

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10228

研究課題名（和文）口腔のQoLに影響を与えるカルシウムチャネルopathiesの病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of the calcium channelopathies affecting oral health-related QoL.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、口腔のQoLに影響を与えるカルシウムチャネルopathiesの病態を解明するため、上皮特異的な Stim1/2遺伝子変異マウスを作成し、表現型解析をおこなった。その結果、Stim1/2変異マウスでは唾液分泌量低下のみならず、唾液中の塩化物イオン濃度が変化していることが示された。これらの結果は、唾液腺細胞のストア作動性カルシウム流入機構の異常が唾液中の塩化物イオン濃度に影響を及ぼし、原唾液誘導を変化させることで唾液分泌量を減少させている可能性を示唆する。加えて、Stim1/2変異マウスでは、ストア作動性カルシウム流入機構の異常が表皮のバリア機能も変化させていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が作出したマウスは、対象となる唾液腺および皮膚組織におけるカルシウムチャネルopathiesの病態解明に向けて利用可能な有用なモデルとなりうることが確認できた。またこのモデルを解析して得られた成果は、カルシウムチャネルopathiesの中でも特に解明が立ちおけている、ストア作動性カルシウム機構の異常がもたらす、唾液腺機能異常による口腔乾燥症や、口腔上皮を中心とした上皮分化・創傷治癒の役割について、その理解と治療につながる有益な情報になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we generated epithelial-specific Stim1/2 mutant mice and performed phenotypic analysis to elucidate the pathogenesis of calcium channelopathies that affect oral health-related QoL. The results showed that Stim1/2 mutant mice not only had decreased volume of salivary secretion but also had altered chloride ion concentrations in saliva. These results suggest that impaired SOCE may affect chloride ion concentrations and alter primary salivary induction, resulting in decreased salivary secretion. In addition, abnormal SOCE also altered epidermal barrier function in Stim1/2 mutant mice, suggesting that calcium ion is critical for epidermal homeostasis.

研究分野：歯科矯正学

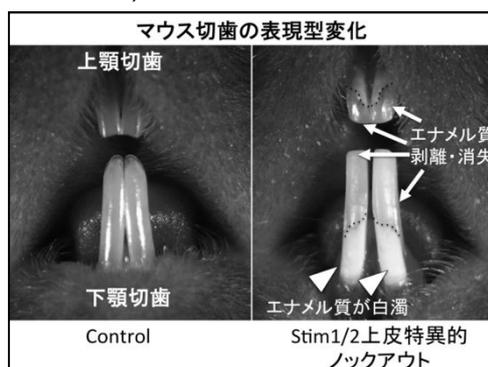
キーワード：ストア作動性カルシウム流入 STIM1 カルシウムイオン 唾液腺 QoL 皮膚

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、イオンチャンネルが疾患に関連している例が多数報告されており、それら疾患の概念を総称して「チャネロパチー」と呼ぶことが提案されている。中でも、カルシウムイオン (Ca^{2+}) チャンネルを通過して細胞内に取り込まれる Ca^{2+} は細胞内シグナル伝達物質として古くから着目され、神経・筋関連疾患を中心に数多くの研究がなされてきた。特に最近のトピックとしては、細胞内 Ca^{2+} 濃度調節に関連した STIM 遺伝子と ORAI 遺伝子ファミリーの同定がある。このうち STIM 遺伝子ファミリーから作られる STIM1/2 タンパクは小胞体膜状に存在し、小胞体内に貯蔵されている Ca^{2+} 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ンネルであり、小胞体内の Ca^{2+} 減少を感知した活性化 STIM と結合することで、 Ca^{2+} を細胞内に流入させるチャンネルを形成する役割を持つ。この細胞内 Ca^{2+} 濃度調整メカニズムをストア作動性カルシウム (Ca^{2+}) 流入 (SOCE) といい、以前からその存在は知られていたが、STIM と ORAI がその主体となる分子であると判明して以降、その機能異常に伴う「カルシウムチャネロパチー」の機構解明は、国際的にますます活発に研究がなされている分野である。

SOCE 関連分子であるこの STIM1 のヒトにおける機能不全は、筋力低下のみならず免疫不全・エナメル質形成不全症を示す (N Engl J Med. 2009; 360:1971-80.)。また、ORAI1 の機能不全は筋障害のみならず、免疫不全・無汗型外胚葉形成不全・口蓋裂を示すという報告がある (J Allergy Clin Immunol. 2009; 124:1311-7.)。この疾患の動物モデルを用いた報告では、これまで応募者が行った研究を含め、STIM1/2 および ORAI1 の機能異常を示すマウスにおいて、ヒトに見られたエナメル質形成不全症が再現できることがわかっている (J Dent Res. 2017; 96(12):1422-1429 (右図), JCI Insight. 2017; 2:e91166, Sci Signal. 2019; 23:12(578))。しかし、口腔関連組織における SOCE の役割、および SOCE の異常と表現型発現の関連についての詳細なメカニズムは、未だ十分に解明されてはいない。



2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔の QoL に影響を与えるカルシウムチャネロパチーの病態の解明である。具体的には、我々が独自に作出した、上皮特異的に STIM1/2 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (*Stim1/2 cKO*) を用いて、その表現型をもたらすメカニズムを解明することである。カルシウムチャネロパチーの中でも特に解明が立ちおけている、唾液腺機能異常による口腔乾燥症や、口腔上皮を中心とした上皮分化・創傷治癒の役割について、その理解と治療につながる有益な情報を得ることが期待でき、下記の方法にて研究を実施した。

3. 研究の方法

本研究では、口腔の QoL に影響を与えるエナメル質形成不全や唾液腺分泌の機能異常に関連したカルシウムチャネロパチーの病態を解明するため、皮特異的に STIM1/2 遺伝子欠損マウス (*K14-Cre+; Stim1/2 cKO*) (実験群) および *Stim1/2^{fl/fl}* (対照群) マウスを用いて

- 1) in vivo での唾液腺・毛・表皮の表現型解析
- 2) エナメル芽細胞・唾液腺・表皮の細胞培養系による ex vivo / in vitro での細胞内 Ca^{2+} 蛍光イメージングとシグナル伝達の分子生物学的解析 を軸に研究を実施した。

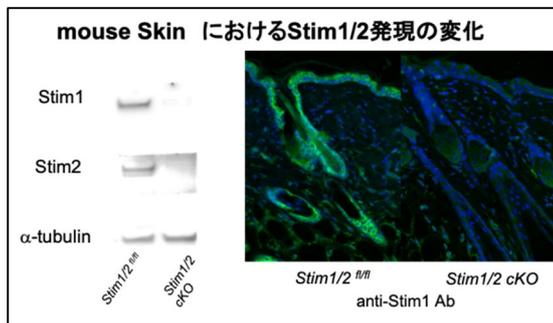
4. 研究成果

(1) 上皮組織における SOCE 変化

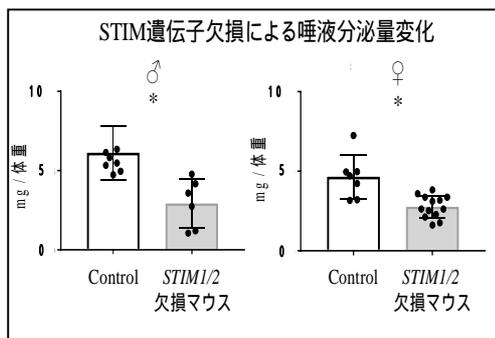
はじめに、唾液腺組織および皮膚組織(上皮)細胞において、実際に SOCE が変化していることを確認した。唾液腺および皮膚組織から細胞を酵素処理にて単離し、細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の有無を分光分析装置 (FlexStation3) にて、蛍光色素 Fura-2 の蛍光強度を指標として定量的に計測した。その結果、*Stim1/2 cKO* では、対照群である *Stim1/2^{fl/fl}* と比較して、唾液腺組織および皮膚組織における SOCE が減少していることが確認できた。このことから、このマウスは対象となる唾液腺および皮膚組織におけるカルシウムチャネロパチーの病態解明に向けて利用可能な有用なモデルとなりうることを確認できた。

(2) in vivo における唾液腺・毛の表現型

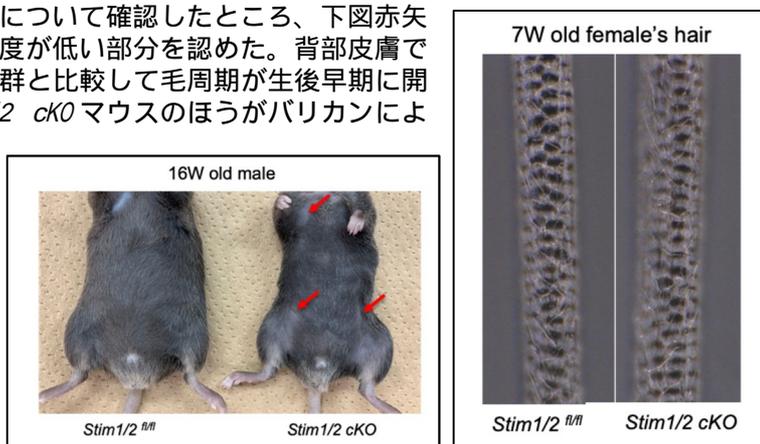
次に *Stim1/2 cKO* の唾液腺・毛を含めた表皮の表現型解析を実施した。唾液腺構造を HE 染色により組織学的に解析したが、*Stim1/2^{fl/fl}* と比較して遺伝子型による唾液腺の形態に有意な差は見られなかった。蛍光免疫組織化学染色を実施したところ、唾液腺細胞および皮膚の基底層に強く *Stim1* タンパク質の局在が見られたが、*Stim1/2 cKO* マウスでは、*Stim1/2^{fl/fl}* と比較して蛍光強度が低下していた(右図は皮膚)。次いで、水チャネルのアクアポリン 5 やカルシウム活性化塩化物イオンチャネル(CACC)等の局在・発現を唾液腺における免疫組織化学染色や QPCR にて確認したところ、いずれも遺伝子型による発現量の違いは認められなかった。



一方、*Stim1/2 cKO* マウスにおいて、唾液分泌量および唾液組成変化の有無を唾液採取により解析したところ、対照群と比較して唾液分泌量が減少していた(右図)。また唾液中の塩化物イオン濃度が変化していることが示唆された。これらの結果から、SOCE の異常は、唾液腺の Ca^{2+} 濃度変化による下流シグナルの変化や過去に報告されている水チャネルの発現量変化によるものではなく、 Ca^{2+} 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、原唾液誘導を変化させることで唾液分泌量を減少させる可能性が示唆された。



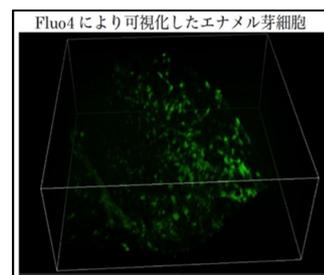
次に、毛に関してその表現型について確認したところ、下図赤矢印で示すように、腹部の毛の密度が低い部分を認めた。背部皮膚では、*Stim1/2 cKO* マウスは対照群と比較して毛周期が生後早期に開始していることが多く、*Stim1/2 cKO* マウスのほうがバリカンによる剃毛が容易であったことから、毛質が脆弱な可能性が考えられた。よって、毛の質に変化が認められるか否かを確認するため、剃毛後の毛の構造を顕微鏡にて確認したところ、予想に反して有意な差は認められなかった(右図)。毛における表現型の違いに関しては、その理由を明らかにすべく引き続き解析を継続する予定である。



さらに、*Stim1/2 cKO* マウスにおける上皮増殖分化に対する SOCE 変化の影響を確認するため、表皮創傷治癒について解析した。直径 4 ミリの生検用トレパンを用いて背部皮膚全層欠損を左右 2 箇所作成し、その翌日より欠損部の直径を麻酔下にて 3 日ごと 10 日間経時的に観察を実施した。その結果、*Stim1/2 cKO* マウスと対照群マウスにおける上皮化(創傷治癒過程)に、有意な変化がないことが予備的な実験にて示された。また、皮膚組織から単離した上皮細胞の遊走および増殖速度を細胞培養にてスクラッチアッセイにて確認したが、遺伝子型による差はないことが示唆されたところから、SOCE は上皮(表皮)組織の増殖分化に決定的な違いはもたらさない可能性が示された。

(3) *Stim1/2 cKO* マウスとその対照群由来のエナメル芽細胞、唾液腺細胞、上皮細胞の共焦点顕微鏡による Ca^{2+} 濃度の蛍光リアルタイムイメージング

蛍光イメージング解析により、単離した細胞における Ca^{2+} ウェーブや Ca^{2+} オシレーションといった特徴的な Ca^{2+} 動態に変化を起こすか否かを、個々の細胞のマイクロイメージングで確認した。マウスエナメル組織(エナメル芽細胞)あるいは単離した唾液腺・上皮細胞にカルシウム指示薬を付加して蛍光比変化を多光子顕微鏡下あるいは共焦点顕微鏡下でそれぞれ観察した。エナメル芽細胞においては、細胞を組織から単離した場合細胞機能に変化が生じる可能性が高いため、組織ごと画像取得する試みを多光子顕微鏡を用いて実施した(上図)。画像取得には成功したものの、厚みのある組織であるため良好な結果を得



るまでには至らず、引き続き条件検討中である。一方、唾液腺細胞では、単離した細胞は接着力が弱く長時間の観察が困難であることがわかったため、こちらについても引き続き条件検討中である。また、皮膚においては単離した細胞における Ca^{2+} 濃度の蛍光リアルタイムイメージングを共焦点顕微鏡にて実施し、遺伝子型による明確な Ca^{2+} 濃度上昇速度の違いを 1 細胞レベルで観察することができた。

(4) SOCE の異常がチャネルパッチを引き起こす分子メカニズムの解明

小胞体内の Ca^{2+} 濃度低下は小胞体ストレスをもたらす可能性が示唆されている。小胞体ストレスの最終結果としてのアポトーシス発生が惹起されているか否かを、皮膚における TUNEL 染色で組織学的に確認した。その結果、遺伝子型の違いにアポトーシスを引き起こしている細胞数の違いがないことが判明した。引き続き、蛍光免疫組織化学染色にて BiP/GRP78、IRE \cdot PERK \cdot ATF6 の局在や発現量に変化がないかを、唾液腺組織も含めて確認中である。また、皮膚組織を用いた pPCR の結果、*Stim1/2 cKO* マウス表皮において表皮分化マーカーである filaggrin とその分解酵素 *Asprv1* の発現が上昇し、皮膚産生サイトカインである TSLP の発現も有意に上昇していた。以上の結果から、Stim 分子は SOCE を変化させることで炎症に関与し、表皮のバリア機能を変化させていることが推察された。

これらの研究結果から、再生 \cdot 唾液腺機能異常による口腔乾燥症について、その発症の理解と治療にカルシウムチャネルパッチが関わっている可能性が示され、新規治療法につながる有益な情報を得ることができた。また、今後、皮膚において SOCE の重要性を明らかにできれば、SOCE が新たな創傷治癒 \cdot 上皮バリア制御のターゲットとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haruyama Naoto, Yamaza Takayoshi, Suzuki Shigeki, Hall Bradford, Cho Andrew, Gibson Carolyn W., Kulkarni Ashok B.	4. 巻 16
2. 論文標題 Leucine rich amelogenin peptide prevents ovariectomy-induced bone loss in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0259966
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0259966	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 該当する
1. 著者名 Tsuji Kyoko, Haruyama Naoto, Nomura Shunsuke, Murata Naohisa, Yoshizaki Keigo, Mitsuyasu Takeshi, Nakano Hiroyuki, Nakamura Seiji, Mori Yoshihide, Takahashi Ichiro.	4. 巻 9
2. 論文標題 Characteristics of craniofacial morphology and factors affecting them in patients with isolated cleft palate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PeerJ	6. 最初と最後の頁 e11297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7717/peerj.11297	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 春山 直人, 鈴木陽, 野口健志, 野村俊介, 吉崎恵悟, 落合聡, 笹栗正明, 光安岳志, 森山雅史, 中村典史, 高橋一郎.	4. 巻 37
2. 論文標題 両側性口唇顎裂ならびに上顎両側臼歯部に複数の副顎を伴う両側性横顔裂（Tessier分類7型）患者の臨床的特徴 - 出生から14歳までの経過観察 -	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本頭蓋顎顔面外科学会誌	6. 最初と最後の頁 16～26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32154/jjscmfs.37.1_16	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 Minamidate Takao, Haruyama Naoto, Inoue Ayako, Nomura Shunsuke, Noguchi Kenshi, Yoshizaki Keigo, Takahashi Ichiro	4. 巻 162
2. 論文標題 Quality of life in preadolescent orthodontic patients before and after secondary alveolar bone grafting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics	6. 最初と最後の頁 e267～e276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajodo.2022.08.012	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 南館崇夫, 春山直人, 井上綾子, 野村俊介, 野口健志, 吉崎恵悟, 高橋一郎.
2. 発表標題 二次的顎裂部骨移植術の前後における矯正治療患者における生活の質(QoL).
3. 学会等名 第17回九州矯正歯科学会学術大会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺尾文恵, 春山直人, 北原亨, 森悦秀, 高橋一郎.
2. 発表標題 創外型骨延長装置を用いた上顎骨前方部の前下方への骨延長術を適用した両側性唇顎口蓋裂の1例.
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川卓也, 春山直人, 鈴木陽, 三島木節, 依田哲也, 高橋一郎, 森山啓司.
2. 発表標題 長期にわたり矯正歯科的管理を行った視覚障害を有する片側性口唇口蓋裂の1例.
3. 学会等名 第45回 日本口蓋裂学会総会・学術集会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 炭本雄基, 山田朋弘, 吉濱直哉, 大山順子, 杉山悟郎, 今城育美, 田尻姿穂, 鎌田裕, 春山直人, 野村俊介, 野口健志, 高橋一郎, 森悦秀.
2. 発表標題 顎裂患者に対する粘膜移植を併用した口腔前庭拡張術の有用性.
3. 学会等名 第45回 日本口蓋裂学会総会・学術集会.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoto Haruyama, Takao Minamidate, Ayako Inoue, Shunsuke Nomura, Kenshi Noguchi, Keigo Yoshizaki, Ichiro Takahashi.
2. 発表標題 Quality of life in preadolescent orthodontic patients before and after secondary alveolar bone grafting.
3. 学会等名 The 14th International Cleft Congress. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 春山直人、石井加奈子、野村俊介、日浦秀暢、高橋一郎。
2. 発表標題 高口蓋と重度叢生および多数歯短根を呈するLehman症候群の1症例。
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会。
4. 発表年 2022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示す成長期にある頭蓋骨幹端骨異形成症の1症例。
3. 学会等名 第2回せとうち臨床遺伝研究会。
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Tooth Protein Prevents Bone Loss in Mice https://www.nidcr.nih.gov/news-events/nidcr-news/2022/tooth-protein-prevents-bone-loss-mice</p>
--

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	寺尾 文恵 (Terao Fumie) (10510018)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	NIDCR/NIH			