

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861768

研究課題名(和文) 鎖骨頭蓋異形成症の矯正歯の移動遅延の病態解明を目的としたRunx2の機能解析

研究課題名(英文) Functional elucidation of Runx2 for pathological analysis in delay of orthodontic tooth movement in Cleidocranial dysplasia

研究代表者

青沼 智 (AONUMA, TOMO)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：70624823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Runx2は骨芽細胞分化の必須転写因子で、メカノトランスダクションに重要な因子である。鎖骨頭蓋異形成症患者の原因遺伝子はRunx2で歯の移動遅延が認められる。申請者のグループは同症の病態モデルのRunx2<sup>+/-</sup>-マウスに実験的歯の移動を行い、歯の移動遅延および歯周組織の骨関連因子の応答遅延および低下を認めた。さらにマウス骨髄間質細胞の伸展力への応答を検討し、Runx2<sup>+/-</sup>-マウス由来細胞は野生型マウスに比べ伸展による細胞増殖促進が低下していた。野生型マウスは伸展によってERKリン酸化し細胞増殖促進したがRunx2<sup>+/-</sup>-マウスでは認められずメカニカルストレス伝達経路の機能低下の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Runx2, is an essential transcription factor of osteoblast differentiation, is important for mechanotransduction. Tooth movement in cleidocranial dysplasia(CCD), caused by Runx2 gene mutation, is delayed. Our group found delayed tooth movement and reduction of response for mechanical stress in periodontal tissue of Runx2<sup>+/-</sup> mice, animal model of CCD. Because of reduction of bone formation in tension side of tooth movement, we investigated proliferation of bone marrow stromal cells after stretch. We found cell proliferation in Runx2<sup>+/-</sup> mice by stretch was decreased compared with wild-type mice(WT). We found strong phosphorylation of ERK in stretched cells from WT, but no change in Runx2<sup>+/-</sup> mice. Stretch did not change phospho-p38 and JNK in both mice. Although strong phosphorylation of ERK by stretch was required in stretched cells from WT, but not Runx2<sup>+/-</sup> mice. Thus, possibility of reduction of function of mechanical stress pathways in Runx2<sup>+/-</sup> mice has been suggested.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Runx2 メカニカルストレス 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、骨形成に必要な骨芽細胞分化の必須転写因子で、軟骨細胞の成熟に必要な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, 他)。1997 年、Runx2 ホモノックアウトマウスが作製され (Komori et al. Cell 1997, 他)、続けて組織特異的 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 (Maeno et al. Bone 2011, 他) といった多くの Runx2 遺伝子改変マウスが作製され、骨芽細胞や軟骨細胞の分化、成熟について多数の研究が報告されている。しかし、多くの Runx2 遺伝子改変マウスの研究が進められる中、鎖骨頭蓋異形成症の表現型である Runx2 ヘテロノックアウトマウス (Otto et al. Cell 1997) については、ごくわずかな研究報告しかなされていない。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は全く無い。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。

近年、*in vitro* において、Runx2 の FGF2、Ihh や G protein など多数の分子との相互間作用や転写機能における報告がなされ (Park et al. JBC 2010, 他)、Runx2 の機能解析が進められている。一方、Runx2 はメカニカルストレスのセンサーとして働き、MAPK や smad を経由した伝達経路を経て、骨芽細胞分化を促進することが報告されている (Ziros et al. JBC 2002, 他)、Runx2 のメカノトランスダクション機構の網羅的機能解析はまだなされていない。

鎖骨頭蓋異形成症患者の歯の移動が困難なことから、申請者らのグループでは、これまでに、病態モデルマウスである Runx2

ヘテロノックアウトマウスに実験的歯の移動モデルを適用し、歯の移動遅延および歯の移動による歯周組織の骨関連因子の発現が *in vivo* および *in vitro* において、野生型マウスに比較して遅延および低下するという知見を得た (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、さらに研究を発展させて、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により、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につなげようとする、世界でも類を見ない新しい研究である。

## 2. 研究の目的

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においても重要な因子である。Runx2 遺伝子変異による鎖骨頭蓋異形成症患者は、主に口腔顎顔面に異常を呈し、歯の移動遅延が認められることから、矯正歯科治療が非常に困難である。申請者のグループは、同症の病態モデルである Runx2 ヘテロノックアウトマウスに実験的歯の移動を行い、歯の移動遅延および歯周組織の骨関連因子の応答の遅延および低下を *in vivo* および *in vitro* において認めた。本申請研究は、これをさらに発展させ、Runx2 のメカニカルストレス応答機能の解析により、鎖骨頭蓋異形成症の骨病態を解明し、新たな矯正歯科治療方法の開発への基盤的研究の確立をはかる。

## 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<sup>+/-</sup>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 20~30 匹から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  $4 \times 10^7$  cells/dish の割合で細胞を播種し、37 °C、5%CO<sub>2</sub> 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<sup>+/-</sup> 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/ EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA) で室温2分処理し、培養ディ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10cm<sup>2</sup>ポリジメチルシロキサンチャンバーか4ウェルチャンバー (Strex Inc., Osaka, Japan) に  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の割合で播種した。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一方向に伸展させた。本研究では、持続的な12%伸展力を負荷したが、この伸展率は過去の報告を参照した。ERK阻害剤である PD98059 (sigma) (5 µM) を用いる場合、阻害剤を添加して1時間後伸展した。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、コントロールとした。

なお、本研究に使用したシリコンチャンバーは、初回使用時のみ高圧蒸気滅菌後、培養液を入れ、37 °C、5%CO<sub>2</sub> で24時間前処理を行った。2回目以降は、70%エタノールで10分間消毒後、PBSで2回洗浄してから使用した。

#### (3) ウェスタンブロッティング

細胞を伸展開始24時間に0.5%FBS含有増殖培地で培養後、伸展開始0、10、30分後に全細胞タンパク抽出液を protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) 含有 改変 radio immunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、150mM NaCl、1% Triton X-100、1% Na-deoxycholate、0.1%SDS、1mM EDTA、1mM NaF) で採取し、タンパク総量はBCA Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA) で測定した。1レーンあたり30µgのタンパクを Tris-Glycine SDS-PAGE gel (Bio-Rad Laboratories Inc, CA, USA) で泳動した。タンパクをゲルからニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories Inc.) に Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories Inc.) を用いて転写した。メンブレンを抗pERK、pp38、pJNK また βアクチン (cellsignaling (Beverly MA, USA)) の一次抗体 (1:1,000 希釈) と 4°C で一晩反応させ、HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) (1:5,000 希釈) で1時間反応後、SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce Chemical Co, CA, USA) で発色させ、VersaDoc 5000MP (Bio-Rad Laboratories Inc.) で撮影した。

#### (4) 細胞増殖

DNA 測定は過去報告された論文を参考に行った。細胞を生理食塩水で2回洗浄し、0.075% Triton X-100 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) 含有 625mM Tris-HCl 緩衝液 (PH 9.0) で採取後、5秒超音波処理後、10000×g、4°C、5分遠心し、上清のDNA量を測定した。DNAはQuant-iT PicoGreen (Invitrogen) と Infinite F200 (Tecan, Männedorf, Swiss) で添付文書に従って測定した。蛍光測定は485/535 nmで行った。DNA量は4ウェルチャンバーの1ウェルあたりの量で表した。

## (5)統計処理

分散分析後、Scheffe 法で多重比較検定を行い、危険率 5%で有意差を判定した。

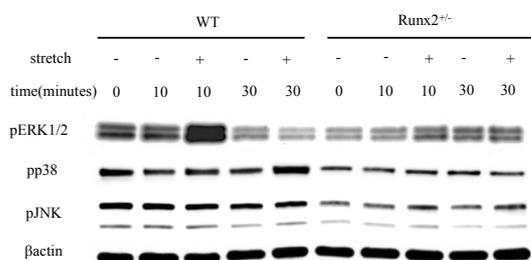
## 4. 研究成果

(1)Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来骨髄間質細胞の伸展による MAPK シグナル経路の活性について

野生型マウスおよび Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来骨髄間質細胞を伸展後にタンパクを抽出し、ウェスタンブロット法で ERK、p38、JNK のリン酸化を観察した。

その結果、野生型マウス由来細胞では、非伸展群は伸展開始 30 分後まで変化は認められず、伸展 10 分後に、伸展により ERK の強いリン酸化が認められ、30 分後には非伸展群に比べて差は認められなかった。Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来細胞では非伸展群および伸展群に伸展開始 0 から 30 分まで変化は認められなかった。また、野生型および Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来細胞の非伸展群に差は認められなかった。

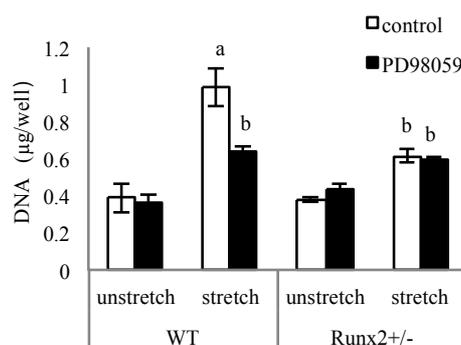
また、野生型マウスおよび Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来細胞の伸展開始 0 から 30 分までの非伸展群および伸展群の p38、JNK のリン酸化に変化は認められず、伸展による変化も認められなかった。また、非伸展群および伸展群の Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来細胞の p38、JNK のリン酸化は野生型マウスに比べてやや減弱が認められた。



(2)Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来骨髄間質細胞の伸展による細胞増殖促進と MAPK シグナル経路の活性について

Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来骨髄間質細胞に伸展力を負荷して 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

れぞれの非伸展群にくらべて DNA 量に比べ有意な差が認められ、Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来細胞は伸展による細胞増殖の促進は野生型マウスに比べて低下していた。ERK の阻害剤である PD98059 処理後の野生型マウスの伸展による細胞増殖は抑制されたが、Runx2<sup>+/-</sup>マウス由来細胞では変化が認められなかった。



## 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 2 件)

1. Deguchi T, Terao F, Aonuma T, Kataoka T, Sugawara Y, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Outcome assessment of lingual and labial appliances compared with cephalometric analysis, peer assessment rating, and objective grading system in Angle Class II extraction cases. Angle Orthod. 2015 85(3):400-7. doi: 10.2319/031014-173.1.

査読有

2. Ishida M, Kitaura H, Kimura K, Sugisawa H, Aonuma T, Takada H, Takano-Yamamoto T. Muramyl dipeptide enhances lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone resorption through increased RANKL expression in stromal cells. J Immunol Res. 2015 132765. doi: 10.1155/2015/132765. 査読有

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

青沼 智 (AONUMA, TOMO)  
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常  
勤講師  
研究者番号：70624823