

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24年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592586

研究課題名（和文）鎖骨頭蓋異形成症モデルマウスを用いた歯の移動時の歯周組織応答メカニズムの解明

研究課題名（英文）The elucidation of the periodontal tissue response mechanism during tooth movement in cleidocranial dysplasia model mice.

研究代表者

清流 正弘（SEIRYU MASAHIRO）

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80510023

研究成果の概要（和文）：Runx2は骨芽細胞分化の必須遺伝子であり、鎖骨頭蓋異形成症の原因遺伝子である。同症候群患者は歯の移動遅延が報告されており、その病態モデルであるRunx2^{+/-}マウスは、メカニカルストレス応答の反応が低下し、骨芽細胞分化促進の低下が生じている可能性が考えられる。そこで、本研究では、Runx2^{+/-}マウス由来骨髄間質細胞に伸展刺激を加えた場合の骨芽細胞分化を*in vitro*で検討した。その結果、Runx2^{+/-}マウスは野生型マウスと比較し、伸展力負荷時の骨髄間質細胞の細胞増殖促進の遅延が認められ、さらに骨芽細胞分化の遅延と低下が認められた。したがって、Runx2^{+/-}マウスの歯を移動したときの伸展側における、細胞増殖の遅延と骨芽細胞分化機能の低下が*in vitro*で明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Runx2 is an essential transcription factor for osteoblastic differentiation and its mutation cause cleidocranial dysplasia. It has been reported that tooth movement in CCD is delayed. So we hypothesized that reduction of response to mechanical stress and promotion of osteoblastic differentiation in Runx2 heterozygous mice (Runx2^{+/-} mice), animal model of CCD. In present study, we investigated osteogenesis of bone marrow stromal cells (BMSCs) derived from Runx2^{+/-} mice during mechanical stretching. As a result, we found delayed cell proliferation and delayed and reduction of osteogenesis in BMSCs derived from Runx2^{+/-} mice after mechanical stretching compared with wild-type mice. We confirmed that cell proliferation and reduction of osteoblastic differentiation function on tension side of tooth movement in Runx2^{+/-} mice *in vitro*.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：Runx2、メカニカルストレス、原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向

及び位置づけ

Runx2 完全欠損マウスにおいて膜性骨化が欠落することから Runx2 が骨芽細胞分化のマスタージーンであり (Komori *et al. Cell* 2000)、鎖骨頭蓋異形成症の原因遺伝子であると同定された。以後、組織特異的 Runx2 欠損あるいは過剰発現マウス、組織特異的ドミナントネガティブ Runx2 発現マウス (Ueta *et al. JCB* 2001) など Runx2 遺伝子改変マウスは多数作成されており、骨形成における Runx2 の重要性が注目されており、その機能解析は世界中で活発に行われている。それにもかかわらず、鎖骨頭蓋異形成症の表現型を示す Runx2^{+/-}マウス (Runx2^{+/-}マウス) についての研究報告はわずかである。特にメカニカルストレスを負荷した際の組織の応答や Runx2 の機能を解析した報告は皆無である。本申請研究は Runx2^{+/-}マウスに矯正的歯の移動を行い、歯の移動に伴う歯根膜の反応、歯槽骨のリモデリングなど歯周組織の応答を分子レベルで解析し、鎖骨頭蓋異形成症患者の顎顔面、口腔内の異常とその病態を解明しようとするものである。

(2) 着想に至った経緯

鎖骨頭蓋異形成症は全身症状として、鎖骨の消失または形成不全、泉門閉鎖の遅延、関節の弛緩や顎顔面の形成不全などが観察される。口腔内異常所見として、永久歯の萌出遅延、乳歯の晩期残存、多数埋伏歯、歯の形成不全が認められる。そのため「厚生労働大臣が定める疾患」に起因した咬合異常に分類されており、矯正治療に健康保険が適応され、しばしば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、当該患者の矯正治療法は未だ確立されていない。

これまでに申請者らはラットを用いて矯正的歯の移動を行い歯根膜や歯槽骨の反応を解析する研究を行ってきており、メカニカルストレス応答に関与していると推察される様々な分子を同定している (Yamashiro *et al. 他*)。さらに歯の移動法についてはマウスを用いても確立しており、メカニカルストレス負荷による歯周組織の反応について研究を行ってきた (Sakai *et al. JDR second revised*)。これらの結果と比較して、歯の移動遅延が起こる鎖骨頭蓋異形成症のモデル動物である Runx2^{+/-}マウスではその応答性が異なることが予想される。そこで、申請者らは鎖骨頭蓋異形成症のモデル動物である Runx2^{+/-}マウスを用いて、実際に矯正的歯の移動を行い歯周組織の応答について解析し、野生型マウスと比較して反応が遅延することを見出した (Tamanura *et al. manuscript in preparation*)。これらの研究をさらに発展させ、歯周組織の応答を組織学的ならびに分子生物学的手法で詳細に解析し Runx2 のメカニカルストレス下での機能の解明を目的とする研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

鎖骨頭蓋異形成症の動物モデルである Runx2^{+/-}マウスに矯正的歯の移動を行い、Runx2 遺伝子の発現減少下での歯周組織のメカニカルストレス応答について形態学的ならびに分子生物学的手法で解析を行い、その分子メカニズムを解明することを目的とする。これにより、Runx2 のメカニカルストレス応答時の機能を解明し、従来矯正治療が困難である鎖骨頭蓋異形成症患者の新たな矯正治療法開発につながる分子基盤の確立を

目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞と培養

6-9 週齢の Runx2(+/-)型 NMRI 雄性マウス (Runx2^{+/-}マウス) と Runx2(+/+)型 NMRI 雄性マウス (野生型マウス) を、1 回の実験につきそれぞれ 10-30 匹ジエチルエーテルで吸入麻酔後頸椎脱臼して屠殺し、大腿骨および腓骨を取り出し、軟組織を除去後、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、100IU/ml penicillin および 100 µg/ml streptomycin を加えた Dulbecco's Modified Eagles Medium で 3.5 cm 細胞培養ディッシュに 4×10^7 cells/dish の割合で細胞を播種し、37 ° C、5%CO₂ および 100%湿度下で培養した。培養 4 日目で浮遊細胞を除去し、7 日間培養後ディ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。

(2) 伸展刺激法と骨分化誘導

骨髓間質細胞はPBSで2回洗浄後、0.05%trypsin・EDTAで室温2分処理し、培養ディッシュから剥離し、0.05mg/mlフィブロネクチンで12時間コーティング処理したシリコンエラストマー製チャンバーに 1×10^5 cells/cm² の割合で播種した。37 ° C、5%CO₂ および100%湿度下培養で、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シリコンチャンバーを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%(根尖～歯槽骨の位置にもよる)伸展され、歯根中央部の歯根膜にかかる伸展率は12%であることから本研究では伸展率12%を採

択した。なお、非伸展細胞群は伸展せずに伸展群と同条件で培養した。

これまでに、骨髓間質細胞は、骨、軟骨、脂肪細胞への分化法が確立されており、さまざまな間葉系細胞に分化可能な幹細胞を有している。デキサメタゾン、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おり、本研究では、培養液に添加することにより、骨芽細胞分化モデルとして使用した。骨分化誘導培地下でマウス由来骨髓間質細胞に伸展力を負荷する場合には、シリコンチャンバーに細胞を播種しサブコンフルエントに達した後、培養液を10nM デキサメタゾン、82µg/ml アスコルビン酸および10mM b-グリセロリン酸を添加した10%FBS含有DMEM(骨分化誘導培地)に交換し、1時間後に12%伸展力を負荷し37 ° C、5%CO₂ および100%湿度下で培養した。骨分化誘導培地は、3日に1度交換した。

(3) トータル RNA 抽出と逆転写

野生型およびRunx2^{+/-}マウス由来骨髓細胞採取直後に、TRIzol reagent[®]を用いてトータルRNAを抽出した。また、骨分化誘導培地下でのマウス由来骨髓間質細胞を伸展10日後に、Runx2およびOSC mRNA発現量検討のためにTRIzol reagent[®]を用い、トータルRNAを抽出した。トータルRNA1 µgを鋳型として、SuperScript III[®] First-Strand Synthesis System (Invitrogen)を用いて65 ° C、5分、50 ° C、50分、85 ° C、5分で逆転写反応を行い、complementary DNA(cDNA)を合成した。

(4) リアルタイムPCRによる遺伝子発現の解析

リアルタイムPCRは、Thermal Cycler Dice Real Time System(Takara Bio. Inc., Shiga, Japan) を使用し、2 µl cDNAを鋳型として

20pmol/ μ lセンス・アンチセンスプライマーとSYBR premix Ex Taqを用いて行った。熱変性95° C、10分、アニーリングを95° C、15秒さらに伸長反応60° C、1分を40サイクル行った。各遺伝子のmRNA発現量は、GAPDH の発現量に対する相対値で表示した。

(5) DNA 量、ALP 活性およびカルシウム産生量測定

マウス由来骨髄間質細胞を、細胞増殖検討では伸展0、12、24、36 および 48 時間後、ALP 活性およびカルシウム産生量測定では伸展0、7、14、21 および 28 日後に、生理食塩水で2回洗浄し、0.075% Triton X-100 含有625mM Tris-HCl 緩衝液 (PH 9.0) で超音波処理後、10000×g、4° C、5分遠心した。上清はDNA量および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。DNA量はQuant-iT PicoGreen および Infinite F200を用いて測定した。ALP活性測定は、10倍希釈した上清に0.5mM MgCl₂ および0.5mM *p*-ニトロフェニルリン酸を添加し、37° Cで30分インキュベート後0.1N NaOH で反応を停止させ、Infinite F200を用い405nmの吸光度で測定した。なお標準曲線は*p*-ニトロフェノールを使用し、30分あたりのALP活性を*p*-ニトロフェノール濃度で換算した。ペレットは、0.5M HCl を添加し16時間37° Cでインキュベートし、13000rpm、4° C、15分遠心後の上清を用い、QuantiChrom Calcium Assay Kit (Bioassay Systems, Hayward, CA, USA) で572nmの吸光度にて Infinite F200を用いてカルシウム量を測定した。

(6) ALP 染色

伸展7、21日後の細胞をPBSで2回洗浄後、100%エタノールで10分間固定しALP染色キット (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) にて10分間ALP染色を行った。染色像の撮影は、高精細顕微鏡デジタルカメラDP71 (Olympus, Tokyo, Japan)を用いた。

4. 研究成果

(1) Runx2^{+/-}マウス由来骨髄細胞の Runx2 mRNA 発現について

野生型マウスおよびRunx2^{+/-}マウス由来骨髄細胞採取直後のRunx2 mRNA発現を検討した。その結果、Runx2^{+/-}マウス由来細胞は、野生型マウスと比較し、約30%の発現減少が認められた。

(2) Runx2^{+/-}マウス由来骨髄間質細胞の伸展後の細胞増殖能について

Runx2^{+/-}マウス由来骨髄間質細胞を伸展後、DNA量を測定して細胞増殖能を検討した。その結果、野生型マウス由来細胞のDNA増加量は12および24時間、Runx2^{+/-}マウスでは36時間で、伸展による有意な増加が認められた。また、伸展群におけるRunx2^{+/-}マウスのDNA増加量は野生型マウスと比較し、12時間と24時間で有意な差が認められ、細胞増殖の遅延が認められた。

(3) 骨分化誘導培地下における Runx2^{+/-}マウス由来骨髄間質細胞伸展後の、ALP 活性、カルシウム産生量および骨芽細胞関連遺伝子の発現について

骨分化誘導培地下におけるRunx2^{+/-}マウス由来骨髄間質細胞の伸展後のALP活性を測定した。伸展群の野生型マウス由来細胞のALP活性は伸展7および14日後で非伸展群と比較して有意に上昇し、ALP活性のピークは7

日で認められた。さらに、Runx2^{+/-}マウス由来細胞では、ピークは 21 日で認められ、伸展 14 および 21 日後で、非伸展群と比較し有意に上昇していた。伸展群において Runx2^{+/-}マウス由来細胞は野生型マウスと比較し、14 日間まで有意に低下し、ALP 活性のピークの遅延と有意な減少が認められた。ALP 染色においても、ALP 活性測定と同様の結果が認められた。

また、カルシウム産生量については、伸展した野生型マウス由来細胞は伸展後 21 および 28 日で、Runx2^{+/-}マウスでは、28 日で非伸展群と比較して有意に上昇していた。伸展群において、Runx2^{+/-}マウス由来細胞は野生型マウスと比較して 21 および 28 日で有意に減少していた。

さらに、Runx2 および OSC mRNA 発現を検討したところ、野生型および Runx2^{+/-}マウス由来細胞ともに両遺伝子の mRNA 発現は、伸展刺激後有意に増強した。伸展群においては、Runx2^{+/-}マウス由来細胞の mRNA 発現は野生型マウスに比べて有意に減少していた。

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 3 件)

1. Nagayama T, Seiryu M, Deguchi T, Kano M, Suzuki T, Takano-Yamamoto T, Ichikawa H Increase of CGRP-Containing Nerve Fibers in the Rat Periodontal Ligament After Luxation Cell Mol Neurobiol. 32(3)2012 391-397 査読有

2. Kawaki H, Kubota S, Suzuki A, Suzuki M, Kohsaka K, Hoshi K, Fujii T, Lazar N, Ohgawara T, Maeda T, Perbal B, Takano-Yamamoto T, Takigawa M. Differential roles of CCN family proteins during osteoblast differentiation: Involvement of Smad and MAPK signaling pathways. Bone. 49(5)2011 975-989 査読有

3. Deguchi T, Yabuuchi T, Hasegawa M, Garetto LP, Roberts WE, Takano-Yamamoto T Histomorphometric evaluation of cortical bone thickness surrounding miniscrew for orthodontic anchorage. Clin Implant Dent Relat Res. 13 2011 197-205 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[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

清流 正弘 (SEIRYU MASAHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 80510023

(2) 研究分担者

出口 徹 (DEGUCHI TORU)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 30346457

(3) 連携研究者

川木 晴美 (KAWAKI HARUMI)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号: 70513670