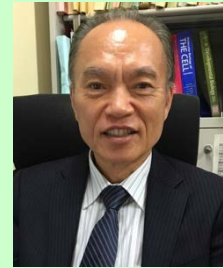


**軟骨細胞特異的 Runx2 エンハンサー制御機構の解明と
変形性関節症治療薬の開発**
Elucidation of the mechanism in the regulation of
chondrocyte-specific Runx2 enhancer and development
of the drug for osteoarthritis

課題番号：18H05283

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（4行以内）

Runx2 は骨芽細胞、軟骨細胞分化に必須な転写因子である。Runx2 の骨芽細胞での発現低下は骨粗鬆症を、軟骨細胞での発現亢進は変形性関節症を引き起こす。これらの細胞系列での Runx2 発現を規定するエンハンサーを同定し、その活性化機構を解明している。また、骨芽細胞前駆細胞の増殖・分化およびアパタイト結晶の方向性を規定する分子機構を明らかにした。

研究分野：骨・軟骨代謝学

キーワード：Runx2、軟骨細胞、骨芽細胞、変形性関節症、骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

我々は Runx2 を中心とした骨と軟骨の形成・維持の分子機構の全容解明とその臨床応用を進めている。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（成熟）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 matrix metalloproteinase 13 (MMP13)等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（図1）。したがって、Runx2 は成人におい

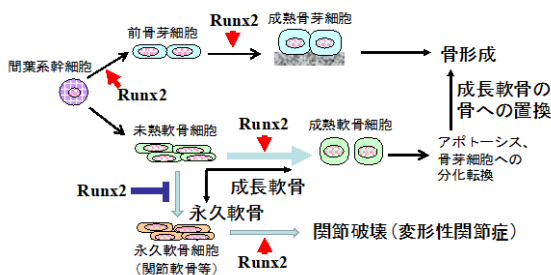


図1

これまでに明らかにした Runx2 の機能
Runx2 は、間葉系幹細胞を前骨芽細胞、さらに成熟骨芽細胞へと分化させる。また、軟骨細胞の後期分化（成熟）に必須である。Runx2 の発現抑制により永久軟骨細胞に、発現誘導により成長軟骨細胞（後に骨に置換）になる。永久軟骨細胞での Runx2 発現は、関節軟骨を破壊し変形性関節症を引き起こす。

て、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。Runx2 の骨芽細胞、軟骨細胞における機能およびその発現調節機構の解明は、骨格形成・維持の分子機構の解明に画期的な進歩をもたらすと同時に、Runx2 発現を骨芽細胞・軟骨細胞で個別に調節できれば、骨芽細胞での発現誘導により骨形成を増加させる骨粗鬆症治療薬、軟骨細胞での発現抑制により変形性関節症治療薬の開発が可能になる。

2. 研究の目的

Runx2 による骨格形成機構、特に骨芽細胞、軟骨細胞の増殖・分化の分子機構を明らかにする。さらに Runx2 のエンハンサーを同定、その活性化機構を解明するとともに、軟骨細胞特異的エンハンサーを用いて軟骨細胞で Runx2 発現を抑制する化合物を同定し、変形性関節症治療薬を開発する。

3. 研究の方法

1) Runx2 の過剰発現、Runx2 siRNA による発現抑制、レポーターアッセイ、ChIP 解析により Runx2 による発現制御を調べた。

2) in situ hybridization を含む組織解析で細胞分化を、BrdU ラベルで細胞増殖を、TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)染色でアポトーシスを調べた。また、real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、droplet digital PCR およびマイクロアレイ解析で遺伝子発現を比較した。

3) 頭蓋冠の器官培養で、骨形成および細胞増殖

を評価した。

4) マイクロ CT 解析で骨量を、骨組織形態計測で骨形成、骨吸収を評価した。コラーゲンおよびアパタイト結晶の走行を計測、骨強度試験を行った。血清マーカーで骨形成、骨吸収を評価した。

4. これまでの成果

1) 骨芽細胞を供給するために骨芽細胞前駆細胞の増殖が必須であるが、そのメカニズムは明らかになっていなかった。Runx2 は、骨芽細胞分化だけでなく、骨芽細胞前駆細胞の増殖に必須であり、Fgfr2, Fgfr3 を直接発現制御することにより、骨芽細胞前駆細胞の増殖を誘導することを明らかにした。

2) Runx2 は、ヘッジホッグ、FGF、Wnt、Pthlh シグナル経路遺伝子の発現を誘導、頭蓋縫合の間葉系細胞の増殖および骨芽細胞系列への分化を誘導し、頭蓋骨形成へと導くことを明らかにした。さらに、Runx2 によるこれらの遺伝子発現誘導は、Runx2 が半量では十分に起こらず、頭蓋の低形成が起こることを明らかにした。

3) 非コラーゲン性骨基質タンパク質で最も豊富なオステオカルシンは、骨芽細胞特異的に発現しており、その発現は Runx2 によって制御される。オステオカルシンの機能は、骨のアパタイト結晶の成長方向の制御であり骨強度に重要な役割を果たすことを明らかにした。

4) Antxr1/Tem8 は GAPO (growth retardation, alopecia, pseudo-anodontia, and optic atrophy) 症候群の原因遺伝子であり、炭疽菌のレセプターでもある。Antxr1 が軟骨で高発現しており Runx2 により発現制御されること、Antxr1 は軟骨細胞の増殖を制御し、その異常により成長障害が起こることを明らかにした。

5. 今後の計画

1) 軟骨細胞特異的エンハンサーの活性化機構、転写複合体およびエンハンサー間及びプロモーターとの相互作用を解明する。

2) 軟骨細胞で軟骨細胞特異的エンハンサー活性および Runx2 発現を抑制する化合物を同定するとともに、変形性関節症における薬効評価、標的分子の同定を行う。

3) 生理的な Runx2 発現に関与するエンハンサー群を同定する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1 Jiang Q, Qin X, Yoshida CA, Komori H, Yamana K, Ohba S, Hojo H, Croix BS, Kawata-Matsuura V, Komori T: Antxr1, which is a target of Runx2,

regulates chondrocyte proliferation and apoptosis. Int J Mol Sci. 2020. in press. 査読有

- 2 Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, Wenguang L, Fukuyama R, Yuying W, Komori H, Qin X, Amizuka N, Komori T: Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. PLOS Genet. 2020. in press. 査読有
- 3 Komori T: Molecular mechanism of Runx2-dependent bone development. Mol Cells. 43(2): 168-175, 2020. 査読有
- 4 Yang, M., Arai, A., Udagawa, N., Zhao, L., Nishida, D., Murakami, K., Hiraga, T., Takao-Kawabata, R., Matsuo, K., Komori T., Kobayashi, Y., Takahashi, N., Isogai, Y., Ishizuya, T., Yamaguchi, A., Mizoguchi, T: Parathyroid Hormone Shifts Cell Fate of a Leptin Receptor-Marked Stromal Population from Adipogenic to Osteoblastic Lineage. J Bone Miner Res. 34 (10): 1952-1963, 2019. 査読有
- 5 Komori T: Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2, Int J Mol Sci. 20(7): 1694, 2019. 査読有
- 6 小守壽文: 特別講演「Runx2による骨格形成制御機構」, 第124回日本解剖学会全国学術集会, 新潟, 2019年3月.
- 7 Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori T: Runx2 regulates cranial suture closure by inducing hedgehog, Fgf, Wnt, and Pthlh signaling pathway gene expression in suture mesenchymal cells. Hum Mol Genet. 28(6):896-911, 2019. 査読有
- 8 Mitoma K, Matsunaga S, Kitamura K, Nakamura T, Saito A, Komori T, Muramatsu T, Yamaguchi A: Sphenoid bone hypoplasia is a skeletal phenotype of cleidocranial dysplasia in a mouse model and patients. Bone. 120:176-186, 2019. 査読有
- 9 Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, Matsuura-Kawata VKDS, Sakane C, Matsuo Y, Nagai K, Maeno T, Date Y, Nishimura R, Komori T: Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. Sci Rep. 10;8(1):13551, 2018. 査読有
- 10 Miyazaki T, Baba T.T, Mori M, Komori T: Collapsin response mediator protein 1, a novel marker protein for differentiated odontoblasts. Acta Histochem Cytochem. 20; 51(6): 185-190. 2018. 査読有

7. ホームページ等

<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/tlcr-k/>