

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21017

研究課題名(和文)エナメル芽細胞極性化におけるp130Casの機能解明

研究課題名(英文)Elucidation of the function of p130Cas in ameloblast polarization

研究代表者

井上 茜 (Inoue, Akane)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：70967752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル質の形成に関わるエナメル芽細胞は、その分化過程において形態を変えながら機能を獲得していくことが知られている。エナメル芽細胞が分化するとエナメルマトリックスを1方向へ分泌するようになることから、極性化プロセスが重要である可能性が考えられる。これまでの研究で、p130Cas遺伝子がエナメル芽細胞の極性化に重要であることを示してきた。一方で詳細な分子機能は不明である。そこで、p130Cas遺伝子欠損細胞株を作製し、極性化をin vitro環境下で観察することで分子機序の解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯は上皮-間葉相互作用により形成される器官として知られており、複数の細胞種から形成されることから、その再生技術の開発は困難な状況にある。エナメル芽細胞はエナメル質を形成する上で、その極性化プロセスが重要であると考えられるが、その詳細な分子メカニズムは不明である。本研究の極性化解析モデルにより、新たな分子機序の解明に寄与できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ameloblast, which are involved in enamel formation, are known to undergo morphological changes and acquire function during their differentiation process. Since ameloblast secrete enamel matrix in one direction after differentiation, it is thought that the polarization process is important. Previous studies have shown that the p130Cas is important for the polarization of ameloblast. However, the detailed molecular function is unknown. In this study, a p130Cas knockout cell line is constructed and attempted to elucidate the molecular mechanism by observing polarization in an in vitro.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：エナメル芽細胞 極性化

1. 研究開始当初の背景

歯の発生において、エナメル芽細胞がエナメル質形成に重要な役割を果たすことが知られている。その分化過程において、歯原性上皮細胞は、丸みを呈した幹細胞から立方状の形態を経て、円柱状のエナメル芽細胞へとその形態を変化させる。分泌期になると、すべての細胞が一方向へとエナメルマトリックスを分泌するようになる。分泌されたエナメルマトリックスが高度に石灰化されることで、我々の体の中で最も硬い硬組織であるエナメル質が形成される。エナメル芽細胞は、象牙芽細胞との間に介在する基底膜側へとエナメルマトリックスを分泌することから、上下方向を認識しており、厳密な極性化の制御プロセスが存在している可能性が考えられるが、そのメカニズムは不明な点が多い。

これまでの研究で、p130Cas 遺伝子を上皮特異的に欠損させると、エナメル芽細胞の極性化の異常と思われる、エナメル芽細胞の多層化を認め、エナメル質形成不全を呈することを明らかにしてきた。p130Cas は細胞外環境からの情報により、上下方向を認識している可能性があり、その細胞極性化の決定に p130Cas が中心的役割を果たしている可能性が考えられる。しかしながら、これら極性化を担う詳細な分子メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

細胞極性は細胞の配置に重要な役割を果たしており、他の細胞と協調して機能を発揮するには、極性化に続く細胞分化が必須である。しかしながら、細胞極性に伴う細胞分化制御機構の解析には、その解析モデルが確立されておらず、詳細な分子機能の解析は困難な状況にある。本研究では、p130cas を介したエナメル芽細胞分化メカニズムを解析することで、細胞極性による新たな細胞分化制御機構の解明を目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) P130Cas 遺伝子欠損細胞株の作製

歯原性上皮細胞株 M3H1 細胞を用いて、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子改変を行い、p130Cas 遺伝子欠損細胞株を作製した。P130Cas (Bcar1) 遺伝子の exon2 を標的として、guide RNA を作製し、Cas9 タンパクとともに electroporation 法にて導入を行った。遺伝子配列のシーケンシングを行い exon2 領域の欠失を確認した。導入した細胞をセルソーターにて 1 細胞ごとに分離培養することで、p130Cas 遺伝子欠損細胞株を作製した。

(2) 免疫染色法

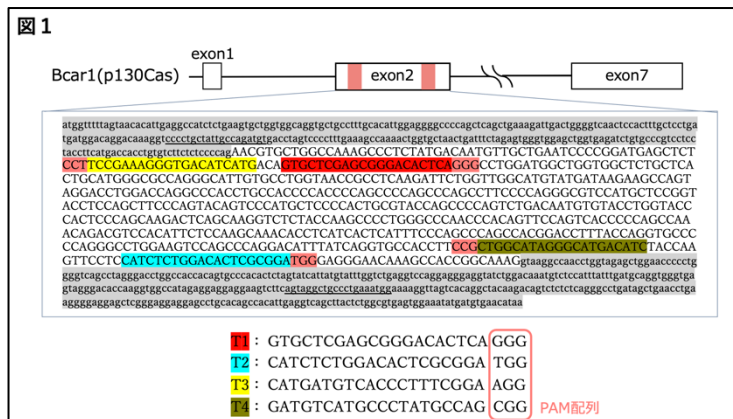
上記にて作製した細胞を 2 日間培養後、4%PFA にて固定を行なった。各種抗体を用いて免疫染色を行った。二次抗体は 488 抗 mouse, rabbit 抗体、594 抗 goat 抗体を用いて可視化した。

(3) Western blotting 法

M3H1 細胞を 2 日間培養後に Cell Lytic M を用いて細胞を溶解し、可溶分画のみ分取した。SDS-PAGE にて展開後、PVDF 膜にタンパク質を転写し、各種抗体にて Western blotting を行なった。目的タンパクの可視化には HRP 標識した 2 次抗体および ECL kit を用いた。

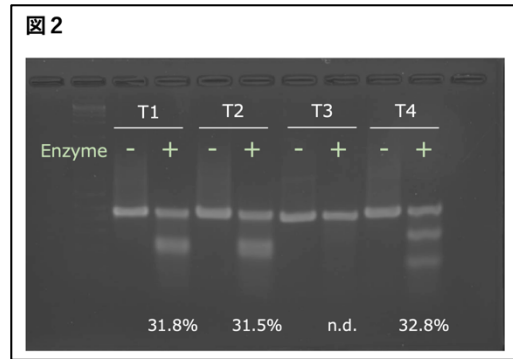
4. 研究成果

上皮特異的に p130Cas 遺伝子を欠損させたマウスのエナメル芽細胞は、細胞極性の乱れによる多層化を認め、エナメル質形成不全症を呈していた。この結果から、p130Cas がエナメル芽細胞の極性化に重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、詳細な分子機能を理解するには、より詳細な機能解析が必要となる。そこで、in vitro における機能解析を可能とするため、p130Cas 遺伝子欠損細胞株の作製を試みた。すでに研究室にて樹立した歯原性上皮細胞株 M3H1 細胞を用いて実験を行った。遺伝子欠損を誘導するために、CRISPR/Cas9 システムを用いることとした。p130Cas 遺伝子の exon2 を標的として、両端を切断



CRISPR/Cas9 システムを用いることとした。p130Cas 遺伝子の exon2 を標的として、両端を切断

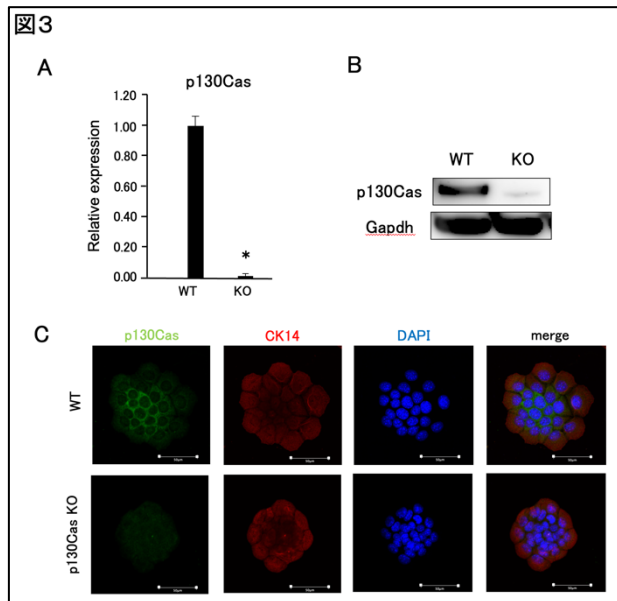
することで deletion を誘導するために、exon2 両端の 4 箇所に guide RNA を設計した (図 1)。



それぞれの guide RNA を Cas9 タンパクとともに electroporation 法にて遺伝子導入を行った。その後、DNA 切断効率の確認を行ったところ、T1, T2 および T4 の guide RNA にて約 30%の切断効率が認められたが、T3 では切断が認められなかった (図 2)。そこで、T1 および T4 の guide RNA を同時に遺伝子導入することで、exon2 の deletion を誘導した。遺伝子改変した M3H1 細胞をセルソーターにて 1 細胞へ単離し、培養を行い、12 個のクローンを作製した。得られたクローンで p130Cas の遺伝子欠損を確認するため、western blotting 法にて確認したところ、2 つのクローンにおいて、p130Cas タンパ

クの消失を認めた。次に exon2 の DNA を、PCR 法を用いてバンドサイズの確認を行った。電気泳動の結果、1 つのクローンにおいて、PCR バンドがシフトし、DNA サイズが短くなっていることが確認された。以上の結果から、1 つのクローンにおいて、p130Cas 遺伝子の exon2 欠失に伴う遺伝子欠損細胞株の作製に成功した。

得られたクローンを p130Cas 遺伝子欠損細胞株 (KO) と定義し、M3H1 コントロール細胞株 (WT) と比較検討を行った。RT-qPCR 法を用いて、p130Cas の mRNA レベルの発現を確認したところ、KO では発現の低下を認めた (図 3A)。さらに western blotting 法にてタンパクレベルの発現を確認したところ、発現の低下を認めた (図 3B)。次に、免疫染色法を用いて細胞形態の比較を行った (図 3C)。WT では p130Cas が細胞質に局在していた。一方で、KO において、p130Cas の消失を認めた。抗 CK14 抗体にて細胞形態の可視化を行ったところ、WT では敷石状の上皮細胞様の形態を示していたが、KO では細胞形態が丸みを帯びており、細胞の配列の乱れを認めた。さらに、M3H1 コントロール細胞は、分化誘導を行うと、丸みを帯びた形態から敷石状の形態へと変



化し、上皮細胞の形態変化を伴う分化過程を示した。一方で、p130Cas 遺伝子欠損細胞株に分化誘導を行うと、細胞の多層化を伴う細胞極性化の乱れを認めた。この結果は、極性化を伴うエナメル芽細胞分化過程において、p130Cas が調節因子として働く可能性を示すものであり、本細胞株を解析ツールとして用いることで新たな分子機序の解明につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川原 純平, 吉崎 恵悟, 湯田 智美, 井上 茜, 宮崎 佳奈子, 田 甜, 自見 英治郎, 高橋 一郎
2. 発表標題 エナメル芽細胞極性化におけるp130Casの機能解析
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川原 純平, 吉崎 恵悟, 湯田 智美, 井上 茜, 宮崎 佳奈子, 田 甜, 韓 涛, 自見 英治郎, 高橋 一郎
2. 発表標題 p130Casはエナメル芽細胞分化過程において細胞極性を制御する
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------