

論文要旨等報告書

氏名	玉村 長都
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3360 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Runx2/Cbfa1 ヘテロ欠損マウスにおける歯の移動の遅延に関する分子生物学的研究

論文審査委員 教授 山城 隆 教授 滝川 正春 助教授 池亀 美華

学位論文内容の要旨

【目的】

鎖骨頭蓋異形成症患者は多数歯埋伏や過剰歯を認め、また矯正治療時に歯の移動が健常者に比較して遅延することが知られている。一方、鎖骨頭蓋異形成症の原因遺伝子として、骨芽細胞の分化に必須の転写因子である *Runx2/Cbfa1* の変異が同定されている。しかし、同疾患における歯の移動の遅延について、分子生物学的に詳細に検討した報告はない。本研究では鎖骨頭蓋異形成症のモデルマウスである、*Runx2/Cbfa1* heterozygous knockout マウス を用いて、歯の移動時の歯周組織の骨代謝の経時的変化について、in situ hybridization 法により分子生物学的に検討した。

【材料と方法】

70 匹の *Runx2/Cbfa1* (+/-)型 NMRI 雄性マウス(Hetero 群)及び、*Runx2/Cbfa1* (+/+)型 NMRI 雄性マウス(Wild 群)の上顎切歯に、歯列矯正用ワイヤーを装着し、第一臼歯を 10g の荷重で 2 時間から 14 日間、口蓋側に移動させた。腹腔内ペントバルビタール麻酔下で、上顎骨の印象採得後、超硬石膏にて模型を作成し、デジタルノギスにて歯の移動距離を経時的に測定した。灌流固定後、脱灰、パラフィン包埋し、7 μ m の水平断薄切片を作成した。H-E 染色を行い、歯周組織における類骨の形成量を経時的に測定した。in situ hybridization 法を用いて、CTGF (connective tissue growth factor)、Opn (オステオポンチン)、Osc (オステオカルシン) mRNA の発現様相を検索した。酒石酸耐性酸フォスファターゼ染色を用いて、歯周組織における破骨細胞の発現様相を観察した。また TUNEL 染色を用いて、歯周組織のアポトーシスを観察した。

【結果】

歯の移動量は Hetero 群において、Wild 群と比較して、歯の移動開始から 10 日以降で有意に遅延していた。また、歯の移動の圧迫側で検出した破骨細胞数も移動開始から 3 日以降減少していた。また、圧迫側骨細胞で Opn mRNA は、Wild 群では 72 時間、Hetero 群では 48 時間で最大の発現を示した。圧迫側骨細胞での CTGF mRNA は、Wild 群では 12 時間、Hetero 群では 24 時間で最大の発現を示した。また、アポトーシスの指標である TUNEL 染色陽性骨細胞は圧迫側骨細胞で、Wild 群では 12 時間、Hetero 群では 24 時間で最大の発現を示し、無細胞性骨小腔も Wild 群では 3 日、Hetero 群では 5 日と遅延していた。牽引側では、新しい骨の形成を示す類骨の形成量が Hetero 群では有意に減少しており、Osc

mRNA の発現時期も Wild 群では 5 日、Hetero 群では 7 日と、遅延および減少していた。

【考察および結論】

移動開始から 10 日以降で Hetero 群では、有意に歯の移動が遅延した。これは、*Runx2* heterozygous knockout マウスで圧迫側歯槽骨表面に誘導される破骨細胞数が減少していることが原因と考えられる。また、圧迫側で *Opn* mRNA を発現する骨細胞は、Wild 群では 48 時間、Hetero 群では 72 時間まで増加し、浅層から深層の骨細胞に広がった。また、圧迫側で *CTGF* mRNA を発現する骨細胞は、Wild 群 12 時間、Hetero 群では 24 時間まで増加し、14 日後まで経時的に減少した。これは、*Runx2* heterozygous knockout マウスではメカニカルストレスに対する骨細胞の反応性が遅延していることを強く示唆している。

圧迫側で TUNEL 染色陽性骨細胞は、Wild 群 12 時間、Hetero 群では 24 時間まで増加し、14 日後まで減少していった。これは *CTGF* mRNA の発現様相にほぼ一致しており、*CTGF* がアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。またアポトーシス反応の遅延が、骨のリモデリングの遅延につながり、最終的に歯の移動の遅延を引き起こした可能性を示唆している。

牽引側での、骨芽細胞による類骨の添加が Hetero 群で減少していた。また、*Osc* mRNA を発現する骨芽細胞は Wild 群では 5 日、Hetero 群では 7 日と、遅延、減少していた。これにより、*Runx2* heterozygous knockout マウスで牽引側での骨芽細胞および *Osc* の代謝が遅延、減弱していることが示唆された。

これらの結果から、鎖骨頭蓋異形成症患者では、矯正治療時の歯の移動で、圧迫側と牽引側で骨代謝の遅延、低下を起こしており、骨リモデリングが遅延することにより、歯の移動の遅延を引き起こすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

*runx2/cbfa1*は骨芽細胞分化の転写因子として同定された遺伝子で、そのヘテロ欠損はヒトにおいては鎖骨頭蓋異形成症を発症させる。鎖骨頭蓋異形成症患者は矯正治療時に歯の動きが遅延することが知られているが、その原因は明らかではない。本研究は鎖骨頭蓋異形成症モデルマウスである*runx2*ヘテロ欠損マウスを用いて、鎖骨頭蓋異形成症患者の歯の移動が遅延する原因について分子生物学的に検討したものである。

実験的歯の移動によって生じるメカニカルストレスは、オステオポンチン(*opn*)や結合組織成長因子(*ctgf*)などの遺伝子を骨細胞で発現させ、破骨細胞の誘導や骨細胞のアポトーシス促進によって骨の吸収を促進することが示唆されている。そこで、*in situ* ハイブリダイゼーション法により*opn*または*ctgf* mRNAの発現を、TUNEL法によりアポトーシスをおこしている細胞を検出した。さらに、圧迫側での破骨細胞の計測を行った。また、骨形成能について検討するため、オステオカルシン(*osc*)の発現と類骨形成面積を検討した。

その結果、*runx2*ヘテロ欠損マウスでは、移動開始から7日以降で歯の移動が野生型マウスより遅延した。圧迫側歯槽骨中の骨細胞における*opn*と*ctgf* mRNAの発現、TUNEL染色陽性骨細胞数、および無細胞性骨小腔数もヘテロ欠損マウスで最大発現の時期が遅延していた。そして、ヘテロ欠損マウスでは圧迫側の破骨細胞数が、野生型に比べ7日で減少していた。また、牽引側における類骨形成面積、骨芽細胞における*osc* mRNAの発現頻度もヘテロ欠損マウスのほうが少なかった。

以上より、*runx2*のヘテロ欠損は、圧迫側において骨細胞での骨代謝遺伝子の初期反応の遅延とアポトーシスの遅延を引き起こすこと、さらに破骨細胞の出現を減少させることが明らかとなった。その結果、*runx2*ヘテロ欠損マウスにおいて歯の移動が遅延することが示唆された。

本研究は、鎖骨頭蓋異形成症患者における矯正治療時の骨動態の解明に関係した基礎的研究として評価される。従って、本申請論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。