

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11015

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いたタウ蛋白質とネスチンの象牙芽細胞突起形成における機能解析

研究課題名(英文) Analysis of the function of microtubule-associated protein tau (Mapt) and nestin in the formation of odontoblast processes using the genetically modified mice

研究代表者

宮崎 敏博 (MIYAZAKI, Toshihiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：10174161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我々が新規象牙芽細胞分化マーカーとして特定したタウ蛋白質(Mapt)の象牙芽細胞突起形成における機能解析を目的とした。Maptノックアウト(KO)マウスを作出して解析した結果、象牙芽細胞分化における形態的な異常は認められなかったが、Microtubule-associated protein 1B(Map1B)の発現がMapt-KOマウスの象牙芽細胞において上昇しており、MaptとMap1Bが象牙芽細胞分化において機能的冗長性を持つ事が示唆された。免疫組織化学的にMaptとネスチンは、象牙芽細胞の最終分化と同時に発現しており、両者が象牙芽細胞突起形成と密接に関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to examine the function of microtubule-associated protein tau (Mapt) and nestin in the formation of odontoblast processes using the genetically modified mice. We have succeeded in generating the Mapt knockout(KO) mice and the microtubule-associated protein 1B (Map1B) -KO mice by the method of CRISPR/Cas system. Unexpectedly, odontoblasts of Mapt-KO mice were morphologically normal, but the up-regulation of Map1B in Mapt-KO mice was recognized. This suggests that Mapt and Map1B have functional redundancy in the differentiation of odontoblasts. Mapt and nestin were immunohistochemically expressed in terminally differentiated odontoblasts together with the expression of type1 collagen in wild-type molars. This indicates that Mapt and nestin are closely related to the terminal differentiation of odontoblasts, in which the formation of odontoblast processes starts.

研究分野：口腔組織学

キーワード：タウ蛋白質 ネスチン MAP1B 遺伝子改変マウス 象牙芽細胞分化 免疫組織化学

## 1. 研究開始当初の背景

我々の研究グループは、骨芽細胞分化において必須の転写因子 Runx2 を、*Colla1* プロモーターを用いて骨芽細胞と象牙芽細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニック [*Tg(Colla1-Runx2)*] マウスを用いた解析により、1) Runx2 は骨芽細胞の後期分化を抑制し (Liu et al., J Cell Biol 155: 157-166, 2001; Kanatani et al., Dev Biol 296: 48-61, 2006)、2) 歯牙形成においては前象牙芽細胞分化までは発現、関与するが (D' Souza et al., Development 126: 2911-2920, 1999; Aberg et al., Dev Biol, 270: 76-93, 2004)、その後の発現は象牙芽細胞への分化を抑制することを明らかにした (Miyazaki et al., Arch Histol Cytol 71: 131-146, 2008)。分化期の象牙芽細胞に Runx2 が持続的に発現すると、象牙芽細胞特有の細胞質突起 (象牙線維) の形成が阻害され、*Tg(Colla1-Runx2)* マウスの象牙芽細胞は骨芽細胞様細胞に形質転換する。

我々は、この象牙芽細胞突起形成が阻害された *Tg(Colla1-Runx2)* マウス臼歯を用い、野生型マウス臼歯との遺伝子発現比較をマイクロアレイ解析により網羅的に行い、突起形成に関連すると考えられる細胞骨格関連因子に焦点を当てて解析した。その結果、従来から知られている中間径フィラメントのネスチン (Nestin) に加え、タウ蛋白質 (Mapt: microtubule-associated protein tau) が野生型マウスの象牙芽細胞とその突起に特異的に発現し、*Tg(Colla1-Runx2)* マウスにおいては、その発現が劇的に減少していることを明らかにした (Miyazaki et al., Cell Tissue Res., 361: 457-466, 2015)。

神経堤の外胚葉性間葉細胞に由来する象牙芽細胞は、その構造と遺伝子発現において神経細胞と多くの類似点を持ち (Maurin et al. 2009 等)、その特有の突起である象牙線維には、神経突起と同様に3つの主要な細胞骨格 (微小管・中間径フィラメント・アクチンフィラメント) が含まれていることが知られている (Nishikita and Kitamura 1987 等)。しかしながら、象牙芽細胞の突起形成のメカニズムについてはほとんど解明されていない。Mapt は、アルツハイマー病の原因遺伝子であり、神経細胞の極性化や軸索形成において非常に重要な役割を持っている事が知られている (Dehmelt and Halpain 2005)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が新規象牙芽細胞分化マーカーとして特定した Mapt の、象牙芽細胞突起形成における機能を解明することである。今回の研究期間内においては、Mapt の遺伝子改変マウスを用いた表現型解析を中心に行い、従来から象牙芽細胞マーカーとして知られている Nestin の解析と合わせて、象牙芽細胞突起形成メカニズ

ムの解明の一步となることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ノックアウトマウスの作製

Mapt と Microtubule-associated protein 1B (Map1B) についてノックアウト (KO) マウスの作出に成功した。すなわち、それぞれの欠失させるエクソンを含む DNA 断片の 5' 端、3' 端をそれぞれ認識する2つの guide RNA を Cas9 mRNA とともに受精卵に注入し、偽妊娠させたマウス卵管に移植することで、ヘテロマウス (Mapt<sup>+/-</sup>; Map1B<sup>+/-</sup>) が出生した。そして、それぞれのヘテロマウスを交配することにより Mapt-KO, Map1B-KO マウスを作製した。各 genotype については、PCR 法により決定し、ウエスタンブロット法、および免疫組織化学によりタンパクの発現がないことを確認した。

### (2) 組織学的解析

① 生後5日齢の歯胚期から6ヶ月齢の歯牙について組織学的解析を行った。すなわち、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0.1% glutaraldehyde-4% paraformaldehyde 固定液を用い、灌流固定後、通法により、それぞれパラフィン包埋、LR-white 包埋して切片を作製した。

② 形態比較にはヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、各種タンパクの発現パターンの比較には、Mapt, Map1B, Microtubule-associated protein 4, Nestin 等の細胞骨格関連因子と、象牙質シアロリタンパク (DSPP)、オステオカルシン (OC)、1型コラーゲン (Colla1) 等の象牙芽細胞分化マーカーの抗体を用いて免疫組織化学を行った。

## 4. 研究成果

(1) Mapt-KO マウスの表現型について、歯胚期から成獣の歯牙について形態的に解析を行った結果、予想に反し、象牙芽細胞の分化・成熟における形態的異常は全く認められなかった (図1 a-d)。免疫組織化学的に、Mapt-KO マウスにおいて、象牙芽細胞における Mapt の発現は全く認められなかったが (図1 e, f)、各種象牙芽細胞分化マーカー (DSPP, Nestin, OC, Colla1) の発現レベルは野生型と同様であった。

Mapt の欠損が象牙芽細胞の分化・成熟に影響しない理由として、他の Microtubule-associated proteins が機能的冗長性を持つと考え、同様の機能を持つとされる Map1B と Map4 の抗体を用い免疫組織化学を行ったところ、Mapt-KO マウスの最終分化期の象牙芽細胞において (図2 矢印)、野生型と比べて Map1B の発現が上昇していることが明らかとなった (図2)。すなわち、象牙芽細胞の分化において、Mapt と Map1B が互いに機能的冗長性を持

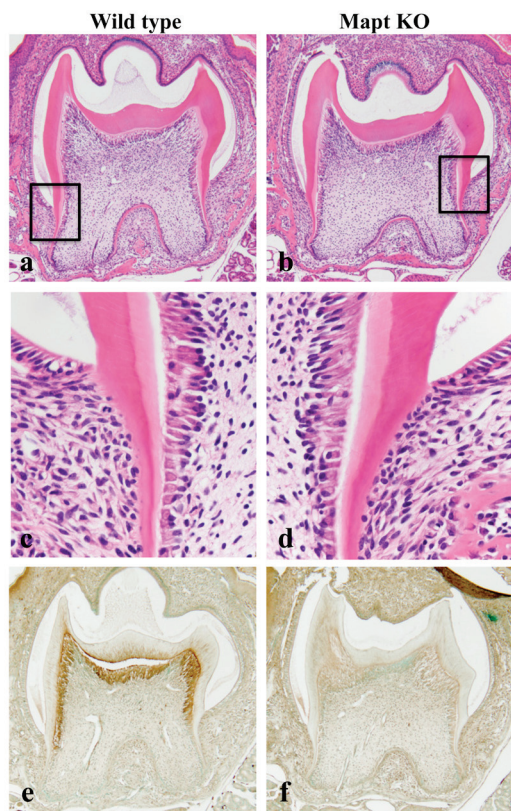


図1 生後2週齢における野生型 (a, c, e) と Mapt-KO マウス (b, d, f) 歯胚の比較 (a-d, HE 染色; e, f, Mapt 免疫組織化学)。c, d は、それぞれ a, b 枠内の拡大。

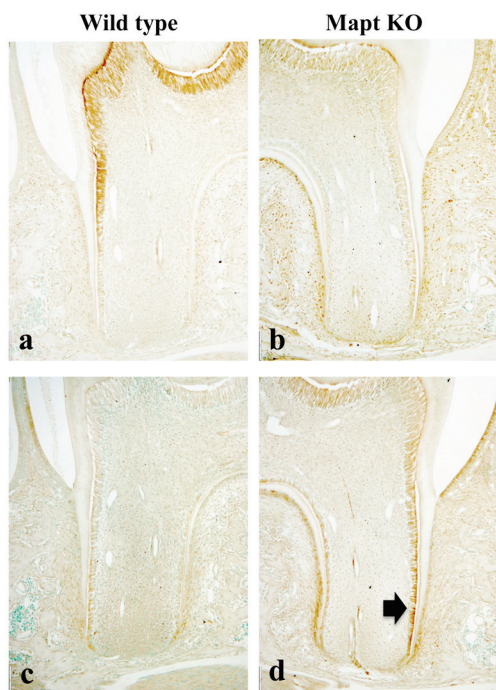


図2 生後2週齢の野生型 (a, c) および Mapt-KO (b, d) マウスにおける Mapt (a, b) と Map1B (c, d) の発現比較。矢印は Map1B の発現上昇が認められる最終分化期の象牙芽細胞層を指す。

つ可能性が示唆された。以上の結果より、Mapt と Map1B の両者を同時にノックアウトしたマウスが必要と考え、本研究期間中では Map1B-KO マウスの作製まで完了し、現在、Mapt-KO マウスとの掛け合わせによる Mapt-Map1B ダブル KO マウスの作製に取り組んでいる。Map1B-KO マウスの象牙芽細胞については、Mapt-KO マウスと同様、分化・成熟における形態的異常は認められなかった。

(2) 野生型マウスにおける Mapt と Nestin の発現パターンを、他の象牙芽細胞分化マーカーである Coll1a1、DSPP、OC との間で詳細な比較解析を行った結果、両者は、石灰化が開始して DSPP と OC の発現が上昇するより早く、すなわち、Coll1a1 が発現し象牙芽細胞の突起形成が開始すると同時に発現が上昇することを確認した (図3)。このことは、Mapt と Nestin が、象牙芽細胞の突起形成に深く関与していることを示唆している。

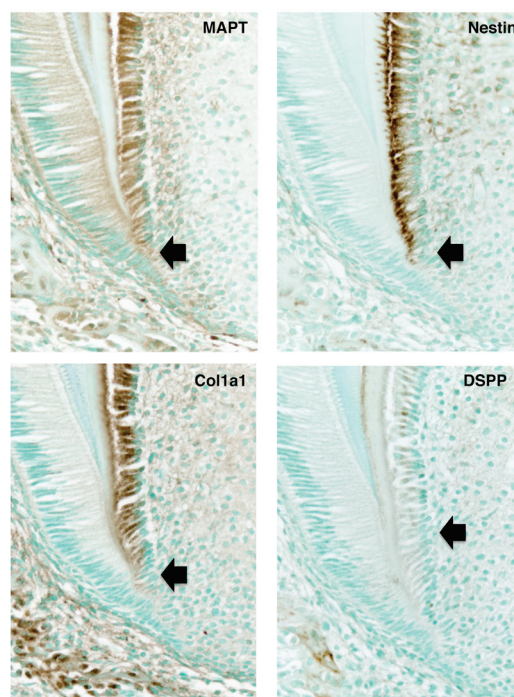


図3 生後5日齢野生型マウス臼歯歯胚の象牙芽細胞最終分化期における Mapt, Nestin, Coll1a1, DSPP の発現比較。矢印は、それぞれの発現が出現する開始点を指す。

##### 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7件)

- (1) Miyazaki T, Inoue M, Baba TT, Komori T: Overexpression of Sp7 in odontoblasts results in

- dentinogenesis imperfecta due to the inhibition of odontoblast maturation. *J Oral Biosci* 59(2): 113-120, 2017. (査読有) DOI:10.1016/j.job.2017.03.003
- (2) Yang M, Arai A, Udagawa N, Hiraga T, Lijuan Z, Ito S, Komori T, Moriishi T, Matsuo K, Shimoda K, Zahalka AH, Kobayashi Y, Takahashi N, Mizoguchi T: Osteogenic Factor Runx2 Marks a Subset of Leptin Receptor-Positive Cells that Sit Atop the Bone Marrow Stromal Cell Hierarchy. *Sci Rep* 7(1):4928, 2017. (査読有) DOI:10.1038/s41598-017-05401-1
- (3) Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, Furuichi T, Ito M, Komori T: Overexpression of BCLXL in Osteoblasts Inhibits Osteoblast Apoptosis and Increases Bone Volume and Strength. *J Bone Miner Res* 31(7):1366-80, 2016. (査読有) DOI: 10.1002/jbmr.2808
- (4) Montenegro Raudales JL, Yoshimura A, Sm Z, Kaneko T, Ozaki Y, Ukai T, Miyazaki T, Latz E, Hara Y: Dental Calculus Stimulates Interleukin-1 $\beta$  Secretion by Activating NLRP3 Inflammasome in Human and Mouse Phagocytes. *PLoS One* 11(9): e0162865, 2016. (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0162865
- (5) Jiang Q, Qin X, Kawane T, Komori H, Matsuo Y, Taniuchi I, Ito K, Izumi S, Komori T: Cbfb2 Isoform Dominates More Potent Cbfb1 and Is Required for Skeletal Development. *J Bone Miner Res* 31(7):1391-404, 2016. (査読有) DOI:10.1002/jbmr.2814
- (6) Okada Y, Miyazaki T, Fujiyama R, Toda K: Carbenoxolone-sensitive and cesium-permeable potassium channel in the rod cells of frog taste discs. *Biochem Biophys Res* 4: 175-179, 2015. (査読有) DOI:10.1016/j.bbrep.2015.09.010
- (7) Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Taniuchi I, Ito K, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori T: Cbfb regulates bone development by stabilizing Runx family proteins. *J Bone Miner Res* 30(4):706-14, 2015. (査読有) DOI: 10.1002/jbmr.2379
- [学会発表] (計9件)
- (1) Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Fukuyama R, Komori H, Moriishi T, Ito K, Komori T: Elucidation of the functions of Runx2 in differentiated osteoblasts. 21st international RUNX conference, university of pennsylvania, USA, Nov, 2017.
- (2) Montenegro JL, Yoshimura A, Ziauddin SM, Kaneko T, Ozaki Y, Miyazaki T, Ukai T, Latz E, Hara Y: Dental calculus triggers NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 $\beta$  secretion in mouse macrophages. the 14th biennial meeting of the International Endotoxin and Innate Immunity Society (IEIIS), Hamburg, Germany, Sept, 2016.
- (3) 姜晴, 秦昕, 小守寿人, 松尾友紀, 宮崎敏博, 森石武史, 小守壽文: Cbfb1 と Cbfb2 アイソフォームは骨格形成過程において重要な役割を果たす, 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年
- (4) 森石武史, 福山亮, 古市達哉, 伊東昌子, 小守壽文: アポトーシス抑制遺伝子 BCLXL を骨芽細胞に過剰発現させると骨量が増加し生涯を通して骨量が維持される, 第34回日本骨代謝学会学術集会, 2016年
- (5) 宮崎敏博, 馬場友巳, 小守壽文: タウ蛋白質は最終分化した象牙芽細胞に特異的に発現する, 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015年
- (6) 馬場友巳, 宮崎敏博, 根本優子, 根本孝幸: 2種類のビスフォスフォネートの骨芽細胞におけるアルカリフォスフォアターゼ活性および基質形成に対する異なる効果, 第57回歯科基礎医学会学術大会, 2015年
- (7) 岡田幸雄, 宮崎敏博, 藤山理恵, 戸田一雄: カエル味細胞の calbenoxolone 感受性カリウムチャネル. 第86回日本動物学会, 2015年
- (8) Qin X, Jiang Q, Matsuo Y, Kawane T, Komori H, Moriishi T, Taniuchi I, Ito K, Kawai Y, Rokutanda S, Izumi S, Komori T: Cbfb plays important

roles in bone development through the stabilization of Run family proteins. The RUNX Transcription Factors in Development and Disease, 2015.

- (9) 川根徹也, 森石武史, 小守寿人, 小守壽文: 軟骨細胞における Glant3 の過剰発現はムチン型 O-グリカンを増加させグリコサミノグリカンを減少させることによって dwarfism を起こす, 第 33 回日本骨代謝学会学術集会, 2015 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 敏博 (MIYAZAKI, Toshihiro)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・  
准教授  
研究者番号: 10174161

### (2) 研究分担者

川根 徹也 (KAWANE, Tetsuya)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・  
技術職員  
研究者番号: 00265208

### (3) 研究分担者

森石 武史 (MORIISHI, Takeshi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・  
助教  
研究者番号: 20380983

### (4) 研究分担者

馬場 友巳 (BABA, Tomomi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・  
助教  
研究者番号: 60189727

### (5) 連携研究者

小守 壽文 (KOMORI, Toshihisa)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・  
教授  
研究者番号: 00252677