

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09743

研究課題名(和文) 歯の形成におけるRUNX2によるCTGF/CCN2発現調節機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of regulation of CTGF/CCN2 by RUNX2 in tooth formation

研究代表者

森谷 徳文 (MORITANI, NORIFUMI)

岡山大学・医歯薬学域・講師

研究者番号：60467751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：鎖骨頭蓋異形成症と正常対象者の抜去歯牙を用いた検討でRUNX2とCTGF/CCN2のタンパク質局在に変化を認めた。Saos-2細胞においてRUNX2とCTGF/CCN2遺伝子の発現促進および抑制に正の相関関係があることを示唆する結果が得られた。またCos-7細胞内でCTGF/CCN2発現に変化をもたらす、いくつかのRUNX2タンパク質の候補領域を同定した。これら研究結果により、RUNX2遺伝子変異箇所の違いによってRUNX2タンパク質構造が変化し、それに伴ってCTGF/CCN2発現量が変化することによって、歯の萌出に關与する鎖骨頭蓋異形成症の表現型に変化をもたらすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の形成において重要なRUNX2がCTGF/CCN2の発現を調節し、その調節機構を解析したことによって、歯の形成を指揮する重要なメカニズムの一端を解明する手がかりとなる結果を得た。これらの結果は、歯の再生医療を樹立するための基盤となり、また、鎖骨頭蓋異形成症患者においては、RUNX2遺伝子変異箇所の違いに対して、歯科的なオーダーメイド治療を行うための一助となる成果となったのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Analysis of teeth extract from subjects with cleidocranial dysplasia and normal subjects revealed changes in protein localization of RUNX family transcription factor 2 (RUNX2) and connective tissue growth factor (CTGF/CCN2). Positive correlations were evident between RUNX2 and CTGF/CCN2 gene expression promotion and suppression in Saos-2 cells. Several RUNX2 protein candidate regions were identified that altered CTGF/CCN2 expression in Cos-7 cells. The findings indicate that the structure of RUNX2 protein changes depending on the mutation site of the RUNX2 gene, and that the CTGF/CCN2 expression changes accordingly. These changes result in an altered phenotype of cleidocranial dysplasia involved in tooth eruption.

研究分野：外科系歯学関連

キーワード：CTGF/CCN2 RUNX2 tooth formation

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

文部科学省の iPS 細胞研究ロードマップにおいて、歯に関しては、H33 年より再生医療の前臨床研究を開始し、H35 年より臨床応用を行うことを目指している。しかしながら現時点ではこの計画実現に向けての基盤は十分とは言い難い。なぜなら歯の形成において様々な因子が複雑に関与し、全体像がまだ不明であるためである。したがって今、基盤となる基礎データの蓄積は最重要課題である。

鎖骨頭蓋異形成症は RUNX2 遺伝子変異が原因であるが、鎖骨頭蓋異形成症の表現型として過剰歯の発生、永久歯の萌出遅延や乳歯の晩期残存が高頻度に発生するため、RUNX2 が歯の形成に重要な役割を果たしていることは明白である。実際に RUNX2 が歯の形成の各段階で発現している研究データが報告されている (Camilleri S, McDonald F. Runx2 and dental development. Eur J Oral Sci 114 :361-373, 2006)。

一方で我々は CTGF/CCN2 が歯の形成段階で発現していることを明らかとしており、興味深いことに RUNX2 ノックアウトマウスでは CTGF/CCN2 の発現が消失することを見出した。以上より歯の形成において重要な RUNX2 が CTGF/CCN2 の発現を調節していることは明らかであるが、未だにその調節機構については明らかとされていない。したがって、その調節機構を明らかとすれば歯の形成を指揮する重要なメカニズムの一端が解明されることになり、歯の再生医療を樹立するための基盤となる成果となるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

現時点では歯の再生医療は未確立だが、歯の形成に関して様々な研究が行われ、歯の再生医療に寄与する成果が得られてきている。中でも骨芽細胞分化に必須の転写因子 RUNX2 が、歯の形成にも重要な鍵となる転写因子であることは注目に値する。我々は過去に歯の形成過程において結合組織成長因子/CCN2 ファミリー-2(CTGF/CCN2)が発現しており、しかも、RUNX2 ノックアウトマウスの歯の形成段階において CTGF/CCN2 の発現が消失することを見出したが、その機構の詳細は明らかではない。ゆえにこのメカニズムを詳細に解析すれば歯の形成システムに関する新知見が得られ、ひいては歯の再生の実現に寄与できるのではないかと考えに至った。本研究では歯の形成において、RUNX2 が CTGF/CCN2 の発現を調節しているメカニズムを解析することによって、歯の再生医療につながる基盤的成果を得ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究ではまず健常者および鎖骨頭蓋異形成症(cleidocranial dysplasia;以下 CCD と略す)患者の抜去歯牙における CTGF/CCN2、RUNX2 の mRNA およびタンパク質発現量を解析し、両者の相関を確認する。これを基礎データとして以降の研究を A、B の 2 つに分け培養細胞株を使用して行う。A では RUNX2 が CTGF/CCN2 発現調節を行っていることを証明した後に、RUNX2 と相互作用して CTGF/CCN2 発現を調節している新規因子を同定する。B では CTGF/CCN2 発現調節を行う RUNX2 タンパク質の機能領域を特定する。A、B で得られた結果は抜去歯牙より作成した初代歯髄培養細胞においても同様の結果が得られるか否かを検証する。さらに抜去歯牙とマウス歯胚～萌出歯の各段階での組織切片を用いて CTGF/CCN2、RUNX2 ならびに新規因子の発現動態と局在を解析し、それらの歯牙形成における動態と CCD 病態との関連を in vivo で確認する。

### 4. 研究成果

In vivo において、鎖骨頭蓋異形成症患者の過剰埋伏歯および正常な対象者からの萌出小白歯における RUNX2 と CTGF/CCN2 のタンパク質局在を明らかにし比較解析した結果、鎖骨頭蓋異形成

症と正常対象者とを比較すると RUNX2 と CTGF/CCN2 のタンパク質局在に変化が認められた。In vitro においては、ヒト骨芽細胞様細胞株 Saos-2 細胞における CTGF/CCN2 および RUNX2 の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて確認し、RUNX2 発現を RNAi による mRNA の knockdown を行ったところ、RNAi に用いる dsRNA により実験結果に差が生じるが、CTGF/CCN2 の発現が抑制されることを示唆する結果が得られた。また Saos-2 細胞内で DNA transfection により RUNX2 遺伝子の強制発現を行ったところ、CTGF/CCN2 の発現が促進されることを示唆する結果が得られた。これらの結果より RUNX2 がヒト骨芽細胞様細胞株 Saos-2 細胞において CTGF/CCN2 の発現を正に調整していることが示唆された。続いて CTGF/CCN2 発現調節を行う RUNX2 タンパク質の機能領域の特定を行うため、RUNX2 遺伝子の全長および部分的な発現ベクターを Cos-7 細胞に DNA transfection して強制遺伝子発現させ、CTGF/CCN2 発現の変化を解析したところ、その発現に変化をもたらす、いくつかの候補領域が推定された。これら研究結果により、RUNX2 遺伝子変異箇所の違いによって RUNX2 タンパク質が変化し、それに伴って CTGF/CCN2 発現量が変化することによって、歯の萌出に關与する鎖骨頭蓋異形成症の表現型に変化をもたらすことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 W. P. Shield, 3rd, A. Cellini, H. Tian, K. Wilson, Y. Dan, J. M. Abzug, S. Garcia, N. Moritani, I. Alferiev, M. Chorny, M. Takigawa, V. Y. Ng, M. Iwamoto.M. Enomoto-Iwamoto.	4. 巻 -
2. 論文標題 Selective Agonists of Nuclear Retinoic Acid Receptor Gamma Inhibit Growth of HCS-2/8 Chondrosarcoma Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24555	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Y. Yoshioka, E. Yamachika, M. Nakanishi, T. Ninomiya, S. Akashi, S. Kondo, N. Moritani, Y. Kobayashi, T. Fujii.S. Iida.	4. 巻 9
2. 論文標題 Intermittent parathyroid hormone 1-34 induces oxidation and deterioration of mineral and collagen quality in newly formed mandibular bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44389-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 N. Moritani, ES. Hara, S. Kubota	4. 巻 5
2. 論文標題 New Functions of Classical Compounds against Orofacial Inflammatory Lesions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicines (Basel)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicines5040118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshioka, Y. Yamachika, E. Nakanishi, M. Ninomiya, T. Nakatsuji, K. Matsubara, M. Moritani, N. Kobayashi, Y. Fujii, T. Iida, S.	4. 巻 47
2. 論文標題 Molecular alterations of newly formed mandibular bone caused by zoledronate	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oral Maxillofac Surg	6. 最初と最後の頁 1206-1213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijom.2018.02.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 N. Moritani, K. Takabatake, S. Kubota, Y. Yoshioka, M. Hoshijima, Y Matsui, E. Yamachika, S. Iida.
2. 発表標題 Localization of RUNX2 and CCN2 proteins in the supernumerary tooth of a cleidocranial patient
3. 学会等名 The 13nd Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery (ACOMS) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	滝川 正春  (TAKIGAWA MASAHARU)  (20112063)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	
研究分担者	久保田 聡  (KUBOTA SATOSHI)  (90221936)	岡山大学・医歯薬学域・教授    (15301)	
研究分担者	高畠 清文  (TAKABATAKE KIYOFUMI)  (70736537)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	
研究分担者	星島 光博  (HOSHIJIMA MITSUHIRO)  (30736567)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	
研究分担者	松村 達志  (MATSUMURA TATSUSHI)  (70432648)	岡山大学・医歯薬学域・准教授    (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------