

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592771

研究課題名(和文) 骨芽細胞と象牙芽細胞の突起形成における Runx2 と関連因子の分子形態学的機能解析

研究課題名(英文) Molecular morphological examination about the formation of processes in the osteoblasts and odontoblasts

研究代表者

宮崎 敏博 (MIYAZAKI, Toshihiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：10174161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、骨芽細胞と象牙芽細胞の突起形成機序を明らかにすることである。本研究期間内には、特に、野生型マウスと突起構造が欠如したトランスジェニックマウスとの間でマイクロアレイによる変動遺伝子解析を行うことにより、アルツハイマー病の原因遺伝子として知られている微小管関連タンパクの一種であるタウ蛋白質が象牙芽細胞における有力な突起形関連遺伝子として同定された。すなわち、タウ蛋白質は野生型マウスの象牙芽細胞、特に象牙線維(突起)に特異的に局在しており、象牙芽細胞の突起形成に深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to examine the mechanism of the formation of processes in the osteoblasts and odontoblasts. We have demonstrated using microarray and Real-time PCR analyses that microtubule-associated protein tau (Mapt), a neuronal phosphoprotein, is highly expressed in wild-type mouse molars but its expression is severely reduced in Tg(Coll1a1-Runx2) mouse molars, in which odontoblasts lose their characteristic polarized morphology including a long process extending to dentin. Furthermore, immunohistochemical analysis showed that Mapt was exclusively localized in terminally differentiated odontoblasts including their processes in wild-type molars and was ultrastructurally present around the α -tubulin-positive filamentous structures. This result indicates that Mapt may be an important factor for odontoblast morphogenesis and is a useful marker protein for evaluating the terminal differentiation of odontoblasts in mice.

研究分野：口腔組織学

キーワード：タウ蛋白質 象牙芽細胞 Runx2 マイクロアレイ 免疫組織化学 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

Runx2 は骨芽細胞分化において必須の転写因子である。我々の研究グループは、*Col1a1* プロモーターを用いて、骨芽細胞と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)*] マウスを作製し、骨芽細胞と象牙芽細胞の分化過程における Runx2 の機能解析を行ってきた。以下にその成果を得てきた。すなわち、Runx2 は、1) 骨芽細胞の後期分化を抑制すること (Liu et al., *J Cell Biol* 155:157-166, 2001; Kanatani et al., *Dev Biol* 296:48-61, 2006)、2) 歯牙形成においては前象牙芽細胞までは発現するが (D' Souza et al., *Development* 126:2911-2920, 1999; Aberg et al., *Dev Biol*, 270:76-93, 2004)、その後の発現は象牙芽細胞への分化を抑制して骨芽細胞へ形質転換させることを明らかにした (Miyazaki et al., *Arch Histol Cytol* 71:131-146, 2008)。

骨芽細胞と象牙芽細胞は、分化・成熟過程で基質側に突起を形成し、骨芽細胞は骨細胞ネットワークと連絡し、象牙芽細胞はトームス線維と呼ばれる長い突起をエナメル象牙境まで伸ばして痛覚受容に関与すると考えられている。そこで我々は、*Tg(Col1a1-Runx2)* マウスにおける骨芽細胞と象牙芽細胞の形態について電子顕微鏡解析を行い、*Tg(Col1a1-Runx2)* マウスの骨芽細胞と象牙芽細胞は、いずれも突起構造が失われていること、すなわち、Runx2 の発現により骨芽細胞と象牙芽細胞における突起形成が阻害されていることが明らかになった (Miyazaki et al., *J Electr Microscop Technol Med Biol* 23:50, 2010)。両細胞の突起構造は、基質形成や細胞間の情報伝達による骨・象牙質の機能維持等に重要な構造であることは明確であるが、いまだにそれらの形成メカニズムについては十分に解明されてきていない。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、骨芽細胞と象牙芽細胞のそれぞれに特有の突起構造について、その形成メカニズムを解明することである。本研究においては、Runx2 と骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカー分子について、免疫組織化学的に突起構造と発現パターンとの関連解析を行うとともに、突起構造が失われた *Tg(Col1a1-Runx2)* マウスを用いて、マイクロアレイ、Real time PCR, in situ hybridization 等により野生型マウスとの遺伝子発現比較を行い、突起形成関連分子の検索を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) Runx2、および骨芽細胞・象牙芽細胞分化マーカーの発現と突起形成過程との関連性に関する免疫組織化学的解析

細胞分化がさかんな生後 0 日から 2 週齢までの野生型マウスを用い、骨芽細胞については大腿骨と下顎骨、象牙芽細胞は下顎臼歯歯胚を対象とした。

基本的に、光学顕微鏡観察用には 4% paraformaldehyde 固定液、電子顕微鏡観察用には 0.1% glutaraldehyde- 4% paraformaldehyde 固定液を用い、灌流固定後、通法により、それぞれパラフィン包埋、LR-white 包埋して切片を作製して、各種免疫組織化学を行った。

解析した因子は、骨形成関連転写因子として Runx2 と Osterix、細胞分化マーカーとして、未熟骨芽細胞に発現するオステオポンチン(OP)、成熟骨芽細胞に発現するオステオカルシン(OC)、象牙芽細胞分化マーカーである中間径フィラメント・ネスチン(Nestin) と象牙質シアロリントタンパク(DSPG) を対象とし、それぞれの抗体を用いて免疫組織化学を行った。

(2) *Tg(Col1a1-Runx2)* マウスにおける変動遺伝子の検索

マイクロアレイ解析は、2週齢の野生型および *Tg(Col1a1-Runx2)* マウスの下顎から歯胚と下顎骨を分離し、それぞれについて ISOGEM を用いて RNA を抽出・精製後、Agilent SurePrint G3 Mouse Gene Expression Microarray 8x60K (Agilent Technologies, USA) を用いて行った。

マイクロアレイ解析により変動が認められた遺伝子の中から、突起形成に関連する可能性が示唆される遺伝子を絞り込み、1) Real-time PCR による発現の再現性の確認、および、2) 免疫組織化学による組織内局在の検索を行った。

4. 研究成果

(1) Runx2 と骨芽細胞・象牙芽細胞の分化マーカーの発現と突起形成との関連性に関して、突起形成前の骨芽細胞における Runx2 と OP の発現と突起形成開始後における Runx2 と OP の発現の減少、象牙芽細胞の突起形成に伴う Runx2 発現の減少と DSPG、Nestin の発現上昇が明らかになった。Osterix、および OC の発現と突起形成との関連については、今回の研究期間内で明確にすることは出来なかった。

(2) *Tg(Col1a1-Runx2)* マウスと突起構造を持つ野生型マウスとの間で、マイクロアレイによる変動発現遺伝子を検索し、今回、特に細胞骨格関連因子に焦点を当てて解析を行った結果、骨芽細胞に関しては未だ同定するに至っていないが、象牙芽細胞について、アルツハイマー病の原因遺伝子として知られている微小管関連蛋白質の一種であるタウ蛋白質(Mapt: Microtubule-associated protein tau) が有力な突起形成関連遺伝子として同定された。すなわち、

Maptは、野生型マウスと比較して、*Tg(Col1a1-Runx2)*マウスの歯胚において顕著に発現が減少していた。MaptについてReal time PCRにより発現の再現性を確認し(図1)、さらに免疫組織化学で局在を検索した結果、1) タウ蛋白質は野生型マウスにおいて象牙芽細胞の最終分化とともに特異的に発現し、微細構造的には、特に象牙線維(突起)の微小管に沿ってチューブリンとともに局在しており(図2, 3)、2) 突起を持たない*Tg(Col1a1-Runx2)*マウスの象牙芽細胞では顕著な発現減少が認められた。この象牙芽細胞特異的なMaptの発現と局在は、従来知られている象牙芽細胞分化マーカーであるDSPPやNestinと非常に良く一致していた。

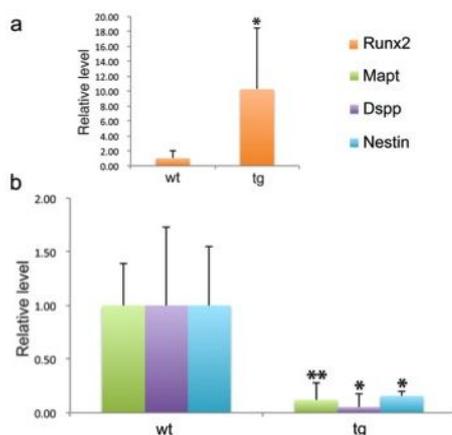


図1 生後2週齢のマウス臼歯におけるMapt、nestin、Dspp、およびRunx2のRT-PCR解析。Wt: wild-type、tg: *Tg(Col1a1-Runx2)*
* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ vs. wild-type mice
(Cell and Tissue Research, 2015, DOI 10.1007/s00441-015-2135-6)

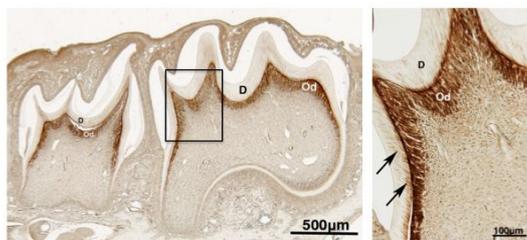


図2 生後2週齢のマウス臼歯におけるタウ蛋白(Mapt)の免疫組織化学。右写真は左写真枠内の拡大像。Od: 象牙芽細胞; D: 象牙質

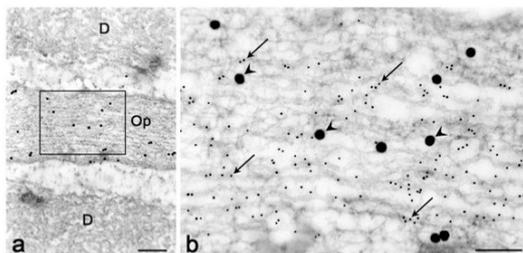


図3 生後2週齢野生型マウス臼歯の象牙芽細胞突起におけるMapt (40-nm gold particles: 矢頭) と α -tubulin (10-nm gold particles: 矢印) の局在。D: 象牙質基質; Op: 象牙芽細胞突起。bはaの枠内の拡大。スケール= 0.5 μ m (a), 0.2 μ m (b)。 (Cell and Tissue Research, 2015, DOI 10.1007/s00441-015-2135-6)

以上のように、本研究により、象牙芽細胞や骨芽細胞の特有の突起形成を伴う最終分化において、Runx2の発現はダウンレギュレートされる必要がある事が明確になった。特に象牙芽細胞においては、Runx2の発現減少とともに、象牙芽細胞の最終分化マーカーであるDSPP、Nestin、およびMaptが発現し、突起形成を伴う形態形成が開始される事が証明された。Maptが象牙芽細胞の最終分化マーカーになり得ることは本研究が初めて明らかにしたと考えられ、今後の象牙芽細胞分化の研究に大いに貢献するものである。

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)

- (1) T.Miyazaki, T.T.Baba, M.Mori, T.Moriishi, T.Komori: Microtubule-associated protein tau (Mapt) is expressed in terminally differentiated odontoblasts and severely down-regulated in morphologically disturbed odontoblasts of Runx2 transgenic mice. Cell and Tissue Research, 2015, DOI 10.1007/s00441-015-2135-6. (査読有)
- (2) C.A.Yoshida, T.Moriishi, T.Miyazaki, T.Komori (他9名、5番目): Overexpression of Galnt3 in chondrocytes resulted in dwarfism due to the increase of mucin-type O-glycans and reduction of glycosaminoglycans. J. Biol. Chem. 289(38): 26584-26596, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.555987. (査読有)
- (3) K.Ito, Z.Maruyama, A.Sakai, S.Izumi, T.Moriishi, C.A.Yoshida, T.Miyazaki, H.Komori, K.Takada, H.Kawaguchi, T.Komori: Overexpression of Cdk6 and Ccnd1 in chondrocytes inhibited chondrocyte maturation and caused p53-dependent apoptosis without enhancing proliferation. Oncogene 33(14): 1862-1871, 2014, DOI 10.1038/onc.2013.130. (査読有)
- (4) K.Mizuhashi, T.Moriishi, T.Miyazaki, T.Komori, T.Furukawa (他5名、5番目): Filamin-interacting proteins, Cfm1 and Cfm2, are essential for the formation of cartilaginous skeletal elements. Human Molecular Genetics 23(11):2953-2967, 2014, DOI 10.1093/hmg/ddu007. (査読有)

- (5) T.Kawane, H.Komori, W.Liu, T.Moriishi, T.Miyazaki, M.Mori, Y.Matsuo, Y.Takada, S.Izumi, Q.Jiang, R.Nishimura, Y.Kawai, T.Komori: Dlx5 and Mef2 regulate a novel Runx2 enhancer for osteoblast-specific expression. *Journal of Bone and Mineral Research* 29(9): 1960-1969, 2014, DOI 10.1002/jbmr.2240. (査読有)
- (6) Y.Okada, T.Miyazaki, R.Fujiyama, K.Toda: Wing (Ib) cells in frog taste discs detect dietary unsaturated fatty acids. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 166: 434-440, 2013, DOI 10.1016/j.cbpa.2013.07.016. (査読有)
- (7) T. Miyazaki, M. Mori, C. A. Yoshida, C. Ito, K. Yamatoya, T. Moriishi, Y.Kawai, H. Komori, T. Kawane, S.Izumi, K.Toshimori, T.Komori: Galnt3 deficiency disrupts acrosome formation and leads to oligoasthenoteratozoospermia. *Histochem Cell Biol* 139:339-354, 2013, DOI 10.1007/s00418-012-1031-3. (査読有)
- (8) T.T.Baba, Y.Ohara-Nemoto, T. Miyazaki, T.K.Nemoto: Involvement of geranylgeranylation of Rho and Rac GTPases in adipogenic and RANKL expression, which was inhibited by simvastatin. *Cell Biochemistry and Function* 31(8): 652-659, 2013, DOI 10.1002/cbf.2951. (査読有)
- (9) T.Moriishi, R.Fukuyama, M.Ito, T.Miyazaki, T.Maeno, Y.Kawai, H.Komori, T.Komori: Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and sost in Osteocytes at unloading. *PLoS ONE* 7(6): e40143, 2012, DOI 10.1371/journal.pone.0040143, (査読有)
- (10) C.A.Yoshida, H.Komori, Z.Maruyama, T.Miyazaki, K.Kawasaki, T.Furuichi, R.Fukuyama, M.Mori, K.Yamana, K.Nakamura, W.Liu, S.Toyosawa, T.Moriishi, H.Kawaguchi, K.Takada, T.Komori: Sp7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS ONE* 7(3): e32364, 2012, DOI 10.1371/journal.pone.0032364, (査読有)
- (11) Y.Wang, W.Liu, R.Masuyama, R.Fukuyama, M.Ito, Q.Zhang, H.Komori, T.Murakami, T.Moriishi, T.Miyazaki, R.Kitazawa, C.A.Yoshida, Y.Kawai, S.Izumi, T.Komori: Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. *Bone* 50(1): 409-419, 2012, DOI 10.1016/j.bone.2011.07.012, (査読有)
- [学会発表](計4件)
- (1) 井上真愛弥, 宮崎敏博, 馬場友巳, 小守壽文: 象牙芽細胞後期分化過程での Osterix過剰発現は, 象牙芽細胞の成熟を抑制し基質産生能を低下させる, 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014年9月26日, 福岡国際会議場(福岡)
- (2) 秦昕, 松尾友紀, 姜晴, 森石武史, 六反田賢, 宮崎敏博, 小守壽文: Cbfbは軟骨細胞分化・増殖および骨芽細胞分化に必要である, 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014年9月27日, 福岡国際会議場(福岡)
- (3) H.Komori, T.Miyazaki, C.Yoshida, T.Komori: Overexpression of Sp7 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation but enhances angiogenesis in bone. ECTS 2014 (41st European Calcified Tissue Society Congress), Czech Republic, May, 2014
- (4) 小守 寿人, 宮崎 敏博, 森石 武史: Sp7による骨芽細胞分化機構と自己プロモーター制御, 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013年9月21日, 岡山コンベンションセンター(岡山)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
宮崎 敏博 (MIYAZAKI, Toshihiro)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授
研究者番号: 10174161
- (2) 研究分担者
森石 武史 (MORIISHI, Takeshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
研究者番号: 20380983
- (3) 研究分担者
馬場 友巳 (BABA, Tomomi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
研究者番号: 60189727
- (4) 連携研究者
小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授
研究者番号: 00252677