

転写制御因子Runx2に関する分子薬理学的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/45303

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



氏名	藤川 晃一
学位の種類	博士（創薬科学）
学位記番号	医薬保博甲第44号
学位授与の日付	平成28年3月22日
学位授与の要件	課程博士（学位規則第4条第1項）
学位授与の題目	転写制御因子 Runx2 に関する分子薬理学的研究
論文審査委員	主査 檜井 栄一 副査 荒井 國三 副査 金田 勝幸 副査 猪部 学 副査 伊従 光洋

学位論文要旨

In this research, we investigated the functional role of Runt-related transcription factor 2 (Runx2) in osteogenesis and glioma growth. On Osteogenesis, osteoblast is formed from Prx1⁺ Sca1⁺ mesenchymal stem cells. Expression of mesenchymal stem cell marker such as CD90, CD105 and CD61 was decreased during the differentiation. Runx2 was highly expressed in Prx1⁺ Sca1⁻ CD90⁺ cells. While Runx2 was expressed in C6 glioma cells higher than primary cultured astrocyte and knockdown of Runx2 inhibited glioma cell growth. We focused on intracellular calcium concentration which reported to be related to cell proliferation. When C6 glioma cells loaded with calcium indicator Fluo-3 were exposed to ATP, fluorescence of Fluo-3 was increased, while spontaneous fluorescence increase was observed in the presence of Zn²⁺. Thus Fluo-3 was suspected to interact with Zn²⁺ than Ca²⁺. Moreover, calcium chelator ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) and calcium ionophore A23187 was interacted with Zn²⁺, while Zn²⁺ specific reagents like FluoZin-3, N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN) and Pyrithione were not recognized Ca²⁺. So, it is necessary to note the interaction of indicator with Zn²⁺ in the cell exist in the environment which include Zn²⁺.

【背景・目的】

Runt-related transcription factor 2 (Runx2) は、Runx ファミリーに属する転写制御因子であり、Runx ファミリーには Runx1、Runx2、Runx3 がある。Runx ファミリーは細胞の分化過程を制御し、個体の発生において重要な役割を果たしているほか、細胞の癌化にも寄与することが知られている。Runx1 は造血幹細胞の発生、赤血球や白血球、血小板といった血液細胞への分化に必須の因子であり、さらに血液腫瘍の癌抑制遺伝子として知られている。Runx3 は胃粘膜の細胞の分化に関与が報告されており、胃癌をはじめとした消化器癌における癌抑制遺伝子として知られている。そして、本研究において着目した Runx2 は骨の分化成熟に必須の因子として知られる一方で、前立腺癌や乳癌といった癌の発症への関与が報告されている。

1997 年に Runx2 ノックアウトマウスにおいて、骨が形成されないことが報告され、Runx2 が骨形成の必須因子であるとの認識が広がった。我々はこれまでに Runx2 を特定の細胞でノックアウトできる Runx2 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、骨芽細胞特異的に Runx2 を欠損させたマウスは野生型マウスと同様に骨格が形成されることを報告している。骨芽細胞は間葉系幹細胞から分化、成熟し、骨組織を形成する。間葉系幹細胞は脂肪細胞や筋細胞にも分化することができ、再生医療への利用が期待されており、間葉系幹細胞マーカーが多数報告されている。しかしながら、間葉系幹細胞のマーカーとされる細胞膜表面タンパクは多数報告されており、どのマーカータンパク

がいかなる細胞集団に発現しているかといった詳細は分かっておらず、どのような細胞へ分化できるのかも不明な部分が多いのが現状である。Runx2 コンディショナルノックアウトマウスによる解析の結果、Prx1 が骨形成に重要であることを見出し、間葉系幹細胞マーカーPrx1 陽性細胞における Runx2 の機能を検討した。

一方で、Runx2 は前立腺癌や乳癌など様々な癌において高発現しており、培養腫瘍細胞において Runx2 をノックダウンすると細胞増殖が抑制されることから、Runx2 は腫瘍細胞の増殖促進に関わっていると考えられている。我々はこれまでに中枢神経系の細胞であるアストロサイトにおいて、Runx2 が発現していることを報告しているが、アストロサイトから発生する癌である膠芽腫における Runx2 の機能についてはほとんど研究されていないのが現状である。

そこで、本研究では転写制御因子 Runx2 の機能解明を目的として、①骨形成過程における機能と②神経膠腫における機能に着目して解析を行った。

【方法】

①骨形成過程における Runx2 の機能解析

Prx1⁺Sca1⁺細胞における解析: Prx1-GFP 生後 1 日齢マウス頭蓋骨より調整した細胞において、間葉系幹細胞マーカーSca1 を用いて cell sorter により Prx1⁺Sca1⁺細胞を分取し培養し、CFU-F アッセイにより自己複製能を、また骨芽細胞および脂肪細胞へ分化誘導し、ALP 染色および oil red O 染色することで多分化能を評価した。

Prx1⁺Sca1⁻細胞における解析: Prx1-GFP マウス頭蓋骨より調整した細胞において、フローサイトメトリーにより各種間葉系幹細胞マーカーの発現を解析した。

各種幹細胞マーカー発現細胞集団における Runx2 の発現解析: cell sorter により Prx1⁺Sca1⁺ 細胞、Prx1⁺Sca1⁻CD90⁺ 細胞、Prx1⁺Sca1⁻CD90⁻CD105⁺ 細胞、Prx1⁺Sca1⁻CD90⁻CD105⁻細胞を分取し、Runx2 の mRNA 発現量を q-PCR 法により検討した。

成体マウス長骨における Prx1⁺Sca1⁺細胞の解析: Prx1-GFP 成体マウス大腿骨および脛骨中の骨髄細胞および骨組織を酵素処理することにより得た細胞を用いて、フローサイトメトリーにより Prx1⁺Sca1⁺細胞の有無を解析した。

②神経膠腫における Runx2 の機能解析

Glioma 細胞における Runx2 発現解析: ラット由来 C6 glioma 細胞およびヒト由来 glioma 細胞において、Runx2 m-RNA およびタンパク発現を Real-time PCR 法および Western blotting 法により解析した。

C6 glioma 細胞における Runx2 ノックダウンの影響: siRNA の導入により Runx2 をノックダウンした C6 glioma 細胞において、MTT アッセイおよび BrdU 取り込み能を測定し、細胞増殖能への影響を評価した。

C6 glioma 細胞における ATP 曝露による細胞内 Ca²⁺動態の検討：C6 glioma 細胞にカルシウム蛍光指示薬 Fluo-3 を取り込ませ、Fe²⁺または Zn²⁺存在下で ATP を添加し、Fluo-3 の蛍光強度を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

カルシウム特異的試薬に対する Zn²⁺の反応性の検討：C6 glioma 細胞にカルシウム蛍光指示薬 Fluo-3 を取り込ませ、Fluo-3 の Ca²⁺および Zn²⁺の反応性を、Fluo-3 の蛍光強度変化により評価した。また、Ca²⁺キレーターEGTA の Zn²⁺との反応性について評価した。

亜鉛特異的試薬に対する Ca²⁺の反応性の検討：NMDA 受容体強制発現 HEK293 細胞にカルシウム蛍光指示薬 Fluo-3 を取り込ませ、Glycine 存在下で Glu を曝露し、細胞内へ Ca²⁺を流入させた後、Zn²⁺キレーターTPEN を添加し Fluo-3 の蛍光強度より、TPEN の Ca²⁺との反応性を評価した。また、C6 glioma 細胞に亜鉛蛍光指示薬 FluoZin-3 を取り込ませた後、CaCl₂ 存在下あるいは非存在下で ZnCl₂ を添加し、FluoZin-3 の蛍光強度の変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察し、蛍光指示薬 FluoZin-3 の Zn²⁺との反応性について検討を行った。また、Zn²⁺キレーター N,N,N',N'-tetrakis-. (2-pyridylmethyl)-ethylenediamine (TPEN)を添加し Zn²⁺との反応性について検討を行った。

亜鉛トランスポーターの発現解析：C6 glioma 細胞および神経幹細胞株 P19 細胞、神経細胞株 Neuro2A 細胞、ミクログリア細胞株 BV2 細胞において、亜鉛トランスポーターである Slc30a ファミリー (Slc30a1~Slc30a10) および Slc39a ファミリー (Slc39a1~Slc39a14) の mRNA 発現量を Real-time PCR 法により検討した。

【結果】

①骨形成過程における Runx2 の機能解析

Prx1⁺Sca1⁺細胞における解析：CFU-F アッセイの結果、Prx1⁺Sca1⁺細胞では Prx1⁺Sca1⁻細胞と比較してコロニー形成率が非常に高かった。また、ALP 染色および oil red O 染色の結果、Prx1⁺Sca1⁺細胞では骨芽細胞および脂肪細胞への分化が確認されたが、Prx1⁺Sca1⁻細胞では骨芽細胞への分化は認められたものの脂肪細胞への分化は認められなかった。

Prx1⁺Sca1⁻細胞における解析：CD90 陽性の細胞のほとんどが CD61、CD105 陽性であり、CD90 陰性の細胞の中には CD61、CD105 が陽性の細胞と陰性の細胞が混在していた。また、CD61 陽性の細胞の多くは CD105 陽性であり、CD61 陰性の細胞には CD105 陽性の細胞と CD105 陰性の細胞が混在していた。

各種幹細胞マーカー発現細胞集団における Runx2 の発現解析：q-PCR 法の結果、Prx1⁺Sca1⁺CD90⁺細胞においてのみ Runx2 mRNA の高発現が認められ、Prx1⁺Sca1⁺細胞、Prx1⁺Sca1⁻CD90⁻CD105⁺細胞、Prx1⁺Sca1⁻CD90⁻CD105⁻細胞では認められなかった。

成体マウス長骨における Prx1⁺Sca1⁺細胞の解析：骨組織から調整した細胞中には、血球系の細胞マーカーである CD45 陰性、血管内皮細胞のマーカーである CD31 陰性、赤血球のマーカーである TER119 陰性の細胞にわずかながら Prx1 陽性の細胞が含まれてい

たが、骨髄より調整した CD45⁻CD31⁻TER119⁻細胞には Prx1 陽性の細胞は認められなかった。また、骨組織から調整した細胞中には CD45⁻CD31⁻TER119⁻細胞の 0.07% という非常にわずかな割合で Prx1⁺Sca1⁺細胞が存在しており、Prx1⁺Sca1⁻細胞は、CD45⁻CD31⁻TER119⁻細胞の 0.18% の割合で存在していた。

②神経膠腫における Runx2 の機能解析

Glioma 細胞における Runx2 発現解析：Western blotting の結果、C6 glioma 細胞には初代培養アストロサイトと比較して Runx2 が高発現していた。また、Western blotting および Real-time PCR の結果、ヒト Glioma 細胞においても RNA およびタンパク質レベルでの Runx2 の発現が認められた。

C6 glioma 細胞における Runx2 ノックダウンの影響：MTT アッセイの結果、Runx2 siRNA 導入により Runx2 をノックダウンした C6 glioma 細胞では siRNA 導入 24、36、48、60 時間後の MTT 還元活性が control 群と比較して有意に低下していた。また、Runx2 siRNA 群では、control siRNA 導入群と比較して、BrdU 取り込み能が有意に低下していた。

C6 glioma 細胞における ATP 曝露による細胞内 Ca²⁺動態の検討：control 群では 1 mM および 10 mM の ATP の添加によって Fluo-3 の蛍光強度の上昇が認められたが、ZnCl₂ 存在下では経時的な Fluo-3 の蛍光強度の上昇がみられ、ATP 添加による効果は確認することができなかった。

カルシウム特異的試薬に対する Zn²⁺の反応性の検討：Zn²⁺の添加によって Fluo-3 の蛍光強度の経時的な上昇が認められ、この蛍光強度上昇は Ca²⁺の有無に関わらず認められた。その後の Zn²⁺イオノフォア pyrithione を添加によって、Zn²⁺存在条件下においてさらなる Fluo-3 の蛍光強度の上昇が認められたが、Ca²⁺のみの条件では Fluo-3 の蛍光強度に変化は認められなかった。さらに Ca²⁺イオノフォア A23187 を添加では、Ca²⁺のみの条件で Fluo-3 の蛍光強度の上昇が認められたのに対して、Zn²⁺存在条件下ではさらなる Fluo-3 の蛍光強度の上昇は認められなかった。EGTA 非存在下で見られた Zn²⁺による Fluo-3 の蛍光強度上昇は EGTA 存在下では全く認められなかった。

亜鉛特異的試薬に対する Ca²⁺の反応性の検討：Ca²⁺が流入した HEK293 細胞に Zn²⁺キレーター TPEN を添加したところ、0.2 mM、2 mM のいずれの濃度においても、Fluo-3 の蛍光強度に変化は認められなかった。

また、FluoZin-3 を取り込ませた C6 glioma 細胞に Zn²⁺の添加したところ、FluoZin-3 の蛍光強度は Ca²⁺の有無に関わらず、経時的に上昇した。その後、Zn²⁺イオノフォア pyrithione を添加すると蛍光強度が上昇し、さらに Ca²⁺イオノフォア A23187 を添加しても蛍光強度の上昇は認められなかった。また、EGTA 存在下で Zn²⁺を添加した際には、Zn²⁺イオノフォア pyrithione、Ca²⁺イオノフォア A23187 を添加しても、FluoZin-3 の蛍光強度の上昇は認められなかった。

Zn²⁺および Ca²⁺と反応する可能性が示された Fluo-3 を負荷した C6 glioma 細胞に Zn²⁺

を添加しその後 Zn^{2+} イオノフォア Pyrrhione を加えたところ、Fluo-3 の蛍光強度は上昇した。さらに Zn^{2+} キレーター TPEN を添加したところ Fluo-3 の蛍光強度は低下したものの、基底状態までは下がらなかった。しかし、 Zn^{2+} を特異的に認識する可能性が示された FluoZin-3 を負荷した C6 glioma 細胞では、Pyrrhione の添加により上昇した FluoZin-3 の蛍光強度は TPEN を加えることにより基底状態まで低下した。

亜鉛トランスポーターの発現解析：q-PCR の結果、いずれの細胞株にも亜鉛トランスポーターの発現が確認され、特に C6 glioma 細胞においては Slc30a6、Slc30a7 の発現が高かった。

【考察】

本研究結果により、骨形成は Prx1⁺Sca1⁺な間葉系幹細胞から Prx1⁺Sca1⁻細胞になり、CD90 や CD105 などの間葉系幹細胞マーカーが消失していき、Prx1⁺Sca1⁻Osterix⁺細胞を経て、骨芽細胞へと分化していくことが重要であり、Prx1⁺Sca1⁻CD90⁺細胞において、Runx2 の高発現が認められたことから、この過程で Runx2 が必須となる可能性が考えられる。また、成体マウスの長骨においても Prx1⁺Sca1⁺な間葉系幹細胞が存在していたが、骨髄細胞中には存在していないことが明らかになり、組織によって存在する間葉系幹細胞の特徴に違いがある可能性が示され、再生医療に用いる際には、適切な組織からより最適な間葉系幹細胞マーカーを用いて調達してくる必要が考えられる。

また、神経膠腫において Runx2 が高発現しており、その Runx2 は細胞の増殖に関与している可能性が示された。細胞増殖を制御している可能性のある細胞内 Ca^{2+} 濃度を Zn^{2+} の蓄積が考えられる glioma 細胞で評価するために、各カルシウム特異的試薬の Zn^{2+} との反応性について検討したところ、カルシウム特異的試薬は Zn^{2+} とも反応する可能性が示された。しかし、亜鉛特異的試薬の Ca^{2+} との反応は認められなかった。イオンの形で亜鉛が多く存在している環境にある細胞において、細胞内の Ca^{2+} の流入を検討しようとした場合、カルシウム蛍光指示薬と Zn^{2+} との反応に留意する必要がある。癌細胞においても亜鉛トランスポーターの発現が確認されており、腫瘍組織の周囲には Zn^{2+} が存在し腫瘍の増殖や浸潤に関与している可能性があるため、細胞内への Ca^{2+} の流入を検討する際には注意する必要がある、より Ca^{2+} を特異的に認識できるツールが開発されることに期待したい。

最後に Runx2 は骨形成だけでなく神経膠腫をはじめとした癌細胞の増殖にも重要な役割を果たしているにもかかわらず、現在 Runx2 の機能を調整することができる医薬品は開発されていない現状にあり、本研究が今後の Runx2 を新たな治療ターゲットとする医薬品開発研究に貢献できることを期待したい。

審査結果の要旨

本研究では、転写制御因子 **Runx2** に着目し、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化系譜の詳細を明らかにすることを目的とした。骨形成に必須とされている **Runx2** ではあるが、コンディショナルノックアウトマウスを用いた解析の結果、骨芽細胞で発現する **Runx2** は骨形成過程に影響がなく、**Prx1** 陽性の間葉系幹細胞に発現する **Runx2** のノックダウンにより骨格形成の異常が認められた。生後 1 日齢の **Prx1-GFP** マウス頭蓋骨を用いて **Prx1** 陽性細胞について詳細に検討する目的で、フローサイトメトリーによる解析を行った。その結果、**Prx1**, **Sca1** 両陽性の細胞集団は多くの間葉系幹細胞マーカーを発現する単一の細胞集団であり、この細胞は自己複製能及び脂肪細胞、骨芽細胞への分化能を有する未分化性が高い細胞であった。また、この細胞は成体マウスの骨組織中にも存在したが、骨髄や白色脂肪中には存在しなかった。さらに、**Prx1** 陽性 **Sca1** 陰性の細胞を **CD90**, **CD105** の発現を指標にして細分化し、**Prx1Sca1** 両陽性細胞の分化過程におけるマーカー発現変化を示した。その分化過程において一時的に **Runx2 mRNA** が高発現していることが示された。

以上の研究成績は、**Runx2** が間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化する過程での方向付けにおいて必須の機能を担っている可能性を示し、その分化指標として間葉系幹細胞マーカーを特徴付けしたことで、多能性幹細胞を用いた再生医療の進歩に貢献できると考えられる点で評価できるため、審査委員会は本論文が博士（創薬科学）に値すると判断した。