

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792270

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Runx2メカニカルストレス応答機構の解析

研究課題名(英文)The elucidation of Runx2 mechanical stress response mechanism in cleidocranial dysplasia model mice.

研究代表者

青沼 智(AONUMA, TOMO)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：70624823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：鎖骨頭蓋異形成症患者は歯の移動遅延が認められ、原因遺伝子であるRunx2は、骨芽細胞分化の必須転写因子であり、メカニカルストレス応答因子である。同症の病態モデルであるRunx2+/-マウスは、野生型マウスに比べ歯の移動遅延が認められた。本研究では、Runx2+/-マウス由来骨髄間質細胞を伸展後の細胞増殖と骨芽細胞分化について検討した。その結果、両マウス由来細胞で伸展による細胞増殖、野生型マウス由来細胞に比べてRunx2+/-マウス由来細胞の伸展による骨芽細胞分化促進の遅延が認められた。以上から、Runx2+/-マウスの歯の移動の伸展側の骨芽細胞分化の遅延がin vitroで明らかになった。

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

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正学・小児系歯学

キーワード：メカニカルストレス Runx2 細胞増殖 メカノトランスダクション

1. 研究開始当初の背景

Runx2/cbfa1は骨芽細胞分化の必須転写因子であり、鎖骨頭蓋異形成症の原因遺伝子である (komori et al. *Cell* 1997, 他)。Runx2ホモノックアウトマウスだけでなく、組織特異的Runx2欠損あるいは過剰マウス、組織特異的ドミナントネガティブRunx2発現マウス (Liu et al. *JCB* 2001, 他)が作製され、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なされている。一方、Runx2ヘテロノックアウトマウス (Runx2^{+/-}マウス)は、鎖骨の低形成や頭蓋骨縫合部の膜性骨化不全などの鎖骨頭蓋異形成症患者と類似した特徴を備え、同症候群のモデルとして考えられているが (Otto et al. *Cell* 1997)、多くのRunx2遺伝子改変マウスの研究が進められる中、この病態モデルにおける研究報告はごくわずかである。

近年、骨芽細胞株を用いて、Runx2とFGF2やG protein等の分子によるシグナル経路およびRunx2転写機能解析が報告されている (Park et al. *JBC* 2010, 他)。また、Runx2はメカニカルストレスのセンサーとして機能し、MAPKやsmadを経由したRunx2シグナル経路が報告されている (Ziros et al. *JBC* 2002, 他)が、メカニカルストレスによるRunx2シグナル伝達経路の網羅的解析およびRunx2転写機構の詳細な解明には至っていない。

申請者のグループは、鎖骨頭蓋異形成症患者の歯の移動が遅延していることから、病態モデルマウスであるRunx2^{+/-}マウスに矯正歯の移動モデルを適用した歯の移動による歯周組織のメカニカルストレス応答は、野生型マウスに比較して骨関連因子の発現の遅延および低下が認められた (Aonuma et al. *in preparation*)。この知見は全く新しいものであり、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下のRunx2シグナル伝達機構を解析し、鎖骨頭蓋異形成症患者の顎顔面および口腔内の異常と病態の原因を分子

レベルで解明することにより最良の矯正歯科治療方法の新開発につなげようとする、世界に先駆けて行う研究である。

2. 研究の目的

鎖骨頭蓋異形成症は顎顔面および口腔内に異常を呈し、さらに歯の移動遅延を生じることから矯正歯科治療が困難である。同症候群の原因遺伝子であるRunx2は、骨芽細胞分化の必須転写因子であり、メカノトランスダクションの重要な因子でもある。同症候群の病態モデルであるRunx2^{+/-}マウスの歯にメカニカルストレスを負荷したところ、野生型に比べ歯周組織の応答が *in vivo* および *in vitro* において遅延および低下した。本研究はこの研究をさらに発展させ、Runx2のメカニカルストレス応答機構の分子メカニズムの解析により、同症候群の骨病態の解明および最良の矯正歯科治療方法の新開発につなげようとする基礎的研究の確立を目的とする。

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 (Wako, Tokyo, Japan)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 (Terumo, Tokyo, Japan)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 (FBS; Nichirei, Tokyo, Japan)、100 IU/ml penicillin および 100 μg/ml streptomycin (Sigma, St Louis, MO, USA)を加えた Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM; Sigma)で3.5cm細胞培養ディッシュ (BD Falcon)に4×10⁷ 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髄間質細胞として使用した。なお、実験に使用した野生型および Runx2^{+/-}マウスは、Dr. Irma Thesleff (University of Helsinki, Finland) より供与された。マウスは、あらかじめ尾から DNeasy Blood and tissue (Quiagen GmbH, Hilden, Germany) を用いて DNA 抽出後ジェノタイピングを行った。

(2) 伸展刺激法と骨分化誘導

骨髄間質細胞は、phosphate buffer saline (PBS) で2回洗浄後 0.05% trypsin・ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Invitrogen, CA, USA) 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 (Sigma) 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 (Strex Inc., Osaka, Japan) 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、伸展装置を用いシリコンチャンバーを12%伸展させた。

骨分化誘導培地下でマウス由来骨髄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 (Sigma)、82μg/ml アスコルビン酸 (Wako) および10mM グリセロリン酸 (Sigma) 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^{+/-}マウス由来骨髄細胞採取直後に、TRIzol reagent® (Invitrogen) 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髄間質細胞を伸展後に、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RNA 1μg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、2μl cDNAを鋳型として20pmol/μl センス・アンチセンスプライマーとSYBR premix Ex Taq (Takara) を用いて行った。表1に、用いたセンス・アンチセンスプライマーの塩基配列を示す。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。遺伝子のmRNA発現量は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量に対する相対値で表示した。

(5) DNA 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、1、3、6および24時間後に、生理食塩水で2回洗浄し、0.075% Triton X-100 (Wako) 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。上清のDNA量を Quant-iT PicoGreen (Invitrogen) および Infinite F200 (Tecan, Männedorf, Swiss) を用いて測定した。

(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 (Wako) 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。

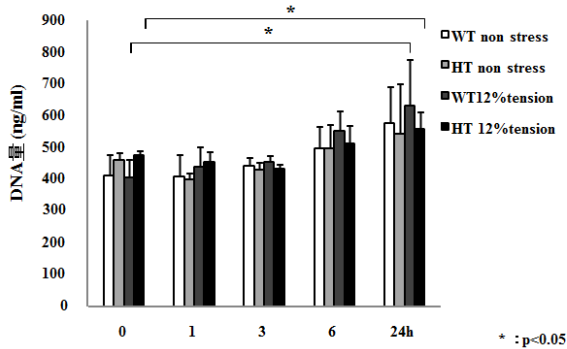
(7) 統計処理

一元配置分散分析後、Tukey-Kramer法で多重比較検定を行った。なお、危険率1%もしくは5%で有意差を判定した。

4. 研究成果

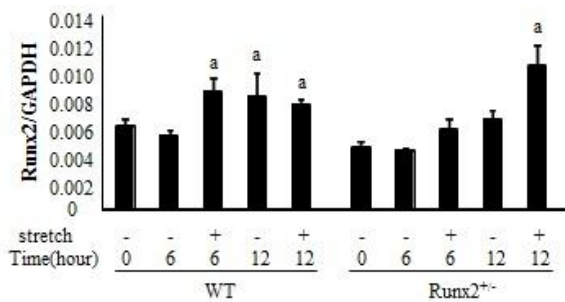
(1) 伸展による細胞増殖

野生型マウスおよび Runx2^{+/-}マウス由来骨髄間質細胞を伸展後、DNA 量を測定し、増加量を検討した結果、両マウスにおいて伸展 24 時間でそれぞれの 0 時間の DNA 量に比べ有意な差が認められた。



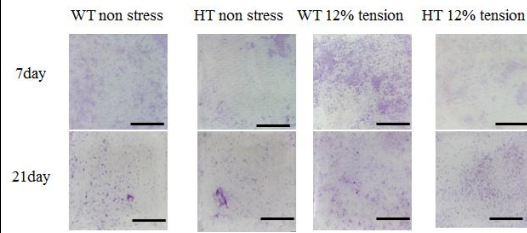
(2) 伸展による Runx2 mRNA 発現 の増強

伸展後の両マウス由来細胞の Runx2 mRNA をリアルタイム PCR で測定したところ、野生型マウス由来細胞は伸展により 6 時間で Runx2 mRNA が上昇し、Runx2^{+/-}マウス由来細胞では 12 時間で上昇が認められ、野生型マウスに比べて遅延していた。



(3) 骨分化誘導培地での伸展後の ALP 染色について

両マウス由来骨髄間質細胞を骨分化誘導培地で伸展後 ALP 染色を行ったところ、野生型マウス由来細胞では 7 日、Runx2^{+/-}マウス由来細胞では 21 日後に伸展された細胞で強く染色された。



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 1 件)

1. IL-12- and IL-18-mediated, nitric oxide-induced apoptosis in TNF- α -mediated osteoclastogenesis of bone marrow cells. Kitaura H, Fujimura Y, Yoshimatsu M, Kohara H, Morita Y, Aonuma T, Fukumoto E, Masuyama R, Yoshida N, Takano-Yamamoto T. *Calcified Tissue International* 査読有 89:65-73 2011. doi: 10.1007/s00223-011-9494-0.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青沼 智 (AONUMA, TOMO)
 東北大学・大学病院・医員
 研究者番号：70624823