



Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and PKApathway

森, 清

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3590

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003590>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 1 1 】

氏 名・（本 籍） 森 清 （ 大阪府 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1733号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and PKA
pathway

（Runx2 と PKA 経路によるマウス RANKL 遺伝子発現の調節）

審 査 委 員

主 査 教 授 横 崎 宏
教 授 千 原 和 夫
教 授 黒 坂 昌 弘

【緒言】

Runx2 は骨芽細胞分化に必須の転写因子であるが、骨芽細胞表面に発現する破骨細胞分化因子 (RANKL) 遺伝子発現に対する Runx2 の関与については未だ明らかではない。本研究ではマウス RANKL 遺伝子発現に関わるシグナル伝達経路として知られる PKA 経路に着目して Runx2 の RANKL 発現調節機構を解析した。

【方法】

細胞培養

マウス骨髄間質細胞株 ST2、および Runx2 欠損マウス頭蓋冠由来未分化間葉系細胞株 C6 は α -MEM にて 37°C の加湿した 5% 二酸化炭素環境下で培養した。

共培養実験

8 週齢の雄正常マウスの大腿骨、脛骨骨髄から回収した骨髄マクロファージ (BMM) と ST2 または C6 細胞を 7 日間、共培養した。PKA 経路賦活の為にアデニレートシクラーゼのアゴニストであるフォルスコリン (FK) を 10^{-5} M 添加した系、またはデキサメサゾン (Dex) 10^{-8} M と $1, \alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (VitD) の高濃度 (10^{-7} M) あるいは低濃度 (10^{-9} M) を添加する系を作成した。共培養後、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRACP) 染色を行い、3 核以上の多核 TRACP 陽性破骨細胞様細胞数の計測を行った。

定量的リアルタイム逆転写 (RT-) PCR

ST2 および C6 細胞より RNA を抽出した後、逆転写反応にて cDNA を作成し、RANKL、RANKL のおとり受容体オステオプロテゲリン (OPG)、Runx2、サイクリック AMP 反応エレメント (CRE) 結合蛋白 (CREB) の一種である ATF-4、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 に対する特異的プライマー・プローブを用い、RT-PCR 法で各 mRNA 発現量を定量した。各発現量は、内因性コントロールとしての GAPDH 発現量により標準化した。

部位特異的変異作成

リコンビナント PCR 法にて、RANKL 遺伝子直上の 2kb を有する pGL3-2k ベクターに

含まれる 3 箇所の Runx2 結合類似配列の数塩基置換した変異 DNA (Runx2-1: AACCTCA から AACCTTG, -368/-362; Runx2-2: AACCACT から AACCTTG, -207/-201; Runx2-3: AACCCACA から AACCCCTTG, -194/-187) を作成し、この他 CRE 類似配列 (TGAGGTCA, -969/-962) を TGAGGAGG に置換した変異 DNA を作成した。これらの PCR 産物を pGL3-Basic ベクターに組み込み、pGL3-mutRunx2-2、pGL3-mutRunx2-2,3、pGL3-mutRunx2-1,2,3、pGL3-mutCRE ベクターを作成し、一過性遺伝子導入実験を行った。

ルシフェラーゼアッセイ

上記コンストラクトと phRG-TK ベクターとをリポフェクション法にて ST2 および C6 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性をルミノメータにて測定し、RANKL プロモータ活性を評価した。

ゲルシフトアッセイ

ST2 細胞から核蛋白を抽出し、上記 3 箇所の Runx2 結合類似配列の各々を含む二本鎖オリゴヌクレオチドプローブ 3 種類 (Runx2-1, Runx2-2, および Runx2-3) を作成し、5'-末端を [γ - ^{32}P] ATP で標識した。これらの二本鎖 DNA を核抽出蛋白と 25°C で 15 分間結合反応させた後、電気泳動を行った。また、スーパーシフト反応の為に抗 Runx2 抗体を結合反応前に核抽出蛋白に添加した。更に、競合実験の為に Runx2 コンセンサス配列 (AACCCACA) を 2 つ含む非標識 DNA プローブを合成して結合反応に加え、電気泳動を行った。

Runx2 発現ベクターおよび安定 Tet-On 導入 C6 細胞株の樹立

マウス Runx2 cDNA を Tet-On システムのドキシサイクリン (Dox) 反応ベクターに組み込み、Runx2 強制発現ベクターを作成した。また、pTet-On ベクターにビューロマイシン耐性遺伝子を組み込み、この調節ベクターをリポフェクション法にて安定に C6 細胞に導入した C6-12IA7F 細胞を樹立した。この C6-12IA7F 細胞に同じくリポフェクション法にて Dox 反応性 Runx2 発現ベクターの一時的導入を行った後、Dox $1 \mu\text{g/ml}$ を投与し、mRNA・蛋白発現の検討に供した。

ウェスタンブロッティング

Runx2 を強制発現させた C6 細胞から蛋白質を抽出し、SDS-PAGE にて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写させ、ブロッキング後に抗 Runx2 抗体を一次抗体として反応させた。更に西洋ワサビ過酸化酵素を結合させた二次抗体と反応させ、ECL キットを用いて免疫複合体を検出した。

RNA 干渉実験

マウス Runx2 に対する低分子干渉 RNA (siRNA) を合成し、ST2 細胞に一時的導入を行った。更に、FK 処理をした後に、RNA を回収し、リアルタイム RT-PCR に供した。

クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ)

ST2 および C6 細胞を FK 処理した後、ホルムアルデヒドで固定し、超音波破碎にて DNA を断片化し、抗アセチル化ヒストン H3/H4 抗体、抗リン酸化ヒストン H3 (Ser10) 抗体を添加し、4℃、一晚反応させた。免疫沈降物の蛋白-DNA クロスリンクを解除し、DNA のみを回収した。また、RANKL 遺伝子 5'-上流領域の転写開始部位から 40.3kb の部位、そして CRE (-26.7kb) および CRE 類似配列 (-12.8kb、-0.96kb) の下流 1kb 以内の領域が増幅されるように、これら 4 箇所に特異的なプライマーセットを合成し、回収した DNA を鋳型にした PCR を施行した。

【結果】

ST2 または C6 細胞での RANKL、OPG、Runx2 発現に対して FK が与える影響

定常状態の ST2 細胞での RANKL mRNA 発現量を基準に探ると、定常状態の C6 細胞は 149、FK 刺激にて 2091 と顕著な高値を示した。一方 ST2 細胞は FK 刺激にて 87 に留まった。しかしながら、FK 処理後/処理前比は、C6 細胞は 14 倍、ST2 細胞で 87 倍と ST2 細胞で高い反応を示した。OPG 発現は両細胞共に、FK 処理により抑制が見られた。また、ST2 細胞にて、FK 刺激により Runx2 発現は抑制された。また定常状態では、C6 細胞での ATF-4 発現は ST2 細胞の約 1.5 倍であった。

破骨細胞形成に対して FK が与える影響

ST2 または C6 細胞と BMM との共培養系では共に、FK 処理にて TRACP 染色陽性破骨細胞様細胞の形成を認め、C6 細胞による多核細胞数は ST2 細胞の約 2 倍であった。

ゲルシフトアッセイ

Runx2-1、Runx2-2、Runx2-3 プローブを用いたゲルシフトアッセイにおいてそれぞれ有意な蛋白-DNA 結合が認められ、各結合は、特異的競合プローブの濃度依存性に阻害され、更に抗 Runx2 抗体によるスーパーシフトが見られた。

部位特異的変異が RANKL プロモータ活性に与える影響

Runx2 結合類似配列の変異部位の数に依存して、ルシフェラーゼ活性の低下および FK に誘導されたルシフェラーゼの活性化の低下を ST2 細胞で認めた。一方、C6 細胞では、変異箇所の数によらず活性の有意な変動は認めなかった。また、CRE 類似配列を含まないコンストラクト (pGL3-723)、および 3 塩基置換コンストラクト (pGL3-mutCRE) では、変異の無い CRE 類似配列を含むコンストラクトで見られた FK によるルシフェラーゼ活性の増加は見られなかった。

RNA 干渉を用いた ST2 細胞 Runx2 発現ノックダウンによる変化

ST2 細胞において、siRNA による Runx2 発現をノックダウンした結果、FK 非存在下での RANKL mRNA 発現が軽度増加した。また、RANKL 発現の FK 処理後/処理前比は 60% 未満に低下した。

Runx2 強制発現による C6 細胞での検討

C6 細胞に Runx2 を一時的に導入したところ、FK 非存在下で、Runx2 導入前の 60% 未満に RANKL 発現が抑制された。また、RANKL 発現の FK 処理後/処理前比は、約 1.4 倍に増加した。

クロマチン免疫沈降法

RANKL 遺伝子 5'-上流領域の転写開始部位より 40.3kb 以内の範囲でのヒストン H3、H4 のアセチル化は、FK 非存在下の ST2 細胞ではほぼ見られず、FK 処理により、主に H4

蛋白に起こることが観察された。また、C6 細胞では、いずれの部位においても、FK 処理の有無によらずヒストン H3、H4 のアセチル化が持続的に起こることが認められた。定常状態での HDAC3 mRNA 発現は C6 細胞では ST2 細胞の約 50%であり、両細胞とも FK 投与にて 40-50%に低下した。

【考察】

ST2 細胞の RANKL mRNA 発現は、Runx2 遺伝子が欠損している C6 細胞に比較して著明に抑制されることから、Runx2 は定常状態に於けるマウス骨髄間質細胞/骨芽細胞系細胞での RANKL 発現に抑制的な役割を持つことが推測された。BMM との共培養実験では、破骨細胞様細胞形成数は C6 細胞の系が ST2 細胞の系での約 2 倍であったが、両細胞間の RANKL mRNA 発現程度の差に比べて小規模の較差であった。これは、OPG 発現抑制が FK により誘導された後も、C6 細胞では未だ OPG 発現が維持されている為であると思われる。

部位特異的変異作成実験では、RANKL 遺伝子の基本転写調節領域での Runx2 結合類似配列の機能は 2kb 程度のプロモータの活性を軽度上昇させることが示された。更に、CRE 類似配列の機能は、FK 投与に反応して Runx2 非依存性に 2kb 程度のプロモータ活性を上昇させることが示された。

よって FK の効果は、endogenous な RANKL mRNA 発現を約 100 倍～2000 倍に増加させた一方で、短期導入した RANKL プロモータの活性化の増加は数倍に留まり、両者に解離が見られた。この解離を検討する為、ST2 および C6 細胞での RANKL 遺伝子 5'-上流約 40kb までの領域におけるクロマチン構造の変化について ChIP アッセイにて検討したところ、ST2 細胞では、FK 投与にてヒストン H4 のアセチル化が誘導されたのに対し、C6 細胞では定常状態で既に 5'側上流約 40kb の領域で広範囲にヒストン H3、H4 のアセチル化が認められた。従って、定常状態の ST2 細胞では、Runx2 が HDAC3 を介した RANKL 転写調節領域のクロマチン凝集を誘導し転写を著しく抑制するが、FK 処理による PKA-CREB 経路の活性化により、Runx2 mRNA 発現の抑制、HDAC3 発現低下とクロマチンの弛緩、その結果容易となる CRE/CRE 類

似配列と CRE 結合蛋白(CREB、ATF-4)の結合が RANKL 発現を促進すると思われた。更に siRNA による Runx2 発現抑制後の ST2 細胞にて RANKL 発現が増加傾向を示し、Runx2 を強制発現させた C6 細胞での RANKL 発現が低下する傾向が見られたことは、Runx2 によるクロマチン凝集を介した RANKL 発現抑制機構を裏付ける結果であった。

骨芽細胞系細胞は前骨芽細胞の段階では、さらに分化が進んだ骨芽細胞よりも破骨細胞形成支持能力が高いこと、そして骨芽細胞以降の分化段階では、Runx2 は分化を抑制すること等が知られ、分化段階に応じて、Runx2 に依存する RANKL 発現レベルの切り替えを行う機構の存在が示唆された。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、本研究全過程において御指導を頂きました本学分子病理学分野・北澤 莊平助教授に深謝致します。また実験立案・実験遂行・結果解析の御指導を頂きました分子病理学分野・北澤 理子講師、技術的及び結果解析の御指導を頂いた近藤 武史助手、技術的協力を頂いたアグス ダルワント博士、並びに松田 修一技官、坂本 紀子技官に感謝致します。さらに、C6 細胞を御供与頂きました東京医科歯科大学大学院口腔病理学分野・山口 朗教授に謹んで感謝の意を表します。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1736号	氏 名	森 清
論文題目 Title of Dissertation	Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and PKA pathway Runx2 と PKA 経路によるマウス RANKL 遺伝子発現の調節		
審査委員 Examiner	主 査 横 崎 孝 Chief Examiner 副 査 千 原 和 夫 Vice-examiner 副 査 黒 坂 昌 弘 Vice-examiner		
審査終了日	平成 18 年 2 月 16 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

Runx2 は骨芽細胞分化に必須の転写因子であるが、骨芽細胞表面に発現する破骨細胞分化因子（RANKL）遺伝子発現に対する Runx2 の関与については未だ明らかではない。本研究者はマウス RANKL 遺伝子発現に関わるシグナル伝達経路として知られる PKA 経路に着目して Runx2 の RANKL 発現調節機構を解析した。
【方法】
マウス骨髄間質細胞株 ST2、および Runx2 欠損マウス頭蓋冠由来未分化間葉系細胞株 C6 は α -MEM にて 37℃ の加温した 5% 二酸化炭素環境下で培養した。8 週齢の雄正常マウス的大腿骨、脛骨骨髄から回収した骨髄マクロファージ（BMM）と ST2 または C6 細胞を 7 日間、共培養した。ST2 および C6 細胞より RNA を抽出した後、逆転写反応にて cDNA を作成し、RANKL、RANKL のおとり受容体オステオプロテグリン（OPG）、Runx2、サイクリック AMP 反応エレメント（CRE）結合蛋白（CREB）の一種である ATF-4、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 に対する特異的プライマー・プローブを用い、RT-PCR 法で各 mRNA 発現量を定量した。各発現量は、内因性コントロールとしての GAPDH 発現量により標準化した。リコンビナント PCR 法にて、RANKL 遺伝子直上の 2kb を有する pGL3-2k ベクターに含まれる 3 箇所の Runx2 結合類似配列の数塩基置換した変異 DNA と CRE 類似配列から変異 DNA を作成した。これらの PCR 産物を pGL3-Basic ベクターに組み込み、pGL3-mutRunx2-2、pGL3-mutRunx2-2,3、pGL3-mutRunx2-1,2,3、pGL3-mutCRE ベクターを作成し、一過性遺伝子導入実験を行った。
ルシフェラーゼ活性をルミノメータにて測定し、RANKL プロモータ活性を評価した。同様にゲルシフトアッセイを行った。
マウス Runx2 cDNA を Tet-On システムのドキシサイクリン（Dox）反応ベクターに組み込み、Runx2 強制発現ベクターを作成した。また、pTet-On ベクターにピューロマイシン耐性遺伝子を組み込み、この調節ベクターをリポフェクション法にて安定に C6 細胞に導入した C6-12IA7F 細胞を樹立した。この C6-12IA7F 細胞に同じくリポフェクション法に

て Dox 反応性 Runx2 発現ベクターの一時的導入を行った後、Dox 1 μ g/ml を投与し、mRNA・蛋白発現の検討に供した。
同様にウェスタンブロッティング、RNA 干渉実験、クロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) にて解析した。
【結果】
定常状態の ST2 細胞での RANKL mRNA 発現量を基準に採ると、定常状態の C6 細胞は 149、FK 刺激にて 2091 と顕著な高値を示した。一方 ST2 細胞は FK 刺激にて 87 に留まった。しかしながら、FK 処理後/処理前比は、C6 細胞は 14 倍、ST2 細胞で 87 倍と ST2 細胞で高い反応を示した。OPG 発現は両細胞共に、FK 処理により抑制が見られた。また、ST2 細胞にて、FK 刺激により Runx2 発現は抑制された。また定常状態では、C6 細胞での ATF-4 発現は ST2 細胞の約 1.5 倍であった。
ST2 または C6 細胞と BMM との共培養系では共に、FK 処理にて TRACP 染色陽性破骨細胞様細胞の形成を認め、C6 細胞による多核細胞数は ST2 細胞の約 2 倍であった。
Runx2-1、Runx2-2、Runx2-3 プローブを用いたゲルシフトアッセイにおいてそれぞれ有意な蛋白-DNA 結合が認められ、各結合は、特異的競合プローブの濃度依存性に阻害され、更に抗 Runx2 抗体によるスーパーシフトが見られた。
Runx2 結合類似配列の変異部位の数に依存して、ルシフェラーゼ活性の低下および FK に誘導されたルシフェラーゼの活性化の低下を ST2 細胞で認めた。一方、C6 細胞では、変異箇所の数によらず活性の有意な変動は認めなかった。また、CRE 類似配列を含まないコンストラクト (pGL3-723)、および 3 塩基置換コンストラクト (pGL3-mutCRE) では、変異の無い CRE 類似配列を含むコンストラクトで見られた FK によるルシフェラーゼ活性の増加は見られなかった。
ST2 細胞において、siRNA による Runx2 発現をノックダウンした結果、FK 非存在下での mRNA 発現が軽度増加した。また、RANKL 発現の FK 処理後/処理前比は 60%未満に低下した。

RANKL 下した。
C6 細胞に Runx2 を一時的に導入したところ、FK 非存在下で、Runx2 導入前の 60%未満に RANKL 発現が抑制された。また、RANKL 発現の FK 処理後/処理前比は、約 1.4 倍に増加した。
RANKL 遺伝子 5'-上流領域の転写開始部位より 40.3kb 以内の範囲でのヒストン H3、H4 のアセチル化は、FK 非存在下の ST2 細胞ではほぼ見られず、FK 処理により、主に H4 乙酰化に起こることが観察された。また、C6 細胞では、いずれの部位においても、FK 処理の有無によらずヒストン H3、H4 のアセチル化が持続的に起こることが認められた。定常状態での HDAC3 mRNA 発現は C6 細胞では ST2 細胞の約 50%であり、両細胞とも FK 投与にて 40-50%に低下した。
本研究は、骨芽細胞分化における転写因子の役割について研究したものであるが、これまでほとんど行われなかった骨芽細胞表面に発現する破骨細胞分化因子 (RANKL) 遺伝子発現に拘わるシグナル伝達経路について新しい知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。