

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11335

研究課題名(和文) 鎖骨頭蓋異形成症における骨吸収メカニズムの解明に向けたRunx2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Runx2 in bone resorption in the animal model of Cleidocranial dysplasia

研究代表者

福永 智広 (FUKUNAGA, Tomohiro)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70362994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：鎖骨頭蓋異形成症は、Runx2を原因遺伝子とする常染色体性優性遺伝形式を示す先天異常であるが、同症患者の歯の移動に関する詳細は不明である。本研究では、鎖骨頭蓋異形成症の病態モデルであるRunx2ヘテロ欠損マウスを用いて実験的歯の移動実験を行ったところ、Runx2ヘテロ欠損マウスは、野生型マウスに比べて歯の移動距離と歯の移動による類骨形成が遅延、低下していた。さらに、Runx2ヘテロ欠損マウス由来骨髄間質細胞に機械的伸展力を負荷すると、野生型マウス由来細胞に比べて、伸展によるDNA量、ALP活性、カルシウム産生量、OSC遺伝子の発現が遅延し低下していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Cleidocranial dysplasia (CCD) is caused by mutations of RUNX2. However, the mechanism of orthodontic tooth movement in CCD patients has not been clarified. We examined the amount of experimental tooth movement in hetero mice deficient in RUNX2 gene (hetero KO mice), the animal model of CCD. Compared to wild-type mice, the hetero KO mice exhibited delayed experimental tooth movement, and osteoid formation. Moreover, we applied continuous mechanical tensile force to bone marrow stromal cells (BMSCs) as an in vitro model of the tension side of tooth movement. Runx2 hetero deficiency delayed tensile force-induced increase of DNA content in BMSCs, and also delayed and reduced tensile force-induced ALP activity, calcium content, and OSC mRNA expression of BMSCs in osteogenic medium compared to wild-type BMSCs.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯学 歯の移動 先天異常 Runx2

1. 研究開始当初の背景

鎖骨頭蓋異形成症は、常染色体性優性遺伝形式を示す先天異常であり、全身症状として、鎖骨の消失または形成不全、泉門閉鎖遅延、などが観察される。口腔内では、永久歯の著しい萌出遅延、多数歯埋伏、歯の移動遅延等が認められるため矯正歯科治療が必要となることが多いが、治療は非常に困難である。鎖骨頭蓋異形成症の原因遺伝子として、骨芽細胞の分化に必須の転写因子である Runx2 が同定されているが、鎖骨頭蓋異形成症の口腔・顎顔面の異常に関する分子レベルでの病態や最良の治療法については未だ解明されていない。

2. 研究の目的

鎖骨頭蓋異形成症患者の歯の移動遅延の原因を分子レベルで解明するために、鎖骨頭蓋異形成症の病態モデルである Runx2 ヘテロ欠損マウスを用いて、実験的歯の移動実験ならびに培養細胞を用いた in vivo, in vitro での分子メカニズムの解析を行う。

3. 研究の方法

(1) マウス実験的歯の移動モデルの作成

野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスの上顎切歯に、直径 0.012 インチのニッケル・チタン製ワイヤーを装着し、10g の荷重が水平的かつ持続的に加わるように調節して上顎右側第一臼歯を口蓋側へ移動させた。左側第一臼歯はコントロールとした。実験的歯の移動開始から 3, 7, 10, 14, 21 日後に麻酔下で、シリコン印象材を用いて上顎印象を採取し、この印象に歯科用超硬石膏を注入した。得られた石膏模型を用いて上顎左右側第一臼歯口蓋咬頭間距離を計測し、歯の移動量を計測した。

(2) 野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスの実験的歯の移動時における骨リモデリング様相の観察

実験的歯の移動開始から 3, 7, 14 日後に野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスを全身麻酔下で 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。上顎骨を摘出後、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)にて脱灰後、上昇エタノール系列およびキシレンによる脱水処理を行い、パラフィン包埋した。ミクロトーム(Leica, Germany)を用い、厚さ 5 μ m の水平断連続切片を作成した。歯周組織における骨リモデリング様相を観察するために、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、類骨形成量を計測した。

(3) 野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウス由来初代培養細胞におけるメカニカルストレス負荷時の細胞増殖、細胞分化の解析

細胞の培養とメカニカルストレスの負荷
野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスを全身麻酔下で屠殺後、大腿骨および脛骨を取り出

し、軟組織を除去後、骨髄細胞を分離した。セルストレイナーでろ過後、10%牛胎仔血清(FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシン含有 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)を用いて培養した。培養 4 日目で浮遊細胞を除去し、3 日後、ディッシュ底面に付着した細胞を骨髄間質細胞とした。骨髄間質細胞をシリコンエラストマー製チャンバー(ストレッチチャンバー)に播種した。細胞がサブコンフルエントになるまで培養し、伸展装置でシリコンチャンバーを 12% 伸展させた。また、骨分化誘導培地には、上記培養液にデキサメタゾン、アスコルビン酸、グリセロリン酸を添加した。

細胞増殖の検討

細胞を採取後、5 秒間超音波処理を行い、10000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心し、上清の DNA 量を測定した。DNA は Quant-iT PicoGreen (Invitrogen)を用いて添付文書に従い測定した。蛍光測定は Infinite F200 (Tecan)を用いて 485/535 nm で行った。

ALP 活性およびカルシウム産生量の測定

細胞を「細胞増殖の検討」と同様に処理し、上清は ALP 活性測定に用い、ペレットはカルシウム量測定に用いた。ALP 活性測定では、10 倍希釈した上清に塩化マグネシウムおよび p-ニトロフェニルリン酸を添加し、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベート後、塩酸で反応を停止させ、Infinite F200 を用い 405nm の吸光度で測定した。カルシウム量測定では、ペレットに塩酸を添加し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間インキュベートし、遠心後の上清を用いて、QuantiChrom Calcium Assay Kit (Bioassay Systems)により測定した。尚、ALP 活性およびカルシウム量は DNA 量で補正した。

定量的 RT-PCR

TRIzol reagent (Invitrogen)を用い、添付文書に従いトータル RNA を抽出し、トータル RNA から complementary DNA (cDNA)を合成した。オステオカルシン(OSC)遺伝子の発現を、Thermal Cycler Dice Real Time System (Takara Bio. Inc.) を使用して、定量的 RT-PCR を用いて測定した。OSC 遺伝子の発現量は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量に対する相対値で比較した。

4. 研究成果

(1) 野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスの実験的歯の移動距離について

野生型マウスにおいて、実験的歯の移動距離は歯の移動開始後 3 日目で移動開始後 0 日目に比べて増加したが、移動開始後 7 日目では移動開始後 3 日目に比べ大きな変化は認められなかった。その後、移動開始後 7 日目から 10 日目にかけて大きく増加した。Runx2 ヘテロ欠損マウスでは、実験的歯の移動距離は移動開始後 3 日目で移動開始後 0 日目に比べて増加したが、歯の移動開始後 3 日目以降に大きな増加は認められなかった。その結果、実

験的歯の移動開始から 7 日目までは野生型、Runx2 ヘテロ欠損マウスにおける歯の移動距離は同様であったが、10 日目以降では野生型マウスに比べて Runx2 ヘテロ欠損マウスの歯の移動距離は少なかった。

(2) 野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスの実験的歯の移動時における骨リモデリング様相について

野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスの上顎第一臼歯遠心根の牽引側の組織切片を用い、HE 染色により類骨形成を評価した。その結果、野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスともに実験的歯の移動開始後 3 日目には薄く類骨が認められ、その類骨層は歯の移動開始後 7 日目にかけて増加していた。野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウスの類骨は歯の移動開始後 0 日目では同様であったが、歯の移動開始後 3 日目から 7 日目には Runx2 ヘテロ欠損マウスの類骨は野生型マウスに比べて減少していた。

(3) 野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウス由来初代培養細胞におけるメカニカルストレス負荷時の細胞増殖、細胞分化について

野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウス由来骨髄間質細胞に機械的伸展力を負荷し、DNA 量を測定した。その結果、非伸展群の野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウス由来細胞はともに伸展開始後 0 時間から緩やかに DNA 量が増加していた。一方、伸展群では、野生型マウスは、非伸展群に比べて伸展後、著しい DNA 量の増加が認められたが、Runx2 ヘテロ欠損マウス由来細胞では、伸展後の DNA 量増加が遅延していた。

次に、野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウス由来骨髄間質細胞を骨分化誘導培地で培養後、機械的伸展力を負荷し、ALP 活性およびカルシウム産生量を測定した。その結果、非伸展群では、野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウス由来細胞の ALP 活性はともに伸展開始から緩やかに上昇した。一方、機械的伸展力を負荷すると、野生型マウス由来細胞では非伸展群に比べて著しい ALP 活性の上昇を認められたが、Runx2 ヘテロ欠損マウス由来細胞では、伸展後の ALP 活性の上昇は減少し遅延していた。カルシウム産生量は、非伸展群では、野生型および Runx2 ヘテロ欠損マウス由来細胞とともに機械的伸展力負荷開始から増加が認められた。伸展群では、野生型マウス由来細胞のカルシウム産生量は、伸展力を負荷した後、非伸展群に比べて増加したが、Runx2 ヘテロ欠損マウス由来細胞では、野生型マウス由来細胞に比べて、カルシウム産生量の増加は減少し遅延していた。

さらに、定量的 RT-PCR 解析の結果、OSC 遺伝子の発現は、野生型マウス由来細胞では、機械的伸展力を負荷すると、非伸展群に比べて、上昇を認めた後、減少していたが、Runx2 ヘテロ欠損マウス由来細胞では、OSC 遺伝子

の発現は、野生型マウス由来細胞に比べて、機械的伸展力による上昇が減少し遅延していた。

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 8 件)

Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Fatameh G, Fukunaga T, Seiryu M, Daimaruya T, Takeshita N, Kamioka H, Adachi T, Ida H, Mayama A: Synergistic acceleration of experimental tooth movement by supplementary high-frequency vibration applied with a static force in rats, Scientific Reports, 査読有, 7, 2017, 13969. DOI: 10.1038/s41598-017-13541-7

Takano-Yamamoto T, Fukunaga T, Takeshita N: Gene Expression Analysis of CCN Protein in Bone Under Mechanical Stress, Methods in Molecular Biology, 査読無, 1489, 2017, 283-308

清流正弘、福永智広、北浦英樹、山本照子: 歯科矯正用アンカースクリューを用いた矯正歯科治療および臨床研究、東北矯正歯科学会雑誌、査読無、25、2017、49-53

福永智広、川津正慶、後藤まき、北浦英樹、山本照子: 東北大学病院矯正歯科に来院した患者の不正咬合と歯肉炎との関係、東北矯正歯科学会雑誌、査読無、24、2016、51-54

川津正慶、福永智広、後藤まき、木村晴地、坂本麻由里、宍戸香、北浦英樹、山本照子: 東北大学病院矯正歯科を受診した初診患者の歯肉炎の程度に関する実態調査、東北大学歯学雑誌、査読有、34・35、2016、27-31

佐々木紀代、清流正弘、福永智広、出口徹、北浦英樹、竹下信郎、山本照子: Genioplasty を併用した外科的矯正治療による顎顔面形態の変化に伴う顎口腔機能の改善をみた骨格性下顎前突症例、東北大学歯学雑誌、査読有、34・35、2016、32-43

Izawa T, Rohatgi N, Fukunaga T, Wang QT, Silva MJ, Gardner MJ, McDaniel ML, Abumrad NA, Semenkovich CF, Teitelbaum SL, Zou W: ASXL2 Regulates Glucose, Lipid, and Skeletal Homeostasis, Cell Reports, 査読有, 11(10), 2015, 1625-1637, DOI: 10.1016/j.celrep.2015.05.019.

Fukunaga T, Zou W, Rohatgi N, Colca JR, Teitelbaum SL: An insulin-sensitizing thiazolidinedione, which minimally activates PPAR, does not cause bone loss,

Journal of Bone and Mineral Research, 査読有, 30(3), 2015, 508-515, DOI: 10.1002/jbmr.2364.

〔学会発表〕(計9件)

青沼智、玉村長都、福永智広、酒井雄一、北浦英樹、竹下信郎、山城隆、山本照子：Runx2^{+/-}マウスの矯正的歯の移動の牽引側における骨芽細胞の増殖および分化のRunx2/mTORC2シグナルの役割、第76回日本矯正歯科学会学術大会、2017年10月18日 - 20日、札幌市

吉澤光弘、福永智広、清流正弘、黒木毅、宮島悠旗、山本照子：歯科矯正用アンカースクリューを併用して上顎骨前方牽引を行った骨格性III級症例、第76回日本矯正歯科学会学術大会、2017年10月18日 - 20日、札幌市

青沼智、福永智広、北浦英樹、竹下信郎、山城隆、山本照子：Runx2^{+/-}マウスの矯正的歯の移動の牽引側における骨芽細胞の増殖および分化機構にRunx2/mTORC2シグナルが関与する、第35回日本骨代謝学会学術集会、2017年7月27日 - 29日、福岡市

吉澤光弘、北浦英樹、福永智広、山本照子：歯科矯正用アンカースクリューを用いて水平的な咬合平面の傾斜を改善した正中離開症例、第33回東北矯正歯科学会大会、2017年5月13日 - 14日、秋田市

吉澤光弘、福永智広、松原琢磨、佐々木紀代、坂本麻由里、山本照子：メカニカルストレス下における骨細胞アポトーシスとp53、CCN2の関与、第75回日本矯正歯科学会大会、2016年11月7日 - 9日、徳島市

則松佑佳、福永智広、宮島悠旗、山本照子：歯科矯正用アンカースクリューを用いた前歯部クロスバイトを伴う骨格性下顎前突症例、第32回東北矯正歯科学会大会、2016年5月14日 - 15日、盛岡市

山田雅一、出口徹、青沼智、福永智広、山本照子：歯科矯正用アンカースクリューを固定源に用いて、下顎歯列の遠心移動を行った骨格性下顎前突症例、第32回東北矯正歯科学会大会、2016年5月14日 - 15日、盛岡市

川津正慶、福永智広、宮島悠旗、山本照子：歯科矯正用アンカースクリューを固定源として、上下顎全歯列の遠心移動を行った骨格性I級上顎前突症例、第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月18日 - 20日、福岡市

岸川明子、竹下信郎、福永智広、山本照子：機能性の下顎偏位を伴うWilliams症候群患者における形態的・機能的所見、第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月18日 - 20日、福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福永 智広 (FUKUNAGA, Tomohiro)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70362994

(2) 研究分担者

山本 照子 (TAKANO-YAMAMOTO, Teruko)

東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授

研究者番号：00127250

北浦 英樹 (KITAURA, Hideki)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：60295087

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()