

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592761

研究課題名(和文) 異種組織界面における水チャネル分子AQP1の存在意義の解明

研究課題名(英文) Immunolocalization of aquaporin1 on the interfaces between tissues with different physical properties

研究代表者

河野 芳朗 (Kawano, Yoshiro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60303129

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は物理的性質の異なる組織境界面に水チャネル分子であるアクアポリン-1 (AQP1)を強く発現する細胞群が存在することを発見し、その発生学的、および組織学的特徴を明らかにした。これらの異種組織境界のAQP1陽性細胞は、細胞骨格が未熟で巨大な細胞表面積/体積比を持つ全く新しいカテゴリーに分類(異種組織連結細胞)できる細胞であることが示唆された。歯科領域では無細胞セメント芽細胞と歯槽骨表層細胞がこれに相当した。これらの異種組織連結細胞に発現する結合組織性のAQP1は水分子輸送よりもむしろ、細胞の変形・運動に伴う細胞内外への水分子の移動に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin1 (AQP1) is a water channel protein previously identified in red blood cells and water transporting epithelia. The interfaces between tissues with different physical properties seem to be a harsh environment for the cells because of the continuous mechanical stresses caused by body action. In this study, AQP1 was found in specific cells on the interfaces between tissues which have different properties. These AQP1 positive cells on the interfaces showed poor cytoskeletons, and have big cell surface to cell volume ratios, and seem to belong to new cellular categories (different tissue connecting cells). In odontogenic cells, acellular cementblasts and alveolar bone surface cells express AQP1. It is suggested that AQP1 expressed in those stromal cells are involved in the movement of the cellular water molecules across the plasma membranes, when accompanying cellular deformations and movements, rather than water transportation.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：アクアポリン 歯根膜 歯槽骨

1. 研究当初の背景

生体は大きく上皮組織、結合組織、骨組織、筋組織、神経組織からなり、各組織は細胞の種類、および細胞外基質によって特徴付けられている。組織は通常、細胞が立体的（三次元的）配置され、複数の性質・物性の異なる組織が組み合わさることによって固有の機能を果たす器官を形成している。すなわち、異種組織の連結機構が生体の立体構造の構築には不可欠である。我々の研究グループはこれらの物理的性質の異なる組織の境界面にアクアポリン-1 (AQP1) を特異的に発現する細胞群が存在することを発見した。これら組織境界の AQP1 陽性細胞の特徴は、細胞の表面積/体積比が非常に大きく、細胞骨格が未熟なこれまでに全く報告のない新しいカテゴリーの細胞（異種組織連結細胞）に分類できることが示唆された。

AQP1 は非常に選択性の高い膜チャネルタンパクで、その重要性から単細胞生物から、動物、植物に至るまで広範な生物界に存在している。その構造は分子レベルで解明され、ポアサイズ 3 で、 H_2O 分子（ 2.8 \AA ）のみを 2×10^9 H_2O 分子/秒で通過させる。また哺乳類では、AQP1 タンパクは、尿管などの水分子の移動に関与する上皮細胞に発現し、生体内の区画間の水分子の輸送や浸透圧の調整に関わっていると考えられている。しかしながら、結合組織における恒常的な AQP1 の発現の体系的な報告は少なく、我々が提唱する異種組織連結細胞では区画間の水分子の輸送、あるいは浸透圧の調整のための水分子の移動に AQP1 が関与する可能性は少ないことから、これらの異種組織連結細胞における結合組織性の AQP1 の役割は全く解っていない。そこで我々は、AQP1 陽性細胞の正常発生に

おける組織学的特徴、および歯根膜細胞一次培養における AQP1 発現の変化の解析、さらに、生体における AQP1 の機能を解析する目的で AQP1 遺伝子欠損マウスの樹立を行った。

2. 研究の目的

(1) 物理的性質の異なる組織境界面の AQP1 陽性細胞のその発生的、および組織学的特徴を明らかにする。歯牙組織では無細胞セメント芽細胞と歯槽骨表層細胞がこれに相当するため、歯根膜の発生における AQP1 陽性細胞の細胞動態を明らかにする。

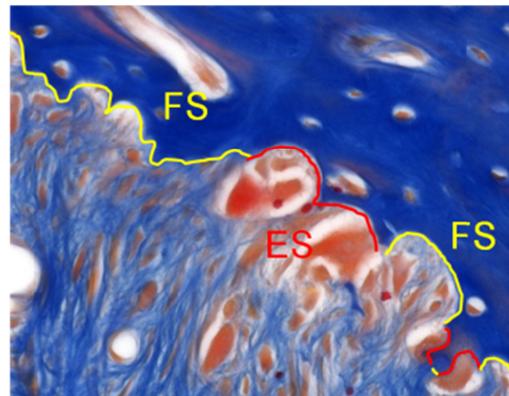
(2) 歯根膜細胞は石灰化誘導培地中で石灰化物を合成することが知られている。AQP1 の石灰化物合成における役割を解明するため、歯根膜細胞の石灰化物合成誘導における AQP1 の発現を解析する。

(3) これら正常状態での解析結果をふまえ、これらの細胞に発現する AQP1 が異種組織の連結においていかなる役割を果たすのかを解明するために、CRISPER/Cas9 システムを用いて AQP1 欠損マウスを作製する。

3. 研究の方法

(1) 骨形態計測解析

AQP1 陽性異種組織連結細胞（セメント芽



歯根膜組織形態計測プログラム上での計測

線維面: FS

吸収面: ES

細胞・歯槽骨表層細胞)の発生的な細胞動態を解析するために System Supply 社(伊那市;長野)と共同で独自に歯槽骨組織形態計測プログラムを開発し(Arch. Oral Biol; 2014)固有歯槽骨(束状骨)形成開始期の12日齢から3日毎に60日齢までの歯槽骨表面の性状変化を歯槽骨表面を線維面、破骨細胞面、骨芽細胞面(右図)に分類し連続切片上(50 μ m毎;6枚;n=5)で歯槽骨の発生を解析した。

(2) 歯根膜細胞の石灰化誘導実験における AQP1 の発現

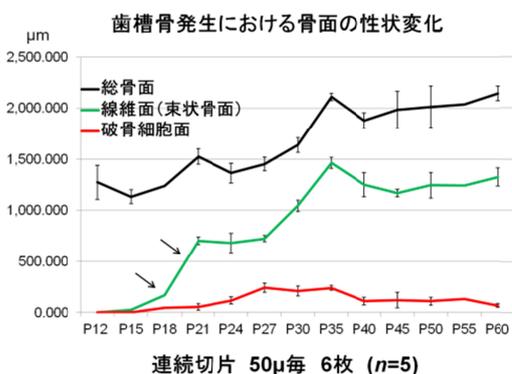
ラット歯根膜からアウトグロース法によって歯根膜細胞を取り出し、石灰化誘導をかけ、石灰化物形成における各種遺伝子発現の変化を real-time PCR 法によって経時的に観察した。

(3) AQP1 遺伝子欠損マウスの作製

CRISPER/Cas9システムを用いたゲノム編集法を用いて、AQP1 遺伝子欠損マウス(AQP1-KOマウス)を作成した。AQP1-exon1の中にガイドRNA候補4種類を決定し、Cas9発現ベクターを構築した。構築した4種類のベクターについて、HEK293T細胞内でのターゲット配列切断活性の評価を行った後、遺伝子切断効率の最も高いベクターを前核期受精卵にインジェクションし、AQP1 遺伝子欠損マウスを作製した。

4. 研究の成果

(1) AQP1 陽性細胞の歯根膜の発生における細胞動態



歯牙組織での異種組織連結は歯根膜が担っている。歯根膜は歯根側には無細胞セメント芽細胞、歯槽骨側には骨芽細胞、破骨細胞、線維芽細胞が存在し、両側とも石灰化硬組織(セメント質・歯槽骨)に歯根膜線維(シャープピー線維)が埋入している。

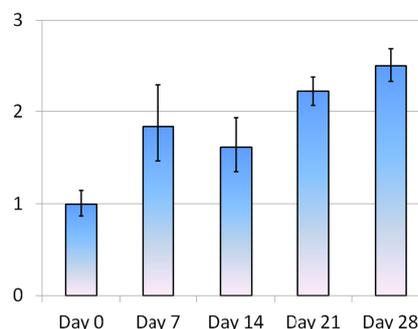
歯根膜にける異種組織連結を担う細胞はセメント芽細胞と歯槽骨表層細胞で、解析の結果、セメント芽細胞と歯槽骨表層細胞は共に AQP1 を強く発現し、大きな細胞表面積/体積比を持ち、細胞骨格の未熟な異種組織連結細胞の特性を備えていることが明らかになった。

歯周組織の発生の組織形態計測では、固有歯槽骨(線維面)の形成は AQP1 陽性組織連結細胞の出現とともに生後15日齢から急速に形成されることがわかった(上図; グラフ、矢印)。AQP1 陽性細胞は固有歯槽骨の形成に関与し、また、埋入線維の石灰化にも関与することが示唆された。

(2) 歯根膜細胞の石灰化における遺伝子発現の変化

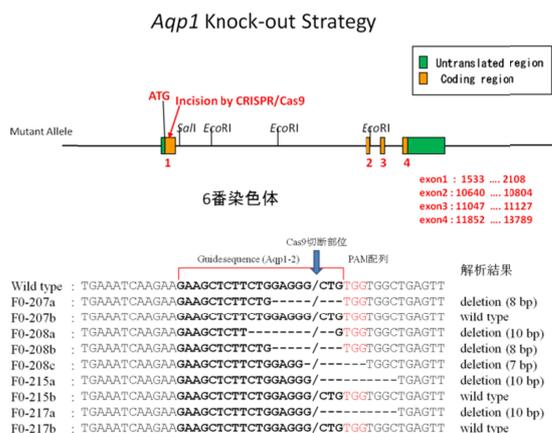
AQP1 免疫染色では石灰化誘導と共に AQP1 陽性細胞が凝集し、これらの細胞の凝集部分に石灰化物が形成された。AQP1 の遺伝子発現はアルカリフォスファターゼ(ALP)の発現上昇、および石灰化物の合成と共に上

AQP1-PDL



昇した。

(3)CRISPER/Cas9 システムを用いたゲノム編集法を用いた AQP1-KO マウスの作製



ファウンダーマウス4系統に含まれる遺伝子変異

AQP1-exon1 への遺伝子変異の導入し、17 系統の遺伝子変位を持つマウスの中からフレームシフトによる遺伝子欠損が期待できる 7、8、10 塩基欠損を持つ 4 系統の F0 マウスを作成した。4 系統中の遺伝子変異の解析結果を図に示す。これら 4 系統から F1 マウス作成の後、AQP1-KO マウスの樹立に成功した。

これまでの研究より、AQP1 は歯根膜、歯根膜線維の石灰化組織への埋入に深く関与していることが示唆された。また、AQP1 陽性異種組織連結細胞は組織境界でその物性の違いによる過大な機械的ストレスにさらされることが予想されることから、これらの細胞は AQP1 の発現によって、細胞内外への水分子の移動を容易にすることによって受動的な変形を容易にし、機械的ストレスを減衰している可能性が示唆された。また、近年の研究で、酵母細胞の AQP1 分子の C 末端にメカノセンサーの役割を果すドメインが存在する(Plos Biol; 2009)ことが報告され、これらの細胞に発現される AQP1 分子は組織境界におけるメカニカルストレスに対するセンサーの役割を担っている可能性も考えられる。

また、本研究ではこれらの仮説を検証する

ための介入実験を行うため、AQP1 遺伝子欠損マウス (AQP1-KO) を試み、その樹立に成功した。今後は、これまでに蓄積した野生型動物の実験データを基に、AQP1-KO マウスの表現形を組織学的・組織形態計測学的手法により解析し、野生型マウスと比較することによって結合組織性の AQP1 の役割を解明する。本細胞の存在はこれまで全く報告はなく、その研究成果は結合組織の全く新しい細胞カテゴリーを創造することになるとともに、AQP1 の新たな機能を解明するものものとなる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Mitomi T, Kawano Y, Kinoshita-Kawano, Effect of the antineoplastic agent busulfan on rat molar root development, Arch. Oral Biol., 59(1): 47-59, 2014 査読有り

[学会発表] (計 10 件)

野澤-井上佳世子, 真柄 仁, 河野芳朗, 大峽 淳, 前田健康, ラット顎関節滑膜におけるデスミン免疫陽性 B 型および RECA-1 免疫陽性 A 型表層細胞の血管形成への関与、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014. 9. 25- 27, 福岡国際会議場 (福岡県・博多市)

三富智恵, 河野芳朗, 河野承子, 松山順子, 坂井幸子, 佐野富子, アルキル化抗腫瘍薬によるラット歯根形成障害 根尖部における経日的変化、第 52 回日本小児歯科学会大会, 2014. 5. 16-17, 品川区立総合区民会館 (東京都・東京)

上野山敦士, 泉 健次, 塩見 晶, 齋藤直朗, 齋藤太郎, 大貫尚志, 加藤寛子, 寺田-中石典子, 河野芳朗, 野澤-井上佳世子, 高木律

男, 前田健康、C 配糖体が培養口腔粘膜上皮角化細胞に及ぼす影響の検討、第 13 回日本再生医療学会総会, 2014. 3. 4-6, 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

塩見 晶, 泉 健次, 上野山敦士, 齋藤直朗, 齋藤太郎, 大貫尚志, 加藤寛子, 寺田-中石典子, 河野芳朗, 野澤-井上佳世子, 野村修一, 前田健康、反復加圧刺激が口腔粘膜上皮に及ぼす影響について 3 次元口腔粘膜モデルを用いた組織学的, 免疫組織化学的検討、平成 25 年度新潟歯学会第 2 回例会, 2013. 11. 9, 新潟大学 (新潟県・新潟市)

Monir M-ZB, Shiomi A, Saito T, Ohnuki H, Uenoyama A, Kato H, Terada-Nakaishi M, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Izumi K, Maeda T, Effects of oral keratinocyte-conditioned medium on oral fibroblast phenotype in vitro、平成 25 年度新潟歯学会第 1 回例会, 2013. 7. 6, 新潟大学 (新潟県・新潟市)

泉 健次, 加藤寛子, 大貫尚志, 齋藤太郎, 塩見 晶, 上野山敦士, 寺田典子, 河野芳朗, 野澤-井上佳世子, 前田健康、培養口腔粘膜上皮細胞における細胞分化と TASC に関する検討、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013. 3. 28-30, かがわ国際会議場 (香川県・高松市)

Terada M, Izumi K, Uenoyama A, Shiomi A, Saito T, Yamamoto M, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Kashiwazaki H, Ikoma T, Tanaka J, Maeda T、Histological examination of ex vivo development of composite human oral mucosal equivalent using chitosan-collagen composite scaffold、International Symposium on Human Resource Development towards Global Initiative, 2013. 2. 16-17, Cha-am, (Thailand)

齋藤太郎, 泉 健次, 上野山敦士, 塩見 晶, 大貫尚志, 加藤寛子, 寺田典子, 河野芳朗, 野澤-井上佳世子, 高木律男, 前田健康、3D 口腔粘膜モデルを用いたビスフォスフォネート製剤が創閉鎖に及ぼす影響の組織学的・免疫組織化学的検討、平成 24 年度新潟歯学会第 2 回例会, 2012. 11. 10, 新潟大学 (新潟県・新潟市)

吉居朋子, 齋藤 功, 前田健康, 原田史子, 河野芳朗、実験的歯の移動時におけるラット臼歯歯根膜のアクアポリン-1 免疫発現、第 71 回日本矯正歯科学会大会, 2012. 9. 26-28, 盛岡市民文化ホール (岩手県・盛岡市)

河野芳朗, 河野承子, 野澤-井上佳世子, 寺田典子, 泉 健次, 前田健康、様々な組織境界におけるアクアポリン 1 の発現、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術大会, 2012. 3. 26-28, 山梨大学 (山梨県・山梨市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 芳朗 (KAWANO, Yoshiro)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 60303129

(2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA, Takeyasu)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 40183941