

## 雌マウス生殖器官における Runx3 の役割

土家 由起子・佐久間 敦子・竹内 栄・高橋 純夫

岡山大学大学院自然科学研究科生体統御学グループ

### はじめに

Runx3 (Runt domain transcription factor 3) は Runx ファミリーに属する転写因子で, Runt ドメインを持つ  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットから成るヘテロ二量体である (1)。その機能は多岐にわたっており, 胃癌抑制 (2), T細胞分化 (3), 神経発生 (4) などが報告されてきた。Runx3は, Smad3/4と共役し, TGF- $\beta$  シグナル伝達経路で機能することが明らかとなっており (5), 広範な器官での機能が予測される。我々は, Runx3を欠損した (*Runx3*<sup>-/-</sup>) マウスの雌は不妊になることを発見した (6)。しかし, 雌生殖器官におけるRunx3の機能は解明されておらず, 不妊の原因はわかっていない。そこで, 本研究では, 子宮および卵巣におけるRunx3の役割を解明することを目的とした。実験には*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスを用い, 生殖器官の形態学的解析を行なった。次いで, *Runx3*欠損が卵胞形成に及ぼす効果を調べた。さらに, *Runx3*欠損が子宮内膜の性ステロイドホルモン依存的な細胞増殖に及ぼす効果を調べた。

### 材料と方法

#### 実験動物

BALB/c 系統の野生型マウスおよび *Runx3*<sup>-/-</sup>マウス (2) を使用した。*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスは, *Runx3*<sup>+/-</sup>マウス同士のかげ合わせによって得た。遺伝子型判定は Yamamoto *et al.* (2006) の方法に従って行った。ゲノム DNA を鋳型として, 次のプライマーセットを用いて MolTaq DNA polymerase (Molzym, Bermen, Germany) によって増幅した。1) 5'-GAC TGT GCA TGC ACC TTT CAC CAA-3', 2) 5'-ATG AAA CGC CGA GTT AAC GCC ATC A-3', 3) 5'-TAG GGC TCA GTA GCA CTT ACG TCG-3'。PCR 反応は, 95°C で 5 分の熱変成の後, 95°C 35 秒, 58°C 30 秒, 72°C 45 秒の反応を 12 サイクル行った。次いで, 95°C 35 秒, 64°C 45 秒, 72°C 45 秒の反応を 25 サイクル行った。

最後に, 72°C で 10 分の伸長反応を行った。170 bp のバンドは野生型アリルから増幅された産物である。550 bp のバンドは変異型アリルから増幅された産物である。

#### RT-PCR による *Runx3* mRNA 発現の解析

マウス組織から, TRIzol Reagent (Invitrogen, Carbad, CA) を用いて RNA を抽出した。この RNA を, オリゴ dT プライマーを用いて ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen) により逆転写した。得られた cDNA を鋳型とし, 次のプライマーを用いて MolTaq DNA polymerase (Molzym) によって増幅した。5'-ACT GGC GCT GCA ACA AGA CGC T-3', 5'-GTC TGG GCC TGG CTG CTG AAG T-3' (439 bp)。DNA 変成は 94°C, DNA 合成は, *Rpl8* は 60°C, 24 サイクル, *Runx3* は 65°C 35 サイクルで行った。

#### 生殖器官の組織学的解析

組織摘出後すぐにプアン氏液中で固定し, 脱水後, パラフィン中に包埋した。5 $\mu$ m の連続切片を作製し, ハマトキシリンおよびエオシンで染色後, 卵胞数を数えた。

#### *in situ* hybridization 法による *Runx3* mRNA 発現の解析

マウス *Runx3* mRNA (3891 bp) の塩基配列 1769 - 2071 (303 bp) を標的とした RNA プローブ (プローブ 1 とする) および塩基配列 1245 - 2304 (1060 bp) を標的とした RNA プローブ (プローブ 2 とする) を作製した。プローブはともに Digoxigenin 標識した。

8 週齢の野生型マウスの卵巣, 子宮を摘出し, Tissue-Teck O.C.T.Compound (Sakura finetek, 東京) 中で新鮮凍結し, 10  $\mu$ m の切片を作製した。それぞれの切片を 4% パラフォルムアルデヒド / 0.01M PBS (pH 7.6) によって固定し, ProteinaseK で処理

した。卵巣切片にはプローブ1を、子宮切片にはプローブ2を一晩ハイブリダイズさせた。続いて、アルカリホスファターゼ標識した抗DIG抗体；Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche, Mannheim, Germany)を一晩反応させ、NBT/BCIPを基質として発色反応を行った。

#### 卵巣摘出とホルモン処理

7週齢雌マウスの卵巣を摘出した。1週間後、1) 1, 2日目にゴマ油 (0.1 ml) を投与し、3日目にエストラジオール-17 $\beta$  (E2, 250 ng, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を投与した。2) 1, 2, 3日目にプロゲステロン (P4, 1mg, Sigma-Aldrich) を投与した。3) 1, 2日目にP4 (250 ng) を、3日目にE2 (250 ng) とP4 (1 mg) を同時投与した。

#### DNA合成細胞の検出

最後のホルモン処理から10時間後にBrdUを投与し、2時間後に組織を摘出してブアン氏液で固定した。パラフィン包埋の組織切片を作製し、BrdU using Cell proliferation kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) によって免疫組織化学的にBrdU標識細胞を検出した。

#### 統計処理

データは平均値と標準誤差で表し、2群間の有意差の検定にはStudentの*t*検定を用いた。

### 結果

#### 雌マウス生殖器官におけるRunx3 mRNA発現の解析

8週齢の雌マウスの生殖器官におけるRunx3 mRNAの発現をRT-PCRにより調べた(図1)。Runx3 mRNAは、卵巣と子宮で発現していた。

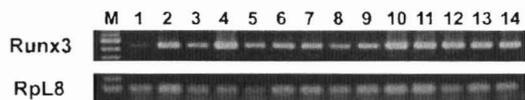


図1 マウス器官におけるRunx3 mRNAの発現。1,視床下部；2,下垂体前葉；3,下垂体中・後葉；4,肺；5,心臓；6,食道；7,胃；8,肝臓；9,小腸；10,大腸；11,腎臓；12,副腎；13,卵巣；14,子宮。

#### 雌マウス生殖器官におけるRunx3 mRNA発現細胞の同定

8週齢のマウスの卵巣および子宮におけるRunx3 mRNA発現細胞を、*in situ* hybridization法によって検出した(図2)。Runx3 mRNAは、卵巣では顆粒膜細胞に、子宮では子宮内膜上皮細胞、腺上皮細胞、間質細胞で発現していた(矢印)。

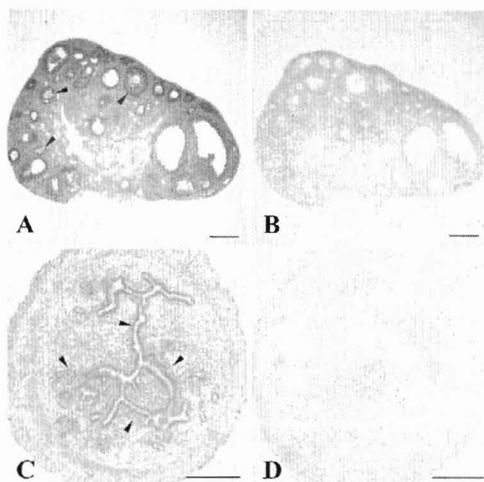


図2 雌マウスの生殖器官におけるRunx3 mRNA発現細胞。(A, B)；卵巣，(C, D)；子宮。(A, C)；アンチセンスプローブを使用，(B, D)；センスプローブを使用。Bar=300 $\mu$ m。

#### Runx3<sup>-/-</sup>マウス卵巣の形態学的解析

8週齢のRunx3<sup>-/-</sup>マウスの卵巣は、野生型マウスと比較して萎縮しており、黄体がなかった(図3)。また、卵胞数を比較したところ、Runx3<sup>-/-</sup>マウスの卵巣では、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞の数が有意に減少していた。一方、閉鎖卵胞の数は有意に増加していた(図4)。



図3 Runx3欠損による卵巣の形態学的変化。(A)；野生型マウス，(B)；Runx3<sup>-/-</sup>マウス。CLは黄体を示す。Bar=100 $\mu$ m。

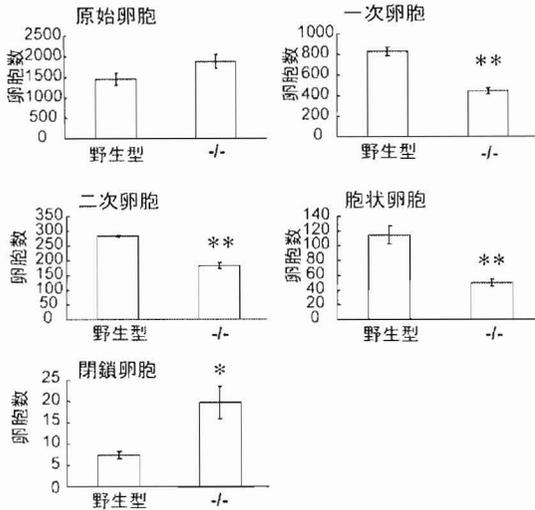


図4 *Runx3* 欠損による卵胞数の変化。*Runx3*<sup>+/+</sup>マウスでは、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞が減少していた。閉鎖卵胞は増加していた。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ : 野生型と比較して有意の差。(Sakuma et al., 2008 (6) より改変)

### *Runx3*<sup>+/+</sup>マウス子宮内膜細胞の DNA 合成における性ステロイドホルモンの効果

*Runx3*<sup>+/+</sup>マウスの子宮は、野生型と比較して萎縮しており、子宮内膜間質細胞が未発達である。また、子宮腺が少ない(図5)。そこで、卵巣摘出マウスにE2 (250 ng)とP4 (1 mg)を投与した。引き続きBrdUを投与し、BrdU標識細胞の検出によってDNA合成細胞数の変化を調べた(図6)。子宮内膜上皮細胞および腺上皮細胞では、E2による細胞増殖が有意に低下していた。

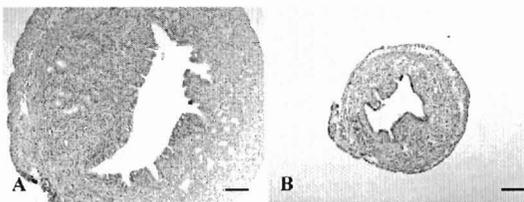


図5 *Runx3* 欠損による子宮の形態学的変化。(A) ;野生型マウス, (B) ;*Runx3*<sup>-/-</sup>マウス。 Bar=100 $\mu$ m。

### 考察

*Runx3* mRNAはマウスの様々な組織に発現しており、生体内で広く機能している。*Runx3* mRNAは子宮、卵巣でも発現しており、*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスは不妊になることから、*Runx3*は雌生殖系で重要な機能を有することが示唆された。

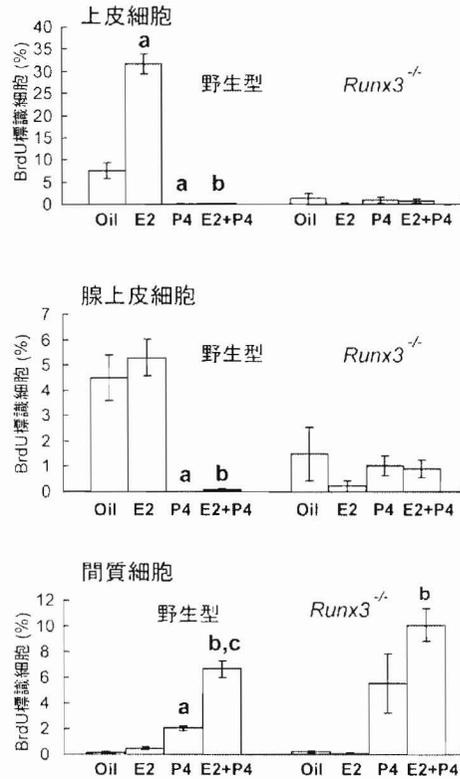


図6 *Runx3* 欠損による、性ステロイドホルモン依存性の子宮内膜細胞増殖への効果。a, コントロールマウスと比較して有意の差 ( $P < 0.01$ ); b, E2処理マウスと比較して有意の差 ( $P < 0.01$ ); c, P4処理マウスと比較して有意の差 ( $P < 0.01$ )。(Sakuma et al., 2008 (6) より改変)

*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスの卵巣を形態学的に解析したところ、卵胞形成異常を起こしており、黄体がなく、無排卵であることがわかった。このことから、*Runx3*は卵胞形成および排卵過程で重要な役割を担うことが示唆された。

卵巣における卵胞形成は、生殖腺刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) によって制御されている。*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスに過排卵処理をしたところ、排卵および黄体形成が起き、*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスは排卵能と黄体形成能を持つことがわかった(6)。加えて、視床下部、下垂体で*Runx3* mRNAが発現していたことから、*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスの無排卵の原因は、視床下部-下垂体系の機能異常にあることが示唆された。

*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスの子宮は萎縮している。子宮内膜細胞は未発達であり、腺上皮細胞が少ない。E2は、子宮内膜上皮細胞の増殖を促進する(7)。そこで、卵

巣摘出した *Runx3*<sup>-/-</sup>マウスに E2 を投与したところ、子宮内膜上皮細胞と腺上皮細胞の細胞増殖が起らなかった。これより、*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスの子宮内膜上皮細胞は、E2 への応答性が低いことが示唆された。

*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスは黄体がないため、P4 レベルが低下していることが考えられる。E2 と P4 は、ともに作用すると子宮内膜間質細胞の増殖を促進する (8)。そこで、卵巣摘出した *Runx3*<sup>-/-</sup>マウスに E2 と P4 を同時投与したところ、子宮内膜間質細胞での細胞増殖が正常に起きた。

以上より、*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスの子宮が萎縮している原因として、上皮細胞での E2 依存性細胞増殖が低下していること、黄体無形成による P4 レベルの低下が示唆された。

子宮内膜上皮細胞の E2 依存性細胞増殖は、間質細胞で産生される成長因子が仲介している (9,10)。この成長因子として、IGF-1 や、EGF ファミリーに属する成長因子が考えられている (10,11,12)。*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスでは、これらの成長因子の発現量やシグナル伝達経路に異常が起きている可能性が考えられる。

## 要 約

*Runx3* (Runt domain transcription factor 3) は *Runx* ファミリーに属する転写因子で雌マウスにおいて *Runx3* mRNA は、卵巣や子宮に発現していた。雌の *Runx3*<sup>-/-</sup>マウスは不妊であった。*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスは卵胞形成異常を起しており、無排卵であった。一方で、排卵能および黄体形成能は有していた。以上より、*Runx3* は卵胞形成および排卵制御に関与していることを明らかにした。

*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスの子宮は萎縮している。子宮内膜上皮細胞では、E2 依存性の細胞増殖が起らなかった。しかし、子宮内膜間質細胞では、E2, P4 存在下で正常に細胞増殖が起きた。以上より、*Runx3* は E2 による子宮の細胞増殖に関与していることを明らかにした。

## 謝 辞

*Runx3*<sup>-/-</sup>マウスをご供与くださったシンガポール国立分子細胞研究所伊藤嘉明教授、長崎大学歯薬学総合研究科伊藤公成博士、本研究の全般にわたりご助言を下された東京医科歯科大学深町博史博士、実験手技をご指導下さった岡山大学大学院自然科学研究科国枝哲夫教授、清須千代さんに厚く御礼を申

上げます。

## 文 献

- (1) Ito Y. 1999. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells* 4: 685–696.
- (2) Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. 2002. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 109:113–124.
- (3) Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, Ito Y, Littman DR. 2002. Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111:621–633.
- (4) Inoue K, Ozaki S, Shiga T, Ito K, Masuda T, Okado N, Iseda T, Kawaguchi S, Ogawa M, Bae SC, Yamashita N, Itohara S, Kudo N, Ito Y. 2002. Runx3 controls the axonal projection of proprioceptive dorsal root ganglion neurons. *Nat Neurosci* 2002, 5:946–954.
- (5) Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo WH, Imamura T, Ishidou Y, Fukuchi M, Shi MJ, Stavnezer J, Kawabata M, Miyazono K, Ito Y. 1999. Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Ca promoter. *J Biol Chem* 274:31577–31582.
- (6) Sakuma A, Fukamachi H, Ito K, Ito Y, Takeuchi S, Takahashi S. 2008. Loss of Runx3 affects ovulation and estrogen-induced endometrial cell proliferation in female mice. *Mol Reprod Dev* 75:1653–1661.
- (7) Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan Y, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahn DB, Cunha GR. 1997. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6535–6540.
- (8) Komatsu N, Maekawa T, Takeuchi S, Takahashi S. 2003. Epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  stimulate the proliferation of mouse uterine stromal cells. *Zool Sci* 20:639–645.
- (9) Takahashi T, Eitzman B, Bossert NL, Walmer D,

- Sparrow K, Flanders KC, McLachlan J, Nelson KG. 1994. Transforming growth factors  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, and  $\beta$ 3 messenger RNA and protein expression in mouse uterus and vagina during estrogen-induced growth: A comparison to other estrogen-regulated genes. *Cell Growth Differ* 5:919–935.
- (10) Shiraga M, Takahashi S, Miyake T, Takeuchi S, Fukamachi H. 1997. Insulin-like growth factor-I stimulates proliferation of mouse uterine epithelial cells in primary culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 215:412–417.
- (11) Nelson KG, Takahashi T, Bossert NL, Walmer DK, McLachlan JA. 1991. Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:21–25.
- (12) Nelson KG, Takahashi T, Lee DC, Luetke NC, Bossert NL, Ross K, Eitzman BE, McLachlan JA. 1992. Transforming growth factor- $\alpha$  is a potential mediator of estrogen action in the mouse uterus. *Endocrinology* 131:1657–1664.