

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592336

研究課題名（和文） 第三象牙質形成における Runx2 の役割に関する組織細胞学的研究

研究課題名（英文） Histological examination about the role of Runx2 in tertiary dentin formation

研究代表者

宮崎 敏博（MIYAZAKI TOSHIHIRO）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10174161

研究成果の概要（和文）：

本研究は、骨芽細胞分化に必須の転写因子である Runx2 の歯牙における第三象牙質形成との関連を明らかにすることを目的とし、ヒト抜去歯における第三象牙質、および実験的にマウス臼歯に形成させた修復象牙質を対象にして、第三象牙質における Runx2 の発現と基質の性状を組織化学的に解析した。その結果、ヒト第三象牙質およびマウス修復象牙質の形成細胞は Runx2 を発現しており、また、それらの細胞と基質には骨組織に主に発現する osteopontin や osteocalcin 等が強く発現していた。すなわち、第三象牙質の形成には Runx2 が関与し、その基質は骨組織の性状と類似していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to clarify the role of Runx2, which is an essential transcription factor for osteoblast differentiation, in tertiary dentin formation. We examined tertiary dentin of human teeth, and reparative dentin that was experimentally formed in mouse molars, and have immunohistochemically demonstrated that Runx2 was expressed in the formative cells of tertiary dentin, and osteopontin and osteocalcin, which were highly present in bone tissue, were also expressed in tertiary dentin. Thus, it was suggested that Runx2 plays a role in tertiary dentin formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：口腔組織学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Runx2、歯、第三象牙質、象牙芽細胞、分化、組織、組織化学

1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、Runx2 が骨芽細胞

分化において必須の遺伝子であることを世界に先駆けて発見し、また、骨芽細胞の後期

分化を抑制することを明らかにしてきた。一方、Runx2 ノックアウトマウスの歯牙形成は、帽状期までに停止し、象牙芽細胞の分化が認められないことから、Runx2 は歯牙形成でも重要な因子であることが報告されている。歯胚において、Runx2 は帽状期までの歯乳頭細胞と前象牙芽細胞、および歯小嚢に発現し、鐘状期以降の歯乳頭および象牙芽細胞では発現が低下する。我々は、*Col1a1* プロモーターを用いて象牙芽細胞特異的に Runx2 を過剰発現させたトランスジェニック (*Tg*) (*Col1a1-Runx2*) マウスを作成し、象牙芽細胞分化過程における Runx2 の機能解析を行い、① Runx2 は象牙芽細胞の正常な分化のためにはダウンレギュレーションされないといけないこと、② Runx2 の発現は象牙芽細胞を骨芽細胞の性質を有する細胞に形質転換することを明らかにした (Miyazaki et al., Arch. Histol. Cytol. 71:131-146, 2008)。

Tg(Col1a1-Runx2) マウスにおける象牙質は、骨組織の構造を呈し、う蝕・咬耗・磨耗・窩洞形成等の刺激により形成される第三象牙質のうち歯髄細胞から新たに分化した細胞が形成するとされる修復象牙質の特徴と多くの共通点を有していたことから、修復象牙質形成における Runx2 の関連性が示唆された。これまでに、Runx2 が歯髄内の骨様組織形成細胞に発現しているという免疫組織学的報告はあるものの、第三象牙質形成における Runx2 の機能を解析した報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Runx2 の発現と第三象牙質形成との関連性を明らかにすることであり、そのために、ヒト抜去歯および実験的なマウス臼歯における修復象牙質を用いて、第三象牙質における Runx2 の関連と性状を組織化学的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 対象：ヒトの歯については、矯正治療による健全な抜去歯を対照として、齶蝕や破折、および歯周炎により抜歯した歯について解析した。実験的には、4週齢マウスの萌出後間もない臼歯を用いて、ダイヤモンドポイントで咬頭部を研磨して象牙質を露出させたものについて、研磨後3時間、1日、1週で非研磨群と比較解析した。また、加齢マウス(1年)臼歯における自然磨耗により形成された象牙質、および *Tg(Col1a1-Runx2)* マウスの象牙質についても比較対象として用いた。

(2) 光学顕微鏡観察用試料の作製：ヒト抜去歯については、4% paraformaldehyde 固定液で浸漬固定し、マウス臼歯については、同液で灌流固定後、通法によりパラフィン包埋して切片を作製した。形態観察のためには HE 染色を行い、ヒト歯については Arana-Chavez and Massa(2004)等の文献を参考に、第三象牙質を象牙細管や埋入細胞の有無などによりタイプ分けを行った。

(3) Runx2 の発現、および分化関連因子・象牙芽細胞マーカー・各種硬組織基質タンパク発現の組織化学的解析：Runx2、および分化因子として Osterix、象牙芽細胞マーカーとして Dentin sialophosphoprotein (DSPP)、nestin、硬組織基質タンパク質として osteopontin、osteocalcin、dentin matrix protein 1 (DMP1) の発現を免疫組織化学により解析した。マウスモノクローナル抗体 {Runx2, MBL; nestin (anti-mouse, Millipore)} は、Histofine Simple stain MAX-PO (M) (Nichirei)を用いて、ウサギポリクローナル抗体 {osteopontin, DMP-1, IBL; osteocalcin, Takara Bio; nestin(anti-human, Millipore)} は、Histofine Simple stain

MAX-PO(R) (Nichirei) を用いて反応を行い、DAB液、またはDAB-Nickel液でそれぞれ茶色、黒色に発色を行い、メチルグリーンで対比染色して観察を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト第三象牙質

従来の分類に従い、第三象牙質として、①少数の象牙細管しか有さないもの、②象牙細管の走行がみだれたもの（細胞封入体を有するものを含む）、③象牙細管がないもの（細胞封入体を有するものを含む）を分類した。これらの第三象牙質に歯髄結石を含めて Runx2 の発現を解析したところ、それらの基質表面に存在する細胞と埋入した細胞は形態的に象牙芽細胞と異なり扁平で、Runx2 が発現していた（図1 A, B）。さらに Runx2 陽性細胞およびそれに面する細胞と基質には、osteopontin と osteocalcin の発現が認められた（図1 C, D）。

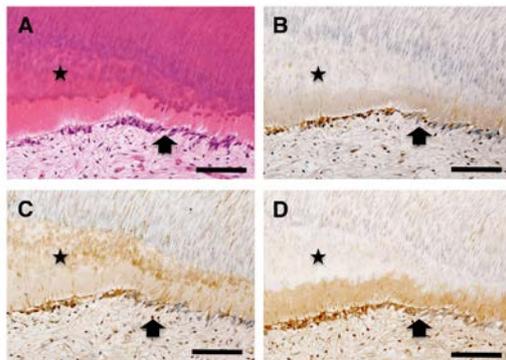


図1 ヒト第三象牙質（星印）における Runx2 (B), osteopontin (C), osteocalcin (D) の発現。いずれも原生（第二）象牙質との移行部から（矢印）第三象牙質に相当する面に存在する細胞に発現が認められる。A は HE 染色。スケール：100 μ m

(2) マウス修復象牙質

マウス臼歯の咬頭部を研磨して象牙質を露出させると、研磨3時間後の観察です

で象牙質の修復が観察された（図2 A, B）。その修復象牙質表面に並ぶ細胞には Runx2 の発現が認められ、その発現は今回観察した研磨1週間まで確認された（図2 C）。また、それら修復象牙質においては osteopontin の強い発現（図2 D）と象牙芽細胞における nestin の発現の低下が認められた。また、Runx2 と osteopontin の発現は、加齢に伴う自然摩耗により形成された修復象牙質表面の象牙芽細胞にも認められた。

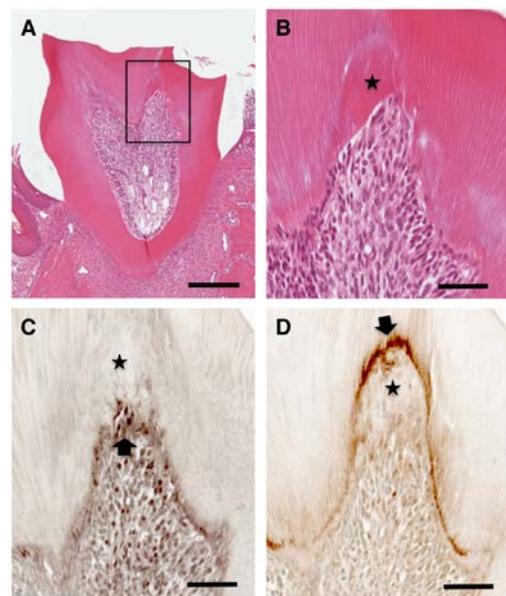


図2 歯冠研磨後のマウス修復象牙質（星印）における Runx2 と osteopontin の発現。修復象牙質に面する細胞に Runx2 の発現が認められ（C：矢印）、形成開始時の基質に osteopontin の強い発現が認められる（D：矢印）。A, B は HE 染色で、B は A 枠内の拡大。スケール：A=200 μ m；B-D=50 μ m

(3) 以上の結果より、ヒト第三象牙質およびマウス修復象牙質において、その形成には Runx2 が関与することが強く示唆された。また、それらの形成細胞、および基質には骨芽細胞と骨基質に主に発現する osteopontin, osteocalcin の発現が見られ

ることから、第三象牙質は骨組織様の性状を持つことが明確になった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Moriishi T, Maruyama Z, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Kitaura H, Ohnishi H, Furuichi T, Kawai Y, Masuyama R, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T: Overexpression of Bcl2 in osteoblasts inhibits osteoblast differentiation and induces osteocyte apoptosis. PLoS One 6(11):e27487, 2011 (査読有)
2. Cao L, Moriishi T, Miyazaki T, Iimura T, Hamagaki M, Nakane A, Tamamura Y, Komori T, Yamaguchi A: Comparative morphology of the osteocyte lacunocanalicular system in various vertebrates. J Bone Miner Metab 29(6):662-7, 2011 (査読有)
3. Okada Y, Imendra KG, Miyazaki T, Hotokezaka H, Fujiyama R, Toda K: High extracellular Ca²⁺ stimulates Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in frog parathyroid cells through the mediation of arachidonic acid cascade. PLoS One 6(4):e19158, 2011 (査読有)
4. Gonzales C, Hotokezaka H, Karadeniz EI, Miyazaki T, Kobayashi E, Darendeliler MA, Yoshida N: Effects of fluoride intake on orthodontic tooth movement and orthodontically induced root resorption. Am J Orthod Dentofacial Orthop 139(2):196-205,

2011 (査読有)

5. Miyazaki T, Moriishi T, Izumi S, Baba T, Komori T: Ultrastructural analysis of osteoblasts, osteocytes and odontoblasts in *Runx2* transgenic mice. J Electr Microsc Technol Med Biol 23(2): 50, 2010(査読無)

[学会発表] (計 9 件)

1. 水橋孝治, 金本隆司, 金本隆司, 大森義裕, 森石武史, 宮崎敏博, 相沢慎一, 小守壽文, 古川貴久: c f m 1, 2 はマウス椎間板の発達維持に必須である, 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 13 日, 横浜
2. 岡田幸雄, 宮崎敏博, 佛坂齊社, 藤山理恵, 戸田一雄: カエル味蕾ウイング型 (Ib) 細胞の不飽和脂肪酸誘発電流の特性, 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月 28 日, 横浜
3. 馬場友巳, 宮崎敏博, 達聖月, 根本優子, 根本孝幸: 骨芽細胞に発現するアクアポリン, 第 53 回歯科基礎医学会, 2011 年 10 月 2 日, 岐阜
4. 岡田幸雄, 宮崎敏博, 藤山理恵, 戸田一雄: カエル味覚円盤ロッド型細胞のセシウム透過性カリウムチャネル, 日本味と匂学会第 45 回大会, 2011 年 10 月 7 日, 石川
5. 岡田幸雄, 宮崎敏博, 佛坂齊社, 藤山理恵, 戸田一雄: カエル副甲状腺のアラキドン酸誘発電流, 日本動物学会第 81 回大会, 2010 年 9 月 24 日, 東京
6. 馬場友巳, 根本優子, 宮崎敏博, 根本孝幸: スタチンによる脂肪細胞分化抑制経路と RANKL 発現抑制経路の比較第 52 回歯科基礎医学会, 2010 年 9 月 22 日, 東京

7. 岡田幸雄, 宮崎敏博, 佛坂齊祉, 藤山理恵, 戸田一雄: カエル味蕾ウイング型(Ib)細胞の不飽和脂肪酸誘発電流の特性, 第61回西日本生理学会, 2010年10月15日, 長崎
8. Miyazaki T, Moriishi T, Izumi S, Baba T, Komori, T: Ultrastructural analysis of osteoblasts, osteocytes and odontoblasts in *Runx2* transgenic mice. 6th international Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology, Sep. 18, 2009, Kobe
9. 森石武史, 宮崎敏博, 和泉伸一, 小守壽文: 骨芽細胞特異的Bcl-2 過剰発現マウスでは骨芽細胞の分化抑制と骨細胞死が起こる, 第51回歯科基礎医学会学術集会, 2009年9月9日, 新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 敏博 (MIYAZAKI TOSHIHIRO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 10174161

(2) 研究分担者

馬場 友巳 (BABA TOMOMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 60189727

(3) 連携研究者

小守 壽文 (KOMORI TOSHIHISA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00252677