

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20638

研究課題名(和文)鎖骨頭蓋異形成症の歯の移動遅延解明を目的としたRunx2ストレス応答機構解析

研究課題名(英文)Analysis of the response mechanism of Runx 2 in tooth movement delay in cleidocranial dysplasia

研究代表者

坂東 加南 (BANDO, Kanan)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：20772198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Runx2 は、骨形成に必要な骨芽細胞および軟骨細胞分化の必須転写因子であるとともに、鎖骨頭蓋異形成症の原因遺伝子として知られている。鎖骨頭蓋異形成症病態モデルであるRunx2ヘテロノックアウトマウスは、メカニカルストレス応答が低下し、骨芽細胞分化促進の低下が生じている可能性がある。そこで、本研究では、Runx2ヘテロノックアウトマウスに実験的歯の移動を行い、歯の周囲の関連因子を検討した。Runx2ヘテロノックアウトマウスでは、歯の移動距離だけでなく、炎症性サイトカインおよび細胞浸潤の低下が認められた。

研究成果の概要(英文)：Runx2 is an essential transcription factor for osteoblast and chondrocyte differentiation necessary for osteogenesis and is known as a causative gene for cleidocranial dysplasia. The Runx2 hetero knockout mouse, which is a model of the cleidocranial dysplasia, may have a decreased mechanical stress response and a decreased promotion of osteoblast cell differentiation. Therefore, in this study, experimental teeth were moved to Runx2 hetero knockout mice and related factors around the teeth were examined. In Runx2 hetero knockout mice, not only the distance of tooth movement but also the reduction of inflammatory cytokines and cell infiltration was observed.

研究分野：医師薬学

キーワード：鎖骨頭蓋異形成症 Runx2

1. 研究開始当初の背景

Runx2 は、骨形成に必要な骨芽細胞および軟骨細胞分化の必須転写因子であるとともに、鎖骨頭蓋異形成症の原因遺伝子として知られている(Komori *et al. Cell* 1997)。Runx2 遺伝子改変マウスとして、Runx2 過剰マウスは変形性関節症マウスモデルとして、Runx2 ホモノックアウトは骨粗鬆症モデルマウスとして知られ、骨芽細胞や軟骨細胞の分化・成熟について多数の研究報告がされている。一方、Runx2 ヘテロノックアウトマウスは、鎖骨の低形成、頭蓋縫合部の膜性骨化不全や歯の萌出遅延などの鎖骨頭蓋異形成患者と類似した特徴をもち、同症候群のモデルマウスとして知られているが(Otto *et al. Cell* 1997)、ごくわずかな研究報告しかなく、とくに、同マウスを用いたメカニカルストレス下における Runx2 の機能解析について全くない。Runx2 ヘテロノックアウトマウスを用いたメカニカルストレス下の Runx2 の機能解析により、鎖骨頭蓋異形成症の口腔・顎顔面の異常の病態の解明を図ろうとする研究は申請者のほかには見られない。

Runx2 の遺伝子発現は、BMP、TGF- β などの分化増殖因子や IL-1 や TNF などの炎症性サイトカインの刺激によって、様々な経路を介して制御される(Park *et al. JBC* 2010)。しかし、Runx2 はそれ自身では、DNA 結合能は非常に弱く、cbf b とヘテロダイマーを形成してはじめて十分な DNA 結合能をもち、近年、多くの分子が Runx2 と結合することがわかり、Runx2 の機能解析がすすめられている。一方、Runx 2 はメカニカルストレスのセンサーとして働き骨芽細胞分化を促進することが報告されているが(Ziros *et al. JBC* 2002)、Runx2 メカノトランスダクションの分子機構解析はまだなされていない。

鎖骨頭蓋異形成症は遺伝性疾患であり、

全身的に骨化遅延が認められ、全身症状として、鎖骨の低形成や泉門閉鎖の遅延、口腔内異常所見として歯の萌出遅延、乳歯晩期残存、歯の形成不全、過剰歯や骨格性反対咬合が認められる。そのため、「厚生労働大臣が定める先天性疾患」として矯正歯科治療に健康保険が適応され、同症患者の矯正治療の対象となる。患者は歯の移動が遅延することが知られているが、その原因は明らかになっておらず、最良の矯正治療方法は確立されていない。

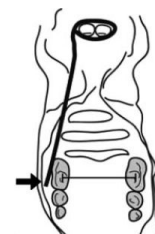
2. 研究の目的

本申請研究は、さらに研究を進展させて、メカニカルストレス応答性 Runx2 関連因子の抽出と Runx2 の機能解析、さらに Runx2 の転写機能解析と Runx2 標的遺伝子と作用部位の解析を行う。また、矯正による歯の移動は、歯を支えている歯槽骨のリモデリングによっておこり、牽引側における骨芽細胞による骨添加と、圧迫側における破骨細胞による骨吸収の双方が重要である。そのため、メカニカルストレスとして、伸展力だけでなく圧縮力による Runx2 のメカニカルストレス応答を明らかにする。メカニカルストレスによる Runx2 メカノトランスダクション機構の分子メカニズムを解析することで、鎖骨頭蓋異形成症患者の病態解明をめざし、最良の矯正歯科治療方法の新開発の基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 歯の移動モデル

Runx2 ヘテロノックアウトマウスまたはコントロールマウスを、申請者のグループで行ってきた、ニッケルチタンワイヤー(.014)を、光重合レジンを用いて上顎切歯に装着して固定源とし、上顎右側第一臼歯を頬側から口蓋側に移動させる、再現性の良い実験的歯の移動法を用いた。歯の移動距離は、歯の移動 0、



0.5、1、3、7、10、14、21 日後にシリコン印象を行い、超硬石膏を流し、模型を scan し、第一臼歯幅径を測定する。

(2) RNA 抽出および real time PCR による 遺伝子発現解析

歯の移動 0、0.5、1、3、7、10、14、21 日後の、牽引側と圧迫側の歯根膜組織、歯槽骨から該当する部分を採取し、組織を液体窒素で凍結・粉砕する。RNA は、まず RNAlater (Roche) で組織中 RNA を安定化後、QIAGEN RNeasy Mini kit を用いてトータル RNA を抽出した。トータル RNA 1 μ g を鋳型として、transcript First Strand cDNA synthesis kit を用いて、65 -5 分、50 -50 分、85 -5 分で逆転写反応を行い、complementary DNA(cDNA)を合成した。real time PCR は、applied biosystems 7500 real-time PCR system を使用し、2 μ l cDNA を鋳型として、Sso Fast Syber Green Supermix with ROX(Roche)を用いて行った。熱変性 95 -30 秒、アニーリング 95 -5 秒、さらに伸長反応 60 -32 秒を 40 サイクル行った。各遺伝子の mRNA 発現量は、GAPDH または 18S に対する相対値で計算した。

(3) ELISA 法による解析

タンパク質は、組織を lysing buffer (protease inhibitor cocktail, FBS, 1% Triton X-100 in RPMI1640)中にてホモジナイズ後、2 時間、室温にて静置し、10000rpm で 10 分間遠心を行い、上清を採取し、-80 に保存した。各タンパク濃度に合わせて、希釈を行い、ELISA 法にてタンパクレベルの解析を行った。

(4) 組織学的解析

歯の移動 0、0.5、1、3、7、10、14、21 日後にマウスに全身麻酔をかけ、十分な麻酔後に、PBS 灌流を行い、その後、ホルマリンにて灌流固定を行う。上顎骨を取り出

し、CBCT にて撮影した。その後、EDTA にて脱灰後に、パラフィン包埋を行った。

ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色および免疫染色法等を用いて継続的に発現を検討した。



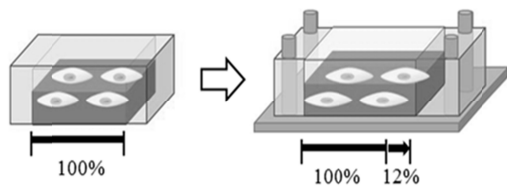
(5) 細胞と培養

6-8 週齢のマウスの大腿骨および脛骨を取り出し、25 ゲージ針で骨髓細胞をフラッシュアウトした。その後、1500rpm, 5 分遠心し、10%牛胎仔血清および 100 μ g/ml streptomycin を加えた Dulbecco's Modified Eagles Medium で 3.5cm 細胞培養デッシュに 4×10^7 cells/dish で細胞播種し、37、5%CO₂ で培養した。培養 4 日目で浮遊細胞を除去し、7 日間培養後デッシュ底面に付着した細胞を骨髓間質細胞として使用した。

骨芽細胞分化モデルとして、ヒトやラットなど様々な動物由来の骨髓間質細胞の骨分化誘導に有効であることが報告されているデキサメタゾンを使用した。

(6) 伸展刺激法

骨髓間質細胞は、phosphate buffer saline (PBS) で 2 回剪除後、0.05% Trypsin/EDTA で室温 2 分間処理し、培養デッシュから剥離した。採取した細胞は、0.05mg/ml Fibronectin で 12 時間コーティング処理した 4well チャンバーに 1×10^5 cells/cm² の割合で播種した。サブコンフルエントに達した後、オリジナルの伸展装置を用いたシリコンチャンバーを一方向的に 12%伸展させた。有限要素解析では、ヒトの上顎中切歯に物理的な力をかけて歯を水平的に移動させると、歯根膜が、約 8-25%伸展され、歯根中央部の歯根膜にかかる伸展率は 12%であるから、本研究では伸展率 12%でおこなった。



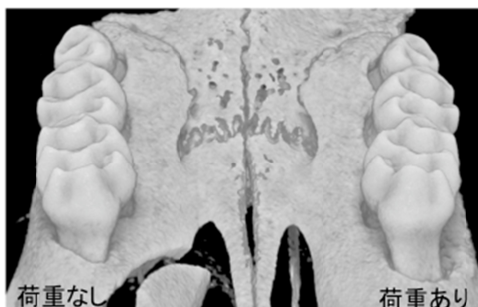
(7) flow cytometry 解析

歯の移動 0、0.5、1、3、7、10、14、21 日後にマウスを安楽死させ、PBS 灌流を行い、上顎骨を採取した。粉碎し、コラゲナーゼ処理 (RPMI1640, 10%FCS, 1mg/ml collagenase, 0.1ml/ml DNase) を 37、2 時間振盪した。その後、PBS 洗浄を 2 回を行い、70 μ m strainer で細胞を単離し、細胞染色を行った。細胞を 10 μ g/ml anti-Fc γ R / (clone 2.4G2) で 15 分間氷上にて Fc block し、その後、各抗体を 10 μ g/ml (CD45-PacificBlue, Ly6G-PerCP/Cy5.5, SiglecF-PE, CD11c-PE/Cy7, F4/80-APC, CD11b-APC/Cy7, IgE-PE, c-kit-PE/Cy7, CD49b-APC) で 30 分間氷上にて染色を行った。洗浄後に、1 μ g/ml DAPI にて死細胞染色を行い、Facs Fortessa にて測定した。データは、flowjosoftware にて解析した。

4. 研究成果

(1) Runx2 ヘテロノックアウトマウスにおける歯の移動量

野生型マウスおよび Runx2 ヘテロノックアウトマウスの歯の移動量を比較し、21 日後にて約 40%の移動遅延が認められた。



(2) Runx2 ヘテロノックアウトマウスにおける歯の移動に伴う関連因子

歯の移動に伴い、TNF- α 、IL-1、IL-6、histamine などの炎症性サイトカインが上昇することが知られており、これらを抑制することにより、歯の移動が遅延することが知られている。そこで、既知であるこれ

ら因子について、野生型および Runx2 ヘテロノックアウトマウスを比較し、これらすべての因子について、mRNA およびタンパクにおいて、有意に減少が認められた。

(3) タンパク発現部位の解析

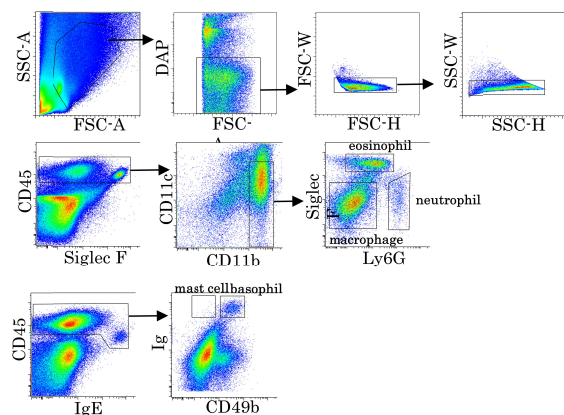
上記サイトカインの発現部位を野生型および Runx2 ヘテロノックアウトマウスで、HE 染色、免疫染色を用いて比較検討した。IL-1, TNF, histamine は、野生型および Runx2 ヘテロノックアウトマウスにて、圧迫側、牽引側の両側に認められた。

歯の移動においては、これらサイトカインを産生する T 細胞、マクロファージやマスト細胞なども重要であることが報告されている。

野生型および Runx2 ヘテロノックアウトマウスを比較し、細胞浸潤の減少が認められた。

また、Flow cytometry 解析にて、マクロファージおよびマスト細胞が、野生型と比較して、Runx2 ヘテロノックアウトマウスにおいて、減少が認められた。

gating strategy



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4件)

1. Kuroishi, Toshinobu, Bando Kanan, Tanaka Yukinori, Shishido Kaori, Kinbara Masayuki, Ogawa Tomohisa, Muramoto Koji, Endo Yasuo, Sugawara Shunji. CXCL4 is a novel nickel-binding protein and augments nickel

allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 査読有, 47, 2017, 1069-107, doi: 10.1111/cea.12926.

2. Bando Kanan, Tanaka Yukinori, Kuroishi Toshinobu, Sasaki Keichi, Takano-Yamamoto Teruko, Sugawara Shunji, Endo Yasuo. Mouse Model of Hydroquinone Hypersensitivity via Innate and Acquired Immunity, and its Promotion by Combined Reagents. *Journal of Investigative Dermatology*, 査読有, 137, 2017, 1082-1093, doi: 10.1016/j.jid.2016.12.018.

3. Tanaka Yukinori, Nagashima Hiroyuki, Bando Kanan, Lu Lu, Ozaki Akane, Morita Yumi, Fukumoto Satoshi, Ishii Naoto, Sugawara Shunji. Oral CD103⁺CD11b⁺ classical dendritic cells present sublingual antigen and induce Foxp3⁺ regulatory T cells in draining lymph nodes. *Mucosal Immunology*, 査読有, 10, 2017, 79-90, doi: 10.1038/mi.2016.46.

4. Kinbara Masayuki, Bando Kanan, Shiraishi Daisuke, Kuroishi Toshinobi, Nagai Yasuhiro, Ohtsu Hiroshi, Takano-Yamamoto Teruko, Sugawara Shunji, Endo Yasuo. Mast cell histamine-mediated transient inflammation following exposure to nickel promotes nickel allergy in mice. *Experimental Dermatology*, 査読有, 25, 2016, 466-71, doi: 10.1111/exd.12985.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂東 加南 (BANDO, Kanan)

東北大学・大学病院・医員
研究者番号：20772198