

Runx2 遺伝子の転写制御機構の解明と、骨粗鬆症・変形性 関節症治療薬の開発

Elucidation of the transcriptional regulation of Runx2
and development of the drugs for osteoporosis and
osteoarthritis

課題番号：26221310

小守 壽文 (KOMORI TOSHIHISA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授



研究の概要

Runx2 は骨芽細胞分化・軟骨細胞後期分化に必須な転写因子である。また、変形性関節症の原因遺伝子である。Runx2 の発現制御機構を明らかにし、骨粗鬆症、変形性関節症の治療薬を開発することを目的とした。骨芽細胞特異的 Runx2 エンハンサーを用いて骨形成促進化合物を同定した。軟骨細胞特異的エンハンサーも同定し、変形性関節症の治療薬開発が可能になった。

研究分野：生物系、医歯薬学、歯学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

1. 研究開始当初の背景

これまでに、Runx2 が間葉系幹細胞より骨芽細胞分化に必須であること、Runx2 が軟骨細胞の後期分化に必須であること、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軟骨基質を破壊する酵素を誘導する働きがあり、関節軟骨細胞の破壊によって発症する変形性関節症の原因遺伝子の一つであることを明らかにした。したがって、Runx2 は骨に対しては正の作用、関節軟骨に対しては負の作用を持つ。

2. 研究の目的

Runx2 が骨芽細胞と軟骨細胞に発現する制御機構を明らかにし、Runx2 発現を骨芽細胞・軟骨細胞で調節する化合物をスクリーニング、骨粗鬆症や変形性関節症の治療薬を開発する。具体的には、Runx2 の骨芽細胞及び軟骨細胞特異的転写制御領域（エンハンサー）を同定し、その活性化機構及び生理的役割を解明する。さらに、これらのエンハンサーを用いて化合物スクリーニングを行い、骨形成促進化合物、変形性関節症の進行を抑える化合物を同定する。

3. 研究の方法

候補エンハンサーの制御下で GFP (green fluorescence protein) を発現するトランスジェニック(tg)マウスを作製、GFP 発現パターンを調べた。レポーターアッセイで、転写活性化能を評価した。生理的役割は、それぞれの領域を欠失させた(ko)マウスを作製・評価した。同定したエンハンサーを用い、化合物のハイスループットスクリーニングを行った。さらに、化合物の Runx2 mRNA の発現、分化誘導（抑制）効果を検討した。

4. これまでの成果

I. 軟骨細胞特異的エンハンサー領域の特定及び機能解析

Runx2 遺伝子ゲノム領域の BAC クローンの欠失実験より、軟骨細胞特異的エンハンサーを含む 1 領域を同定した。さらに、ChIP sequence の結果及び既存のデータベース検索より、エンハンサー候補領域群を選定、それらを様々に組み合わせた GFP tg マウスを作製するとともに、Runx2 の 2 つのプロモーター領域と組み合わせた GFP tg マウスも作製した。これらのマウスにおける GFP 発現を解析することにより、軟骨細胞特異的な発現に関与する領域の組み合わせを特定した。これらの領域は相乗的に軟骨細胞株でレポーター活性を上昇させた。一方、骨芽細胞株ではレポーター活性を上昇させなかった。すなわち、これらの領域は、軟骨細胞特異的エンハンサーであることを明らかにした。これにより、軟骨細胞発現に関わる領域を用いたレポーターアッセイで、化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングが可能となり、変形性関節症治療薬の開発が格段に進展した。

II. 骨芽細胞特異的エンハンサーを用いた化合物スクリーニング

433 bp 骨芽細胞特異的エンハンサーを 4 つタンデムに並べたルシフェラーゼベクター (pGL4.23-4x343) の安定発現細胞株を用い、6 万化合物のハイスループットスクリーニングを行った。3SD 以上の活性を示した化合物を促進化合物、コントロールの 0.3 以下の活性を示したものを抑制化合物とした。一次スクリーニングで促進したのは 1081 化合物、抑制したのは 830 化合物である。2 次スクリーニングでは、濃度依存性及び細胞毒性を、3 次スクリーニングでは、デュアルルシフェラーゼアッセイを行い、化合物のベクターの

バックボーンへの影響を排除した。これにより促進 18 化合物、抑制 20 化合物に絞り込んだ。4 次スクリーニングとして、Runx2 mRNA の誘導（抑制）活性を調べ、促進 2 化合物、抑制 2 化合物に絞り込んだ。初期培養骨芽細胞分化を 1 化合物が促進、1 化合物が抑制した。促進した 1 化合物の周辺化合物の探索を行い、より活性の高い 3 化合物を得た。Runx2 mRNA を上昇させ、骨芽細胞分化誘導能を持つ非常に有望な化合物を得ることができた。その周辺化合物にも活性の高いものが多く、生体での薬効評価も期待できる。さらに、Runx2 mRNA を著明に低下させ、骨芽細胞分化を抑制した化合物の作用機序を解明し、その分子標的が明らかにできれば、Runx2 mRNA を上昇させ、骨芽細胞分化誘導能を持つ新たな化合物を見出すことも可能になる。また、この抑制化合物は、骨代謝研究に非常に有用なツールとなる。Runx2 は乳癌の増殖・骨転移、前立腺癌の骨転移に関与しており、抗癌剤としての活用も期待できる。

III. Runx2 の機能解析

1. Cbfb が軟骨細胞の増殖及び後期分化ならびに骨芽細胞分化に必要であること、Runx ファミリー(Runx1、Runx2、Runx3)の蛋白の安定化に必要であること、Cbfb は膜性骨より軟骨内骨化部位でより Runx2 の蛋白安定化に寄与することを Cbfb コンディショナル ko マウスの解析により明らかにした (6)。

2. Cbfb の alternative splicing によって形成される Cbfb1、Cbfb2 の ko マウスを解析した。骨形成、軟骨細胞・骨芽細胞分化は、Cbfb2 ko マウスでのみ阻害されていた。野生型マウスでは、Cbfb1 の splicing は厳密な調節により量的に制限されており、Cbfb2 は各種臓器において Cbfb1 の 3 倍の発現が認められた。しかし、Runx2 の DNA 結合能を増強する能力は Cbfb1 の方が強く、2 つのアイソフォームの量的・質的違いが、Runx2 の生理活性を制御していた (2)。上記 1、2 で Runx2 の活性制御機構を明らかにした。

3. Runx2 は、Bcl2 の発現を誘導しアポトーシスにも関与するが、BclXL を骨芽細胞に過剰発現させアポトーシスを抑制することにより、正常構造の骨を増加、強度も増強させ、加齢による骨量減少を防止できることを明らかにした (3)。

4. microtubule 関連蛋白 Mapt は最終分化した象牙芽細胞に特異的に発現、その特徴的な形態の形成に関与する可能性を示唆するとともに、Runx2 は Mapt を負に制御し、象牙芽細胞の成熟を抑制することを示唆した (5)。

5. Runx2 は、ムチン型糖鎖付加酵素である Galnt3 を発現誘導すること、Galnt3 は軟骨細胞の成熟に関与しムチン型糖鎖とグリコサミノグリカンの量的な調節に関わっていることを明らかにした (8)。

5. 今後の計画

I. 発現 cDNA ライブラリーのスクリーニング、エンハンサー塩基配列のモチーフ検索、エンハンサーのレポーターアッセイ、ChIP 解析等により、転写因子・共役因子複合体の構成分子を決定し、軟骨細胞特異的エンハンサーの活性化機構を解明する。

II. 軟骨細胞特異的エンハンサーを用いた化合物ライブラリーのハイスループットスク

リーニングによりエンハンサー活性化（抑制）化合物を選定する。さらに Runx2 mRNA レベル及び軟骨細胞分化を調べ、促進・抑制する化合物を選定し、関節症実験モデルに投与、効果を判定する。

III. 骨芽細胞分化促進効果のあった化合物の骨形成促進能を、頭蓋冠の器官培養及びマウスへの全身投与で評価する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Komori T: Glucocorticoid signaling and bone biology. *Horm Metab Res* 48(11): 755-763, 2016.

2. Jiang Q, Qin X, Kawane T, Komori H, Matsuo Y, Taniuchi I, Ito K, Izumi S, Komori T: Cbfb2 isoform dominates more potent Cbfb1 and is required for skeletal development. *J Bone Miner Res* 31(7):1391-404, 2016.

3. Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, Furuichi T, Ito M, Komori T: Overexpression of BCLXL in osteoblasts inhibits osteoblast apoptosis and increases bone volume and strength. *J Bone Miner Res* 31(7):1366-80, 2016.

4. Komori T: Cell death in chondrocytes, osteoblasts, and osteocytes. *Int J Mol Sci* 2016 17(12): E2045.

5. Miyazaki T, Baba TT, Mori M, Moriishi T, Komori T: Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed in terminally differentiated odontoblasts and severely downregulated in morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice. *Cell Tissue Res* 361(2):457-66, 2015.

6. Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Taniuchi I, Ito K, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori T: Cbfb regulates bone development by stabilizing Runx family proteins. *J Bone Miner Res* 30(4):706-14, 2015.

7. Komori T: Animal models for osteoporosis. *Eur J Pharmacol* 759:287-94, 2015.

8. Yoshida CA, Kawane T, Moriishi T, Purushothaman A, Miyazaki T, Komori H, Mori M, Qin X, Hashimoto A, Sugahara K, Yamana K, Takada K, Komori T: Overexpression of Galnt3 in chondrocytes resulted in dwarfism due to the increase of mucin-type O-glycans and reduction of glycosaminoglycans. *J. Biol Chem* 289(38): 26584-26596, 2014.

ホームページ等

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