

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17262

研究課題名(和文)細胞接着因子 PKP1によるWntシグナル経路を介した新規転写調節機構の解明

研究課題名(英文)The analysis of PKP1 as a novel transcriptional factor via Wnt signal pathway

研究代表者

宮崎 佳奈子(MIYAZAKI, KANAKO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30778840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間接着は上皮細胞の分化および増殖の制御に関わっている。これまでにデスモゾーム構成因子であるPlakophilin 1 (PKP1)が歯原性上皮細胞の密着結合に局在している可能性を示してきたが、その詳細は不明であった。本研究では、歯原性上皮幹細胞株においてPKP1遺伝子欠損細胞株を作製し、細胞間接着が脆弱化すること、密着結合構成因子ZO-1の細胞膜局在が阻害されること、さらにその阻害が外因性PKP1によって回復することを示した。PKP1は密着結合においてPKP1-ZO-1複合体を形成し、ZO-1の局在を調節して細胞間接着に重要な役割を果たしている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科医学の最終目的は、歯を含む口腔諸器官の再生メカニズムの解明とその臨床応用である。本研究により、外胚葉異形成症原因遺伝子の一つであるPKP1が細胞膜において密着結合構成因子ZO-1の局在制御を通してエナメル芽細胞分化制御を担っている可能性を発見した。これにより新たなエナメル芽細胞分化制御機構の解明の進展が期待される。こうした歯の分化メカニズムを厳密に制御していくことが歯の再生やエナメル質の形成を可能にすると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In previous study, we identified a desmosomal protein PKP1 localized at the tight junction in dental epithelial cells. In this study, we analyzed the mechanism of PKP1 in cell-cell junctions in dental epithelial cells. To investigate the mechanisms of PKP1, we constructed PKP1 knock out cells (KO) by CRISPR/Cas9 system. PKP1 KO cells showed that the localization of ZO-1 to plasma membrane was disturbed. Transfected PKP1-EmGFP rescued ZO-1 distribution in plasma membrane. These data suggest that PKP1 localizes at tight junction and forms complex with ZO-1. PKP1 may play an important role for cell-cell adhesion regulating ZO-1 localization in plasma membrane.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯 細胞間接着因子 エナメル芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の形態形成は上皮-間葉相互作用によって始まる。歯は肺、腎臓、唾液腺および毛などと同様に、上皮-間葉相互作用により形成され、歯の表面を覆うエナメル質は歯原性上皮細胞がエナメル芽細胞へ分化することでエナメルマトリックスが分泌され、高度に石灰化して形成される。近年、歯は歯の上皮および間葉細胞を用いて歯胚の再構築が可能であることが示された。しかしながら、歯の再生は、そのかたちの複雑さから未だに困難であり、歯がかたちづくられる過程を解明し、制御することができれば歯の再生に一步近づくと考えられる。

2. 研究の目的

歯科医学の最終目的は、歯を含む口腔の器官再生メカニズムの解明とその臨床応用である。申請者はこれまでの研究で、外胚葉異形成症原因遺伝子である PKP1 が①歯原性上皮細胞増殖期に核内移行し Wnt シグナル調節因子として細胞増殖に働くこと、②エナメル芽細胞分化期では細胞膜において ZO-1 と協調しながら細胞形態を制御し、エナメル芽細胞分化に重要な役割を果たしていることを発見し、PKP1 が歯原性上皮細胞の分化および細胞増殖を制御している可能性を示した。しかしながら、PKP1 の形態形成に与える詳細な機能は未だ不明である。そこで、本研究では PKP1 を用いた新たなエナメル芽細胞分化制御機構の解明を目的とし解析を行った。

3. 研究の方法

申請者は PKP1 が細胞膜において密着結合関連因子である ZO-1 と結合し、その局在を制御しエナメル芽細胞分化を調節している可能性を示した。しかしながら、ZO-1 遺伝子欠損マウスは胎生致死であるため、エナメル芽細胞分化に与える影響の詳細は不明である。そこで PKP1-ZO-1 複合体によるエナメル芽細胞分化制御の可能性を検証した。

(1) 胎生 11 日齢 (Embryonic day 11) - 生後 7 日齢 (Postnatal day 7) マウス 歯胚を実体顕微鏡下にて摘出し、total RNA を抽出、qRT-PCR 法にて発現パターンを解析した。また E13, E14, E16 および P1 マウス歯胚を用いて、免疫染色法にて PKP1 および ZO-1 の局在を確認した。

(2) 歯原性上皮細胞株 M3H1 細胞を用い PKP1 の局在変化の解析を行った。樹立した M3H1 は、恒常的に幹細胞マーカーを発現し、カルシウム添加により幹細胞が減少し、長期培養によってエナメル芽細胞へと分化する (Yoshizaki et al., *PLOS ONE* 2014)。同細胞に PKP1 siRNA 遺伝子導入を行い、PKP1 の機能解析を行うとともに、CRISPR/Cas9 システムを用いて PKP1 遺伝子欠損株 (PKP KO) を作成し、同様の解析を行った。

(3) PKP1 の細胞内局在をリアルタイムに検出するため、PKP1-GFP 融合発現ベクターを作製した。同発現ベクターを M3H1 細胞および PKP1 KO 細胞に遺伝子導入し、Ca²⁺ および Wnt 刺激を行い、GFP の局在変化を共焦点レーザー顕微鏡にて三次元的に観察した。

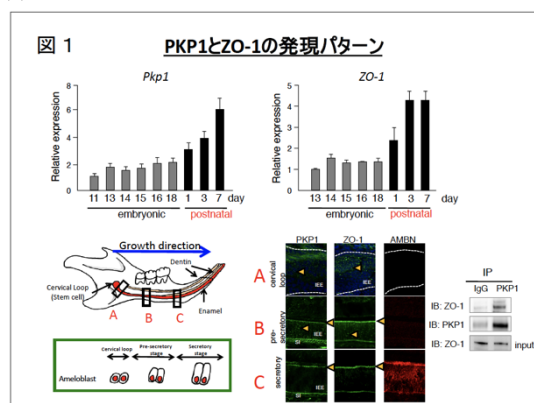
(4) PKP1 の抑制または欠損によって tight junction 関連接着因子 ZO-1 の細胞膜局在が阻害されたため、免疫沈降法により細胞膜分画における PKP1 と ZO-1 の結合の有無を確認した。

(5) エナメル芽細胞分化への影響を確認するため、M3H1 および PKP1 KO 細胞株を培養し、total RNA を抽出、qRT-PCR 法にてエナメル芽細胞分化マーカーである Ameloblastin (Ambn) を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 歯の発生における PKP1 の発現パターン解析

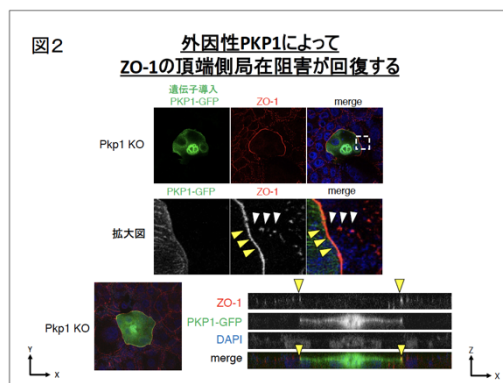
歯の発生時期における PKP1 および ZO-1 の発現パターンを解明するため、qRT-PCR 法および免疫染色法にて解析を行った。PKP1 は mRNA レベルでは歯の発生初期である E11 より発現を開始し、歯の発生ステージが進むにつれて発現量が増加した (図 1)。ZO-1 はエナメル芽細胞分化期から発現量が増加した。次に、免疫染色法にて局在を確認したところ、PKP1 は形態形成期である発生初期においては歯原性上皮細胞の細胞質に局在していたが、エナメル芽細胞分化期になると細胞膜に点状に局在ようになった。このとき、tight junction 構成因子である ZO-1 も同様の局在パターンを示した。



(2) 歯原性上皮細胞における PKP1 の細胞内局在の解析

PKP1 は desmosome を構成する細胞間接着分子であり、エナメル芽細胞の分化が進むにつれて細胞膜に局在する。歯原性上皮幹細胞株である M3H1 細胞において Ca²⁺ 存在下では細胞間接着部位に PKP1 の局在が認められた。このとき、PKP1 siRNA を遺伝子導入すると tight junction 関

接着因子 ZO-1 の細胞膜局在が阻害された。さらに免疫沈降法により PKP1 と ZO-1 の結合を確認した。詳細を確認するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて PKP1 遺伝子欠損細胞株 (PKP1 KO) を作製したところ、PKP1 KO 細胞株では Ca^{2+} 存在下で細胞間接着部位が脆弱になり、ZO-1 の細胞膜局在が阻害された。また、PKP1 KO 細胞株に PKP1-EmGFP 発現ベクターを遺伝子導入したところ、ZO-1 の細胞膜局在が回復し、外因性 PKP1 と共局在を示した (図 2)。さらに PKP1 と ZO-1 の局在を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元的に確認したところ、PKP1 と ZO-1 は上皮細胞の頂端側において共局在を示した。



(3) PKP1 のエナメル芽細胞分化への影響

M3H1 および PKP1 KO 細胞株に Ca^{2+} を添加して 2 週間培養し、分化に与える影響を RT-qPCR 法で確認したところ、分化マーカーである *Ambn* の発現の現象を認めたため、PKP1 が ZO-1 の局在制御を介してエナメル芽細胞分化に関与している可能性が示唆された。

以上より、PKP1 は歯原性上皮細胞において desmosome だけでなく tight junction にも局在し、PKP1-ZO-1 複合体を形成することが判明した。さらに細胞膜において、ZO-1 の局在を調節することで、細胞間接着に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。また、PKP-1 と ZO-1 は複合体を形成し、エナメル芽細胞分化に関与している可能性を明らかにした。

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 2件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Xue Han, Keigo Yoshizaki, Tian Tian, Kanako Miyazaki, Ichiro Takahashi and Saytoshi Fukumoto. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Embryonic tooth germs dissection and ex vivo culture in mice. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bio-protocol. | 6. 最初と最後の頁 e3515 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.3515 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Funada K, Yoshizaki K, Miyazaki K, Han X, Yuta T, Tian T, Mizuta K, Fu Y, Iwamoto T, Yamada A, Takahashi I, Fukumoto S. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 microRNA-875-5p plays critical role for mesenchymal condensation in epithelial-mesenchymal interaction during tooth development. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific reports | 6. 最初と最後の頁 4918 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61693-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Han Xue, Yoshizaki Keigo, Miyazaki Kanako, Arai Chieko, Funada Keita, Yuta Tomomi, Tian Tian, Chiba Yuta, Saito Kan, Iwamoto Tsutomu, Yamada Aya, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi | 4. 巻 293 |
| 2. 論文標題 The transcription factor NKX2-3 mediates p21 expression and ectodysplasin-A signaling in the enamel knot for cusp formation in tooth development | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 14572 ~ 14584 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.003373 | 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 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 傅堯、宮崎佳奈子、吉崎恵悟、湯田智美、韓雪、鮎田啓太、田甜、水田敢士、福本敏、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 デスモゾーム構成因子PKP 1は歯原性上皮細胞の密着結合においてZO-1の局在を制御する |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田甜、吉崎恵悟、韓雪、宮崎佳奈子、鮎田啓太、湯田智美、水田敢士、傅堯、福本敏、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 Nkx 2 - 3 は歯の発生においてEDA/EDARシグナル伝達経路を介してp21の転写制御を行い歯の咬頭形成を制御する |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鮎田啓太、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、韓雪、湯田智美、田甜、水田敢士、傅堯、福本敏、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 microRNA875-5pは歯の発生においてPDGFシグナルを介して上皮-間葉相互作用を制御する |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮崎佳奈子、吉崎恵悟、傅堯、韓雪、鮎田啓太、田甜、湯田智美、水田敢士、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 PKP 1 の歯原性上皮細胞における密着結合因子ZO-1の局在制御機構 |
| 3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鮎田啓太、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、韓雪、田甜、湯田智美、水田敢士、傅堯、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 microRNA-875-5pはPDGFシグナル経路を介して歯の上皮-間葉相互作用を制御する |
| 3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 宮崎佳奈子、吉崎恵悟、湯田智美、韓雪、新井智映子、鮎田啓太、田甜、福本敏、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 PKP1 は歯原性上皮細胞において密着結合構成因子 ZO-1 の局在を制御する |
| 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 鮎田啓太、吉崎恵悟、韓雪、宮崎佳奈子、新井智映子、湯田智美、田甜、福本敏、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 歯に特異的に発現する microRNA-875 の同定および歯の発生における役割 |
| 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 韓雪、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、新井智映子、鮎田啓太、湯田智美、田甜、福本敏、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 歯の咬頭形成におけるホメオボックス転写因子 Nkx2-3 の役割 |
| 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 鮎田啓太、吉崎恵悟、韓雪、宮崎佳奈子、新井智映子、湯田智美、田甜、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 歯特異的microRNA-875は歯の発生において歯原性間葉細胞の凝集を誘導する |
| 3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 1. 田甜、吉崎恵悟、韓雪、宮崎佳奈子、新井智映子、鮎田啓太、湯田智美、高橋一郎 |
| 2. 発表標題 ホメオボックス転写因子Nkx2-3による歯の咬頭形成制御機構 |
| 3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会 |
| 4. 発表年 2018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 |
| | | |