこのマウスがホモ遺伝子型では骨形成不全で新生仔期致死であることが明らかとなった。これはこれまでに報告されている P1 欠損マウスが、系統にもよるが致死性を回避していることと顕著な対比となっており、骨形成において *P2Runx2* がより優位に機能している可能性を提示する結果と言える。

本研究の今後の進展としては、*P2Runx2* の発現異常に関する病態の解明への応用が期待される。なぜなら、これまで *Runx2* 翻訳領域に変異を持たない CCD の患者が存在することが報告されており、プロモーター部位に変異が生じていることが予想されてきたからである。しかし、研究の進んでいる P1 のプロモーター解析からは *Runx2* 発現を有意に低下させるような変異を発見できていない。P2 が P1 に対して優位に働く可能性を視野に入れるのであれば、無視されてきた P2 プロモーターへの点変異の有無を検索することで、骨形成不全を引き起こす非翻訳領域の変異の同定が行われていることが強く推察される。私はこれまでにマウスとヒトの間で *P2Runx2* 転写開始点上流のゲノム配列の相同性を比較することにより、3 つ主要な非翻訳保存領域を発見している。これら配列を用いて、進化的に保存された転写制御が行われていることが予想される。そこでこの知見をさらに拡大し、P2 プロモーターの制御部位の正確な特定、結合する転写因子の同定等、P2 の発現制御に関する知見を早急に蓄える必要がある。