

## 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25年 5月30日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390390

研究課題名（和文） 上皮特異的Runx欠損マウスを用いたエナメル質形成の分子機構の解明

研究課題名（英文） The elucidation of molecular mechanisms of amelogenesis by epithelial-specific Runx knockout mouse.

研究代表者

本城 正 (TADASHI HONJO)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10379844

研究成果の概要（和文）：

Runx ファミリー遺伝子は生物種を超えて多くの器官や組織の発生・分化過程に重要な役割を果たすことが知られている。本研究では歯の発生において上皮で果たす Runx シグナリングの役割を解明することを目的とし、Cbfb と Runx1 の上皮特異的ノックアウトマウスの歯の表現型の解析を行った。その結果、Runx1/Cbfb シグナルがエナメル芽細胞の分化を制御することでエナメル質の形成に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英）：

Targeted deletion of Runx genes has revealed distinct roles for these proteins in development. Here, we report that epithelial Runx genes are involved in regulation of ameloblast differentiation. We analyzed the functional role of Cbfb and Runx1 in the enamel formation *in vivo*, using a conditional genetic approach in which the Cbfb and Runx1 gene was inactivated in mouse epithelial cells (K14-Cre/Cbfb<sup>fl/fl</sup>, K14-Cre/Runx1<sup>fl/fl</sup>). We found that mice deficient in epithelial Cbfb and Runx1 resulted in enamel aplasia in the incisors and in hypoplasia in the molars. The present results provide the genetic evidence that Runx1 and Cbfb genes function in the enamel formation in developing molar and incisors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2012年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 矯正・小児系歯学

キーワード： Runx1, Cbfb, エナメル芽細胞, 遺伝子改変動物, エナメル質

### 1. 研究開始当初の背景

歯の発生の分子機構を明らかにすることは、先天的な欠如歯ならびに形態異常歯を伴う不正咬合等の改善を行う矯正歯科治療にとって、治療や診断の基盤を確立するうえで非常に重要である。

一方、Runx ファミリーはさまざまな細胞種の発生・分化過程に重要な分子であることがノックアウトマウスによる研究で明らかにされており、特に Runx2 は骨形成のマスタージーンと言われ、核内転写因子として有名な分子である。

ところで、骨形成が欠失することで有名な Runx2 ノックアウトマウスにおいて、歯胚にも形成異常が生じることが知られており、骨だけでなく歯の形成においても必須の因子であることが明らかとなっている。しかし、これまでの歯の形成における Runx ファミリーに関する研究では、歯原性間葉における役割にのみ注目が集まり、歯原性上皮組織での機能的な役割については検討がなされたことがなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では歯の発生における Runx シグナリングの役割を解明することを目的とし、Cbfb と Runx1 の上皮特異的ノックアウトマウスの歯の表現型の解析を行うことで Runx シグナリングの機能的役割を検討した。また、器官形成において Runx シグナリングが上皮で果たす分子的作用について唾液腺を用いて解析した。

### 3. 研究の方法

(1) 上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウス

(K14-Cre;Cbfb fl/fl) の解析

(2) 上皮特異的 Cbfb ノックアウトマウス

(K14-Cre;Runx1 fl/fl) の解析

(3) これらのコンディショナルノックアウトマウスの表現系を比較し Cbfb、Runx1、Runx2 のそれぞれの単独での機能と、これらが機能的にどのように補い合っているかについても検討する

### 4. 研究成果

Cbfb 変異マウスおよび Runx1 変異マウスのいずれにおいても、切歯のエナメル質の形成が阻害されることを明らかにした。

(図 1、図 2)

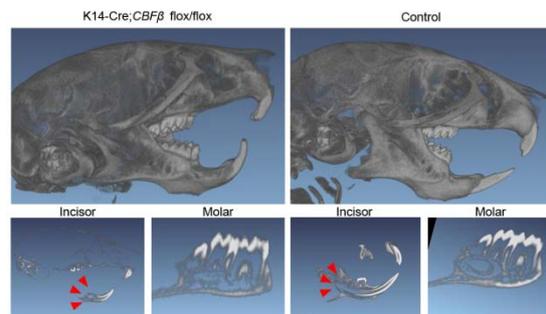


図 1 Cbfb 変異マウスのマイクロ CT 所見

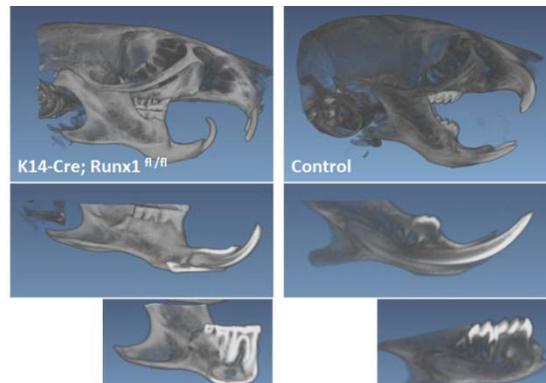


図 2 Runx1 変異マウスのマイクロ CT 所見  
いずれの変異マウスにおいても、Shh の発現が著しく減弱し、内エナメル上皮から

エナメル芽細胞への分化が完全に阻害された(図3)。一方、これら変異マウスの臼歯では、エナメル質は形成されるものの、エナメル質の亀裂や著しい咬耗が見られ、エナメル質の低形成が認められた(図4)。これらの表現型は **Runx1** 変異マウスにおいて **Cbfb** 変異マウスより顕著であった。

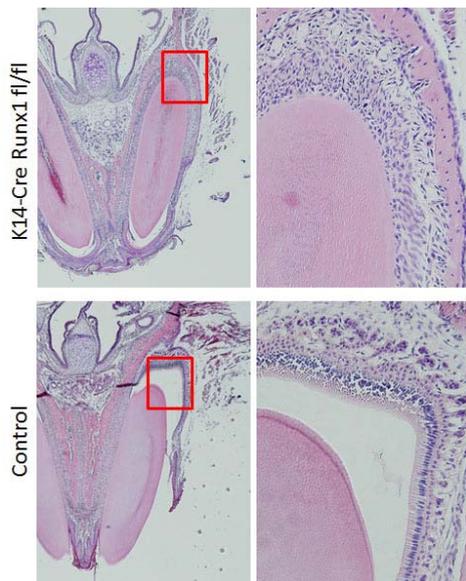


図3 **Runx1** 変異マウス切歯の HE 像 (4w)

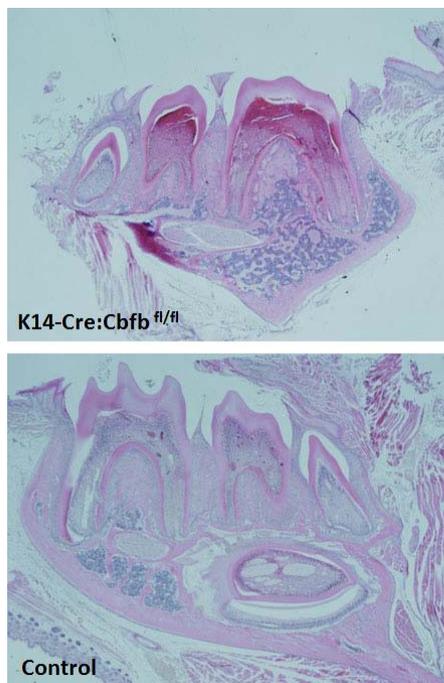


図4 **Cbfb** 変異マウス臼歯の HE 像 (2w)

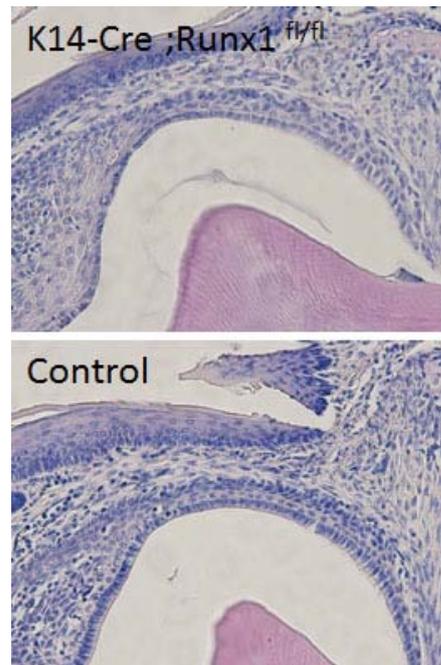


図5 **Runx1** 変異マウス臼歯の HE 像 (E18)

組織学的に検討したところ、**Runx1** 変異マウスでは、エナメル芽細胞様の細胞は観察されるものの、極性が消失していた(図5)。また、唾液腺においても、腺の分化に **Runx** シグナルが上皮で重要な役割をはたし、様々なシグナル分子の発現を調節していることを見出した。

#### 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11件)

- ①Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Hayano S, Balam TA, Naruse K, Yamashiro T. Ex vivo real-time observation of Ca(2+) signaling in living bone in response to shear stress applied on the bone surface. Bone. 2013 Mar;53(1):204-15. PubMed PMID: 23246671.
- ②Tomita N, Hattori T, Itoh S, Aoyama E, Yao M, Yamashiro T, Takigawa M. Cartilage-Specific Over-Expression of CCN Family Member 2/Connective Tissue Growth Factor (CCN2/CTGF) Stimulates

- Insulin-Like Growth Factor Expression and Bone Growth. *PLoS One*. 2013;8(3):e59226. PubMed PMID: 23555635; PubMed Central PMCID: PMC3610707.
- ③ Sugawara Y, Kamioka H, Ishihara Y, Fujisawa N, Kawanabe N, Yamashiro T. The early mouse 3D osteocyte network in the presence and absence of mechanical loading. *Bone*. 2013 Jan;52(1):189-96. PubMed PMID: 23044047.
- ④ Honjo T, Kubota S, Kamioka H, Sugawara Y, Ishihara Y, Yamashiro T, Takigawa M, Takano-Yamamoto T. Promotion of Ccn2 expression and osteoblastic differentiation by actin polymerization, which is induced by laminar fluid flow stress. *J Cell Commun Signal*. 2012 Dec;6(4):225-32. PubMed PMID: 22956334; PubMed Central PMCID: PMC3497897.
- ⑤ Fukushima H, Kawanabe N, Murata S, Ishihara Y, Yanagita T, Balam TA, Yamashiro T. SSEA-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells. *J Dent Res*. 2012 Oct;91(10):955-60. PubMed PMID: 22895512.
- ⑥ Kamioka H, Kameo Y, Imai Y, Bakker AD, Bacabac RG, Yamada N, Takaoka A, Yamashiro T, Adachi T, Klein-Nulend J. Microscale fluid flow analysis in a human osteocyte canaliculus using a realistic high-resolution image-based three-dimensional model. *Integr Biol (Camb)*. 2012 Oct;4(10):1198-206. PubMed PMID: 22858651.
- ⑦ Hayano S, Kurosaka H, Yanagita T, Kalus I, Milz F, Ishihara Y, Islam MN, Kawanabe N, Saito M, Kamioka H, Adachi T, Dierks T, Yamashiro T. Roles of heparan sulfate sulfation in dentinogenesis. *J Biol Chem*. 2012 Apr 6;287(15):12217-29. PubMed PMID: 22351753; PubMed Central PMCID: PMC3320973.
- ⑧ Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Kurosaka H, Naruse K, Yamashiro T. In situ imaging of the autonomous intracellular Ca(2+) oscillations of osteoblasts and osteocytes in bone. *Bone*. 2012 Apr;50(4):842-52. PubMed PMID: 22316656.
- ⑨ Kawanabe N, Murata S, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Yanagita E, Ono M, Kurosaka H, Kamioka H, Itoh T, Kuboki T, Yamashiro T. Stage-specific embryonic antigen-4 identifies human dental pulp stem cells. *Exp Cell Res*. 2012 Mar 10;318(5):453-63. PubMed PMID: 22266579.
- ⑩ Fukunaga T, Honjo T, Sakai Y, Sasaki K, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. A case report of multidisciplinary treatment of an adult patient with bilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate Craniofac J*. 2011 Nov 8;PubMed PMID: 22066976.
- ⑪ Kurosaka H, Islam MN, Kuremoto K, Hayano S, Nakamura M, Kawanabe N, Yanagita T, Rice DP, Harada H, Taniuchi I, Yamashiro T. Core binding factor beta functions in the maintenance of stem cells and orchestrates continuous proliferation and differentiation in mouse incisors. *Stem Cells*. 2011 Nov;29(11):1792-803. PubMed PMID: 21898689.
- ⑫ Sugawara Y, Ando R, Kamioka H, Ishihara Y, Honjo T, Kawanabe N, Kurosaka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. The three-dimensional morphometry and cell-cell communication of the osteocyte network in chick and mouse embryonic calvaria. *Calcif Tissue Int*. 2011 May;88(5):416-24. PubMed PMID: 21340572.
- [学会発表] (計5件)
- ① 山城隆.  
Cbfb は切歯の上皮幹細胞の維持と、増殖と分化の領域形成に關与する。  
サテライトシンポジウム 3・歯の幹細胞を考える。  
第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会,  
2011 年 9 月 30 日, 岐阜。
- ② Yamashiro T.  
Core binding factor  $\beta$  (Cbf  $\beta$ ) functions in the maintenance of stem cells and orchestrates continuous proliferation and differentiation in mouse incisors. 18<sup>th</sup> International RunxWorkshop, Aug. 15, 2011, San Diego, USA.
- ③ Kurosaka H, Islam MN, Kuremoto K, Hayano S, Nakamura M, Kawanabe

N, Yanagita T, Rice DP, Harada H, Taniuchi I, Yamashiro T.

Core binding factor beta (Cbfb) functions in the maintenance of stem cells and orchestrates continuous proliferation and differentiation in mouse incisors.

Gordon Research Conference on Bones and Teeth, June 19-24, 2011, Les Diablerets, Switzerland.

- ④Kawanab N, Fukushim H, Murata S, Ishihara Y, Yanagit T, Balam TA, Yamashiro T.

Stage-specific embryonic antigen-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells.

34<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Bone and Mineral Research, Oct. 12-15, 2012, Minneapolis, USA.

- ⑤ Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Naruse K, Yamashiro T.

Live imaging of fluid flow-induced Ca<sup>2+</sup> signaling of osteoblasts and osteocytes in bone: implications for gap junctional intercellular communication.

34<sup>th</sup>Annual Meeting of the American society of bone and mineral research, Oct. 12-15, 2012, Minneapolis, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本城 正 (TADASHI HONJO)

鳥取大学・医学部付属病院・助教

研究者番号 : 10379844

### (2) 研究分担者

山城 隆 (TAKASHI YAMASHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 70294428

上岡 寛 (HIROSHI KAMIOKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・準教授

研究者番号 : 80253219

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :