

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11940

研究課題名(和文)カルシウムシグナル異常による外胚葉異形成症発症メカニズムの分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis for the mechanism of ectodermal dysplasia caused by abnormal calcium signaling

研究代表者

春山 直人(Haruyama, Naoto)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：70359529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではストア作動性カルシウム流入(SOCE)が外胚葉異形成症(ED)の発症に関与する分子メカニズムを解明するため、上皮特異的な Stim1/2遺伝子変異マウスを作出し、表現型解析をおこなった。その結果、Stim1/2変異マウスにはヒトにおけるエナメル質形成不全症と同じ表現型が見られたが、これは成熟期エナメル芽細胞の機能変化によって引き起こされていることが示唆された。また、Stim1/2変異マウスで見られた唾液分泌量低下は、唾液腺細胞のカルシウム流入機能が変化することで細胞内カルシウムイオン濃度が変化し、他のイオンチャネル機能に影響を与えることでもたらされている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストア作動性カルシウム流入(SOCE)の異常は、エナメル芽細胞ならびに唾液腺細胞機能に影響をあたえ、ヒトの外胚葉異形成症の表現型がもたらされることが確認された。これにより、SOCEの上皮細胞における生物学的役割の解明という観点からのみならず、歯の石灰化異常や唾液分泌量低下によるQoL低下防止を目指した歯科医療の基盤的知識の蓄積にも貢献できる、有意義な情報を得ることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated and phenotyped epithelium-specific Stim1/2 mutant mice to elucidate the molecular mechanism of store-operated calcium entry (SOCE), involved in the development of ectodermal dysplasia (ED) phenotypes. The results showed that the phenotype of amelogenesis imperfecta (AI) in Stim1/2 mutant mice was almost identical to the human AI, which may be led by the functional changes in the maturation stage of ameloblasts. In addition, Stim1/2 mutant mice had reduced saliva secretion due to altered salivary gland cell function, possibly due to the altered ion channel function resulting in the abnormal intracellular ion concentration such as chloride.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：ストア作動性カルシウム流入 STIM1 カルシウムイオン 歯 エナメル質 唾液腺

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

外胚葉異形成症 (Ectodermal Dysplasia: 以下 ED) は、歯・毛髪・唾液腺・汗腺・爪など、主に全身の外胚葉由来の組織に異常を認める疾患群であり、発症頻度は 1/1430 人と言われている。臨床症状として、無汗症や免疫不全を伴うと生命が危険になることがあるが、歯科的には、歯数の減少やエナメル質形成不全症、歯の形態異常 (円錐歯・咬頭の縮小・副咬頭の出現) の出現が多いという点で重要である。また、唾液腺の形成不全による唾液量の減少が加わると、非常に高いカリエスリスクにつながり、著しい QOL 低下を招く。さらに、ED は口蓋裂を伴うこともあり、厚生労働大臣が定める先天異常疾患として歯科矯正治療の保険適用が認められ、矯正歯科臨床の場を ED 患者が訪れる機会も多く、重要な研究対象である。

近年、ED の新たな原因遺伝子候補として、細胞内カルシウム (Ca<sup>2+</sup>) 濃度調節に関連した遺伝子の異常が報告された。それは、STIM1 遺伝子と ORAI1 遺伝子の異常で、STIM1 の変異は免疫不全・筋力低下・エナメル質形成不全、ORAI1 の変異は免疫不全・筋障害・無汗型 ED・口蓋裂を示すという報告であった。

この STIM タンパク質ファミリー (STIM1/2) は小胞体膜状に存在し、小胞体内に貯蔵されている Ca<sup>2+</sup> のセンサーとして働いている。一方 ORAI1 タンパク質は、細胞膜上に存在する選択性の高いイオンチャネルであり、STIM と結合することで、Ca<sup>2+</sup> を細胞内に流入させる役割を持つ。この STIM が関与している細胞内カルシウム制御は「ストア作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入 (SOCE)」といわれ、近年その存在が決定的になった新規の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度調整メカニズムである。これは、特に免疫細胞など非興奮性細胞における Ca<sup>2+</sup> シグナル伝達において非常に重要であることが判明しつつある。実際、応募者らの過去の研究では、このストア作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入が免疫組織、主に過剰な免疫反応にブレーキをかける T 細胞が作られる仕組みの制御において重要な役割を果たすメカニズムを解明した。しかし、ED の表現型発生に関連した毛包・歯・唾液腺を含む上皮系組織において、ストア作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入の変化がどのように ED に特徴的な表現型を引き起こすかは不明であり、このメカニズムを明らかにすることは重要な課題であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、特に STIM が上皮間葉相互作用、細胞機能、接着・細胞骨格制御の全てに作用して ED の表現型を発現しているという仮説に基づき、以下の観点からストア作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入の役割を明らかにしようと考えた。

- (1) スストア作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入の異常が、毛包・歯胚・唾液腺における細胞分化・発生にどのような影響を与えるか
- (2) スストア作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入の異常が、毛包・歯胚・唾液腺組織の細胞機能にどのようなメカニズムで影響を与えるか
- (3) 毛包、歯胚、唾液腺器官培養系における Ca<sup>2+</sup> 流入のリアルタイム蛍光イメージ解析と、Ca<sup>2+</sup> シグナル伝達関連遺伝子の局在変化

### 3. 研究の方法

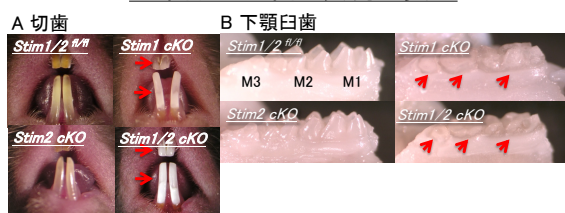
本研究では、STIM 遺伝子欠損マウスの生体を作成し、in vivo での毛包、歯、唾液腺の表現型解析、器官・細胞培養系による ex vivo / in vitro での細胞内 Ca<sup>2+</sup> シグナル解析、および蛍光イメージングを軸に、多角的に分析することとした。

### 4. 研究成果

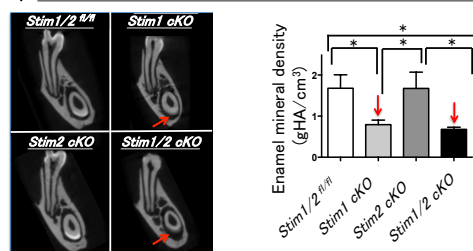
- (1) Ca<sup>2+</sup> 流入の異常が歯の細胞分化、歯の形態や細胞機能に影響を及ぼすか否かの発現型解析

エナメル芽細胞を含む上皮において特異的に Stim1・Stim2 遺伝子欠損させたマウスを作成し (K14Cre<sup>-</sup> Stim1<sup>-</sup> Stim2<sup>-</sup> flox)、STIM ファミリー間で補償メカニズムが働かないように工夫し表現型解析を行った。まず、野生型と変異型マウス歯より得た歯の組織切片、マイクロ CT、SEM 像を撮影し、エナメル質の厚みおよび石灰化度を定量的・定性的に評価した。8 週齢の Stim1 および Stim1/2 変異マウスの歯では肉眼的に顕著な咬耗が認められ (図 1)、マイクロ CT 解析ではエナメル質の石灰化度が有意に低下し (図 2)、SEM ではエナメル小柱の性質が変化していた。

(図 1) 切歯及び臼歯の表現型変化

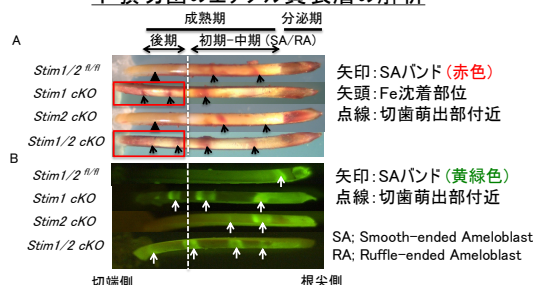


(図 2) 下顎切歯エナメル質石灰化度のX線学的解析



しかし、歯の発生段階から、エナメル芽細胞の形態には変化が見られず、分化が進んだあとも細胞形態異常などの所見は見られなかった。よって、上記エナメル質の表現型(低石灰化型エナメル質形成不全)がどのようにもたらされたのかを調べるため、エナメル質の Calcein 蛍光標識ラベリング法および GBHA 染色を実施した(図 3)。この結果により、エナメル芽細胞の成熟期に見られる周期的な形態変化が変異マウスで変化していることが示唆された。よって、SOCE の異常はエナメル基質の成熟および成熟期エナメル芽細胞の周期的な形態変化に影響を与え、低石灰化型エナメル質形成不全をもたらし得ることが示唆された。

(図 3) GBHA染色(A)および Calcein標識(B)による  
下顎切歯のエナメル質表層の解析



## (2) 毛髪形成、唾液腺の分泌機能への影響と、それぞれの組織におけるシグナル伝達変化の解析

まず、毛の表現型解析、および唾液腺の表現型解析を行うことで SOCE の異常が、上皮間葉相互作用に影響あたえるという仮説の検証を試みた。毛の表現型解析として、毛伸長の速さ、毛の性質を野生型と変異型とで肉眼的、組織学的に比較を行ったが、明確な差が認められなかった。よって、唾液腺の表現型に主眼を移して解析を行うこととした。

その結果、

- ① 唾液腺組織構造の解析を行ったが、野生型と比較して、上皮特異的 STIM 遺伝子欠損マウスにおける明確な組織構造の違いは確認できなかったことから、上皮間葉相互作用に影響を与える可能性は低いと判断した。
- ② マウスから唾液採取により唾液分泌量・組成変化の有無を解析をおこなったところ、上皮特異的 STIM 遺伝子欠損マウスにおいて、ピロカルピン刺激時の唾液分泌量が減少しており、唾液の組成については特に塩化物イオン濃度に有意な変化が見られた。
- ③ 唾液腺における SOCE 関連分子(STIM1/2 遺伝子)の発現を蛋白質および RNA レベルで確認したところ、いずれも STIM1/2 遺伝子欠損マウスにおいては野生型と比較して発現量が低下していることが確認された。引き続き、Ca<sup>2+</sup>応答と唾液分泌機能の変化の関係について、水チャネルのアクアポリン 5 等の局在や塩化物イオンチャネルの発現を免疫組織化学染色や real time PCR で確認したところ、有意な差が見られなかった。また、Ca<sup>2+</sup>濃度変化によって引き起こされる細胞内の下流シグナルの変化を、ひきつづき real time PCR で確認したが、有意な変化を捉えることができなかった。

以上のことから、SOCE の異常は、唾液腺の Ca<sup>2+</sup>濃度変化による下流シグナルの変化ではなく、Ca<sup>2+</sup>濃度変化が特に塩化物イオンを変化させるチャネル(カルシウム応答性塩化物イオンチャネル)等を制御する機構に影響を及ぼし、唾液分泌量を減少させる可能性が示唆された。

## (3) STIM1・STIM1/2 の遺伝子欠損マウス由来の毛包、歯胚、唾液腺の器官・細胞培養と共焦点顕微鏡による Ca<sup>2+</sup>濃度の蛍光リアルタイムイメージング

唾液腺細胞における細胞外からの Ca<sup>2+</sup>取り込み能力を、酵素処理した唾液腺細胞に Ca<sup>2+</sup>の蛍光指示薬(Fura-2 等)を負荷後、蛍光強度を指標として高速プレートリーダーにて計測したところ、野生型と比較して STIM1/2 遺伝子欠損マウスで低下していることが示唆された。また、毛包、歯胚、唾液腺細胞における Ca<sup>2+</sup>濃度の蛍光リアルタイムイメージングを試みたものの、本課題研究期間内では技術的な問題を解決することが困難であったため現在も継続して研究中である。

以上の結果から、ストア作動性 Ca<sup>2+</sup> 流入(SOCE)の異常は、エナメル芽細胞ならびに唾液腺細胞機能に影響をあたえ、ヒトの外胚葉異形成症の表現型がもたらされることがあらためて確認された。これにより、SOCE の上皮細胞における生物学的役割の解明という観点からのみならず、歯の石灰化異常や唾液分泌量低下による QoL 低下防止を目指した歯科医療の基盤的知識の蓄積にも貢献する、有意義な情報を得ることができたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furukawa Y., Haruyama N., Nikaido M., Nakanishi M., Ryu N., Oh-Hora M., Kuremoto K., Yoshizaki K., Takano Y., Takahashi I.	4. 巻 96
2. 論文標題 Stim1 Regulates Enamel Mineralization and Ameloblast Modulation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1422 ~ 1429
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034517719872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Shigeki, Hoshino Hiroaki, Yoshida Kazuma, Nakanishi Jun, Tsuchiya-Hirata Shizu, Kobuke Seiji, Haruyama Naoto, Nishimura Fusanori, Shiba Hideki	4. 巻 495
2. 論文標題 Genome-wide identification of chromatin-enriched RNA reveals that unspliced dentin matrix protein-1 mRNA regulates cell proliferation in squamous cell carcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 2303 ~ 2309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakanishi Jun, Suzuki Shigeki, Yoshida Kazuma, Hirata-Tsuchiya Shizu, Haruyama Naoto, Yamada Satoru, Shiba Hideki	4. 巻 110
2. 論文標題 Dentin phosphoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced macrophage activation independent of its serine/aspartic acid-rich repeats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 104634 ~ 104634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2019.104634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中西正光、春山直人、呉本晃一、高橋一郎
2. 発表標題 唾液腺におけるストア作動性 Ca <sup>2+</sup> 流入の異常は唾液分泌量を減少させる
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 春山直人、野村俊介、石井加奈子、要 匡、野口健志、吉崎恵悟、高橋一郎
2. 発表標題 過大な上下顎歯槽部高および永久歯萌出遅延を伴う頭蓋骨幹端骨異形成症の1例
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口有香、南館崇夫、春山直人、高橋一郎
2. 発表標題 川口有香、南館崇夫、春山直人、高橋一郎. 下顎前突症患者における顎態および咬合と口腔関連Quality of Lifeとの相関
3. 学会等名 第14回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村俊介、春山直人、野口健志、林田裕子、辻恭子、吉崎恵悟、高橋一郎
2. 発表標題 口蓋裂を伴う下顎後退による骨格性 級症例に対して機能的顎矯正装置を適用した2症例
3. 学会等名 第14回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠 法子、春山直人、古川雄亮、中西正光、星健治、寺尾文恵、高橋一郎
2. 発表標題 矯正学的な歯の移動により歯根膜に誘導されるオートファジーに関する研究
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湯田智美、春山直人、宮崎佳奈子、高橋一郎
2. 発表標題 多数の形態異常歯を有し骨格性III級を呈する6番染色体p24-25部分モノソミー患者の1例
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 春山直人、高橋一郎
2. 発表標題 両側横顔裂(Tessier分類7)に副顎を伴った両側口唇顎裂患者1例の臨床的特徴
3. 学会等名 第37回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南館崇夫、春山直人、野村俊介、野口健志、吉崎恵悟、高橋一郎
2. 発表標題 顎裂骨移植術が患者の生活の質(QoL)に与える影響について
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会 / ICPF CLEFT2019合同学術集会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruyama N, Nomura S, Noguchi K, Yoshizaki K, Mitsuyasu T, Suzuki A, Nakamura S, Takahashi I.
2. 発表標題 A patient with bilateral cleft lip and alveolus associated with bilateral Tessier no. 7 clefts and accessory maxillae
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of The Japanese Teratology Society / The 13th World Congress of The International Cleft Lip and Palate Foundation - CLEFT 2019 - (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南館崇夫、春山直人、野村俊介、野口健志、林田裕子、吉崎恵悟、高橋一郎
2. 発表標題 顎裂骨移植術が患者の生活の質(QoL)に与える影響について
3. 学会等名 第43回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大洞 將嗣 (Oh-hora Masatsugu)  (40351506)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・先任准教授  (32620)	
研究分担者	寺尾 文恵 (Terao Fumie)  (10510018)	九州大学・歯学研究院・助教  (17102)	
研究分担者	吉崎 恵悟 (Yoshizaki Keigo)  (10507982)	九州大学・歯学研究院・助教  (17102)	
研究分担者	二階堂 まりこ(梅田まりこ) (Nikaido Mariko)  (40707618)	九州大学・大学病院・学術研究員  (17102)	削除：2018年3月28日