

平成21年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592120
 研究課題名（和文） 遺伝子改変マウスを用いた転写因子Runx2の象牙芽細胞分化における機能解析
 研究課題名（英文） Analysis of the function of Runx2 in differentiation of the odontoblasts using transgenic mice
 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：

Runx2 は骨格形成において、骨を作る骨芽細胞の分化に必須の因子であるが、歯牙の形成においては、逆に、象牙質を作る象牙芽細胞の分化に不要の因子であることが本研究により明らかになった。象牙芽細胞にRunx2が発現すると、象牙芽細胞は骨芽細胞の性質を持った細胞に形質転換して、骨様の象牙質を形成する。すなわち、象牙芽細胞が正常に分化して象牙質を形成するためにはRunx2の発現は抑制されなければならない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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、遺伝子改変マウス、歯、象牙芽細胞、分化、組織、組織化学
 骨様象牙質

1. 研究開始当初の背景

多能性間葉細胞から各種の骨格系細胞への分化には様々な転写因子が関与している。我々は、転写因子Runx2が骨格形成に重要な役割を果たし、骨芽細胞の分化に必須であることを世界に先駆けて報告した（Komori et al. Cell 89:755-764, 1997）。

歯牙形成において、象牙芽細胞は頭部神経堤由来の外胚葉性間葉細胞から分化するが、Runx2のノックアウト（KO）マウスでは歯胚形成が帽状期までで停止し、象牙芽

細胞の分化が認められない（D' Souza et al., Development 126:2991-2920, 1999）。すなわち、Runx2は歯牙形成においても重要な転写因子である事が知られている。歯牙形成におけるRunx2の機能に関する研究は、これまで我々を含めた一部のグループによるKOマウスの解析に限られており、象牙芽細胞の分化・成熟過程における検討はなされていなかった。

歯胚において、Runx2は蕾状期から帽状期の歯小囊細胞、歯乳頭細胞に強く発現し、

歯乳頭の発現は鐘状期以降減衰することが知られている (D' Souza et al., Development 126:2991-2920, 1999; Aberg et al., Dev. Biol. 270:76-93, 2004)。

未分化間葉細胞から象牙芽細胞が分化・成熟するまでのメカニズムに関しては未だ不明な点が多く、その過程における Runx2 の機能に関しても、Runx2-KO マウスでは象牙芽細胞が分化する前に歯胚発生が停止してしまうために解析できず、不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、象牙芽細胞の分化・成熟過程における Runx2 の機能を解明することである。そのために、I 型コラーゲンプロモーター (*Col1a1*) を用いて象牙芽細胞特異的に Runx2 を過剰発現または欠損させたマウスを作製し、それらマウスの表現形について組織学的 (形態解析および石灰化関連因子の組織化学的解析) に解析することにより、象牙芽細胞における Runx2 の機能を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニックマウス

Tg(Col1a1-Runx2)

Liu et al. (J. Cell Biol. 155:157-166, 2001) で報告した方法により、2.3kb *Col1a1* プロモーター下に *Runx2* を発現させたマウス *Tg(Col1a1-Runx2)* を作製し、長崎大学生命科学研究支援センター動物実験施設で繁殖・維持させた。また、2.3kb *Col1a1* プロモーターが象牙芽細胞特異的に機能することを *Tg(Col1a1-lacZ)* マウスを作製し、 β -galactosidase 染色で象牙芽細胞特異的な染色を見ることで確認した。

(2) 組織解析

生後 0 日から 4 ヶ月齢までのマウス第一臼歯について解析を行った。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 2.5% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde 固定液で灌流固定し、電子顕微鏡用にはさらに 1% オスミウム酸固定液にて後固定後、通法により、それぞれパラフィンと Epon-Araldite 樹脂に包埋して切片作製後、HE 染色および酢酸ウラン・鉛染色をして観察を行った。

また、一部のパラフィン切片は、骨細管・象牙細管を観察するために、Kusuzaki et al. (Acta Orthop. Scand. 66:166-168, 1995) の方法に基づき銀染色を施した。

(3) *In situ* hybridization

象牙質基質と骨基質共通の蛋白である Type I collagen および象牙質特異的基質蛋白であり象牙芽細胞のマーカー蛋白である Dentin sialophosphoprotein (DSPP) の遺伝子の局在は、*in situ* hybridization 法により検索した。0.32kb マウス *Col1a1* cDNA fragment と 0.42kb マウス *DSPP* cDNA fragment から、Digoxigenin-11 - UTP - labeled single-stranded RNA probe を作製し、Inada et al. (Dev. Dyn. 214: 279-290, 1999) の方法に基づき、(2) で作製したパラフィン切片を用いて発現を検出した。

(4) 免疫組織化学

Runx2、中間径フィラメントの一種で象牙芽細胞マーカー蛋白として知られる nestin、および象牙質・骨基質共通蛋白である osteopontin, osteocalcin, dentin matrix protein 1 (DMP1) の発現は、(2) のパラフィン切片を用いて免疫組織化学により検索した。

マウスモノクローナル抗体 (Runx2, MBL; nestin, Chemicon) 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, IBL; osteocalcin, Takara Bio; DMP-1, Toyosawa et al., Bone 34:124-133, 2004) は、Histofine Simple stain MAX-PO(R) (Nichirei) を用いて反応を行い、DAB で茶色に発色を行った。また、一部の切片では DAB-Nickel 液を用いてまず Runx2 の発現を黒色に発色させ、その後他の蛋白を茶色に二重染色して局在を比較した。

4. 研究成果

(1) 野生型および *Tg(Col1a1-Runx2)*

マウス臼歯歯胚における Runx2 の発現
野生型マウスを用いて、臼歯歯胚における内在性 Runx2 の発現を免疫組織化学的に詳細に解析した結果、Runx2 は歯小囊細胞に強く発現するものの、歯乳頭における発現は低かった。そして、象牙芽細胞の分化過程においては、前象牙芽細胞から象牙芽細胞への分化過程で発現が減少し、象牙芽細胞の成熟とともにほぼ消失することが明らかになった。本研究では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マウスと象牙芽細胞特異的に Runx2 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスの解析を計画していたが、以上の内在性 Runx2 発現パターンの結果から、*Tg(Col1a1-Runx2)* マウスの解析に重点を置き、象牙芽細胞における Runx2 の発現が歯牙形成に及ぼす影響について解析を

行った。

*Tg(Coll1a1-Runx2)*マウスの臼歯歯胚において、Runx2 は、野生型の内在性の発現パターンに加え、最終分化した象牙芽細胞にもトランスジーンが発現していることが確認された。

(2) *Tg(Coll1a1-Runx2)* マウスにおける象牙芽細胞の分化障害

①組織解析 (図1)

*Tg(Coll1a1-Runx2)*マウスの歯は脆く、萌出後の歯には破折や露髄がしばしば認められた。歯の外形やエナメル質、歯根膜等に顕著な形態変化は認められないが、象牙質は非常に薄く、また、象牙細管等の特異的構造を有さず、細胞を含む骨小腔様構造が存在して歯槽骨の構造と非常に良く類似していた。そして、象牙芽細胞はその典型的な円柱形の形態を失い、骨芽細胞様の形態を呈していた。

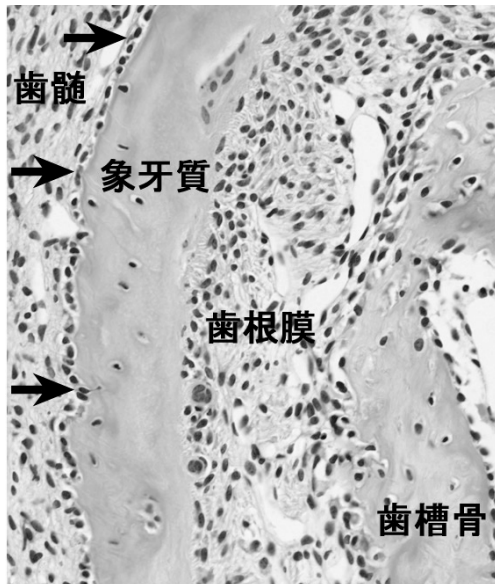


図1

*Tg(Coll1a1-Runx2)*マウス臼歯歯根部の組織像 (矢印：形質転換した象牙芽細胞) (Archives of Histology and Cytology, Vol. 71, No. 2, p131-146, 2008.)

象牙芽細胞の形態異常は、象牙芽細胞が最終分化し、象牙質の基質産生が開始するとともに認められた。電子顕微鏡により詳細に観察すると、それは特に、エナメル質基質産生開始点に対応する象牙

芽細胞から顕著であることが明らかになった。

②象牙芽細胞マーカー蛋白および骨・象牙質基質蛋白の発現

野生型マウスの歯胚と歯牙において象牙芽細胞に特異的に発現する nestin と DSPP の発現は、*Tg(Coll1a1-Runx2)*マウスにおいては消失していた。また、象牙質基質と比較して骨基質により豊富に存在するとされる osteopontin、osteocalcin および DMP1 の発現が *Tg(Coll1a1-Runx2)*マウスの象牙芽細胞および象牙質基質において野生型と比較して上昇していた。

(3) 研究の成果と国内外における位置づけ、および今後の展望

本研究により、骨芽細胞分化において必須の転写因子である Runx2 は、象牙芽細胞の分化においては、その最終分化を抑制し、象牙芽細胞を骨芽細胞の性質を持った細胞に形質転換させることが明らかになった。すなわち、象牙芽細胞が正常に分化するためには、Runx2 はダウンレギュレーションされなければならない事が解明された。

従来、Runx2 は蓄状期から鐘状期初期までの歯胚形成において必要な因子であることは報告されていたが、その後の歯牙形成、特に象牙芽細胞の分化における機能等はノックアウトマウスがその分化以前に死んでしまうため不明であった。本研究は、象牙芽細胞の分化過程における Runx2 の機能を国内外において初めて明らかにしたものである。Runx2 を発現した象牙芽細胞が骨芽細胞の性質を持った細胞に形質転換するという事実は、改めて、Runx2 が骨芽細胞のマスター遺伝子であることをも示している。

Tg(Coll1a1-Runx2) マウスにおいて形成された骨組織様の象牙質は、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。すなわち、本研究では Runx2 が第三象牙質 (修復象牙質) の形成に関与している可能性も示唆された。そこで、Runx2 の歯牙組織における機能解析の一環として、今後、Runx2 の第三象牙質形成における機能解析を行うことで、象牙質修復機序に関する新たな知見を得ることが期待できる。

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2件)

- ① Toshihiro Miyazaki, Naoko Kanatani, Satoshi Rokutanda, Carolina Yoshida, Satoru Toyosawa, Reiko Nakamura, Shinji Takada and Toshihisa Komori.

Inhibition of the terminal differentiation of odontoblasts and their transdifferentiation into osteoblasts in Runx2 transgenic mice.

Archives of Histology and Cytology, Vol. 71, No. 2, p131-146, 2008. (査読有)

- ② Zenjiro Maruyama, Carolina A. Yoshida, Tatsuya Furuichi, Norio Amizuka, Masako Ito, Ryo Fukuyama, Toshihiro Miyazaki, Hideki Kitaura, Kouhei Nakamura, Takashi Fujita, Naoko Kanatani, Takeshi Moriishi, Kei Yamana, Wenguang Liu, Hiroshi Kawaguchi, Kozo Nakamura, Toshihisa Komori.

Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency.

Developmental Dynamics, Vol. 236, Issue 7, p 1876-1890, 2007 (査読有)

[学会発表] (計2件)

- ① 宮崎敏博, 金谷直子, 六反田賢, 小守壽文.

象牙芽細胞特異的Runx2トランスジェニックマウスにおける歯牙形成過程の組織化学的解析.

第49回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2008年10月5日、長崎

- ② 吉田カロリーナ、宮崎敏博、中村浩平、藤田隆司、金谷直子、森石武史、小守壽文.

Runx2 functions during postnatal bone development.

日本解剖学会第63回九州支部学術集会, 2007年10月20日、長崎

[その他]

研究室ホームページ

http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_cb.html

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

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

金谷 直子 (KANATANI NAOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教務職員

研究者番号：10380982