

令和元年5月26日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19773

研究課題名(和文) 形づくりから分化を制御するp130Casの器官形成における共通性(コモナリティ)

研究課題名(英文) The Commonality in the organogenesis of p130Cas, which controls differentiation from morphogenesis

研究代表者

自見 英治郎(Eijiro, Jimi)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：40276598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：p130Casは歯、唾液腺、腎臓など上皮-間葉相互作用によって形成される器官に発現している。本研究では上皮特異的にp130Casを欠損するマウス(p130Cas^{cK0})を作製し、解析した。p130Cas^{cK0}マウスの切歯は野生型と比較して白濁しており、表面も粗造で、エナメル質の菲薄化が認められた。一方、野生型マウスと比べて顎下腺と舌下腺の大きさと重量が小さかった。p130Cas^{cK0}マウスでは導管細胞が減少し、腺房細胞のマーカーであるAquaporin-5の局在の異常が観察された。以上より、p130Casは唾液腺の機能と歯、特にエナメル質の成熟過程に関与す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

器官形成における「形づくり」から「分化」へのスイッチングの分子基盤の実態解明を目指して計画した。各器官がそれぞれ異なる構造と機能を持つことから、各器官の形成や機能獲得には、個別の細胞と情報伝達機構が重要であることが推察される。しかし、p130Cas^{cK0}マウスは異なる器官で異なる機能障害が観られるが、全てp130Casが存在しないことで引き起こされる。このことは、「形づくり」から「分化」へのスイッチングに「p130Casを中心とした共通のルール」が存在することを示唆する。この共通のルール解明することは将来的にこれらの器官の機能回復に役立つ可能性もある。

研究成果の概要(英文)：p130Cas is expressed in organs formed by epithelial-mesenchymal interactions such as teeth, salivary glands, and kidneys. In this study, to clarify the physiological function of p130Cas in the development process of teeth and salivary glands we generated mice in which p130Cas is specifically deleted in the epithelium (p130Cas^{cK0}). The incisors of the p130Cas^{cK0} mice were clouded compared to the wild-type and rough on the surface, and thinning of the enamel was observed. On the other hand, the size and weight of the submandibular gland and sublingual gland were smaller than those of wild type mice. In p130Cas^{cK0} mice, ductal cells decreased, and localization of Aquaporin-5, a marker for acinar cells, was observed. These results suggest that p130Cas is involved in the function of salivary glands and in the maturation of ameloblasts during teeth development.

研究分野：口腔生化学

キーワード：歯 唾液腺 p130Cas

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

器官形成は、初期におこる「形づくり」と後期におこる「分化(機能獲得)」の2つのプロセスからなる。これまでに肺、腎臓や唾液腺などの多次元的な培養法を用いた実験から、様々な液性因子、その受容体、細胞外マトリックス(ECM)と細胞接着分子などが器官形成の「形づくり」に重要であることが報告されている。「形づくり」に関わる分子やそのシグナルが障害されると、明らかな形態異常を伴うことが多いが「形づくり」から「分化」へ移行するスイッチング機構の障害は形態変化に乏しいため、「形づくり」と比較すると「分化」に関する分子基盤の解析は十分に行われていない。

唾液腺などの上皮管腔構造は、上皮細胞は内腔側で水分や栄養分の分泌、気体等の物質の交換を行い、一方基底面で基底膜や間質と接している。また神経細胞の細胞突起も決まった方向へ伸長し、分岐する。このように細胞が様々なタンパク質等を必要な領域に輸送・配置・再構成することを「細胞の極性化」という。細胞の極性化にはアクチン線維や微小管の動態を制御することが重要で、細胞が極性化できないと、種々の奇形を生じたり、機能を損なうことになる。

p130Cas は v-crk や v-src でトランスフォームされた細胞でチロシンがリン酸化された 130kDa のタンパク質として同定された。p130Cas は成長因子やインテグリンシグナルによって細胞内で様々なタンパク質と複合体を形成するアダプタータンパク質であり、p130Cas はアクチンの再構成に深く関わる。p130Cas を欠損した線維芽細胞はストレスファイバーの形成が阻害される。データベースで p130Cas の発現組織を調べると、心臓や血管内皮細胞に特に強く発現する以外に腎臓、唾液腺に強く発現する。p130Cas 欠損マウスは心臓の形成不全で胎生早期に死亡するため、上皮特異的に p130Cas を欠損する(p130Cas cKO)マウスを作製し、歯や唾液腺の機能発現における p130Cas の役割を検討した。

2. 研究の目的

我々はこれまでに p130Cas を破骨細胞特異的に欠損させたマウスが、破骨細胞が存在するものの波状縁を形成できず、骨吸収が阻害されること報告した。この結果は、p130Cas が破骨細胞の形成ではなく、機能獲得に重要であることを意味する。

我々はデータベースから p130Cas が歯、唾液腺や腎臓など上皮-間葉相互作用によって形成される器官に発現することから、p130Cas が「形づくり」より「分化」に重要な分子の1つである可能性を想定した。そこで上皮細胞の特異的マーカーである KRT14 で制御される Cre マウスを用いて、上皮特異的に p130Cas を欠損する(p130Cas cKO)マウスを作製し、歯、唾液腺や腎臓などの機能獲得における p130Cas を共通にした分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. 歯に関する研究:

(1) 石灰化不全の証明:野生型および p130Cas cKO マウスの切歯、永久歯を用いて以下の実験を行う。

- ① **μCT 撮影:**μCT 撮影を行い、3次元構築しエナメル質の石灰化状態を比較する。
- ② **元素分析:**X 線分析顕微鏡を用いてエナメル質に含まれる元素分析をおこなう。
- ③ **ビッカース硬さ試験:**ビッカース硬さ試験機を用いてエナメル質の硬さを比較する。

(2) エナメル質形成不全の原因の究明:

- ① **組織学的解析:**野生型および p130Cas cKO マウスの切歯、永久歯の組織切片を作製し、どの分化段階の細胞で形態異常が認められるか検討する。
- ② **器官培養:**胎生期の野生型および p130Cas cKO マウスの歯胚を摘出し、3次元器官培養をおこなう、形態変化を観察する。

2. 唾液腺に関する研究:

(1) 組織学的解析:野生型および p130Cas cKO マウスの耳下腺、顎下腺および舌下腺の組織切片を作製し、ヘマトキシリン&エオジン染色および腺房細胞分化マーカー(AQP5や PSP など)の発現をそれぞれの特異抗体を用いて免疫染色する。

(2) 唾液の機能的解析:野生型および p130Cas cKO マウスの唾液の唾液分泌量を比較する。

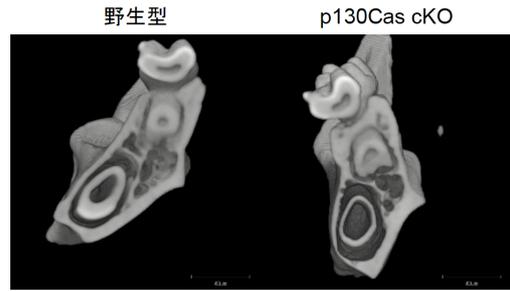
(3) 器官培養:胎生 13 日目の唾液腺原基を摘出し、器官培養をおこなう。経時的に組織切片を作製し、腺房細胞分化マーカー(AQP5や PSP など)の発現をそれぞれの特異抗体を用いて免疫染色する。

4. 研究成果

1. 歯に関する研究:

(1) 石灰化不全の証明:

- ① **μCT 撮影:** p130Cas cKO マウスの切歯のエナメル質の菲薄化が認められた。その結果、歯髄腔の開大が認められた。
- ② **元素分析:** X 線分析顕微鏡を用いてエナメル質に含まれる元素分析をおこなったところ、p130Cas cKO マウスの切歯では Ca, P の含有量が減少していた。



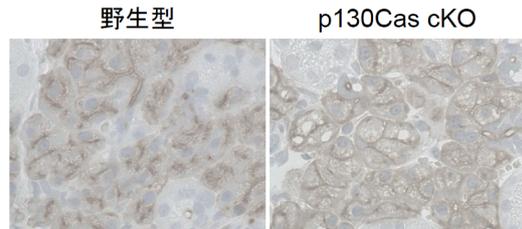
- ③ **ビッカース硬さ試験:** p130Cas cKO マウスの切歯のエナメル質は野生型マウスと比較して硬さが低かった。

(2) エナメル質形成不全の原因の究明:

- ① **組織学的解析:** p130Cas cKO マウスの切歯では成熟エナメル芽細胞の配列が乱れており、極性化の障害が起きている可能性が示唆された。
- ② **器官培養:** 器官培養においては著明な変化は認められなかった。現在、歯の発生に関わるシグナル分子の発現と局在を検討中である。

2. 唾液腺に関する研究:

- (1) **組織学的解析:** オス p130Cas cKO マウス顎下腺および舌下腺において、腺房細胞の減少と著大な導管細胞の現象が認められた。また野生型マウス唾液腺では腺房細胞の内腔側に AQP5 の局在が見られたのに対して、p130Cas cKO マウス唾液腺では AQP5 が細胞全体に広がっていた。



- (2) **唾液の機能的解析:** p130Cas cKO マウスの唾液の唾液分泌量は野生型マウスと比較して減少していた。

- (3) **器官培養:** p130Cas cKO マウスでは Branching の遅延が認められ、AQP5 の極性化が乱れていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- (1) 室屋龍佑、高 靖、中富千尋、藤井慎介、清島保、自見英治郎 「唾液腺の発生および機能発現における p130Cas の役割」 第 60 回歯科基礎医学会 福岡、2018
- (2) 中富千尋、中富満城、古株彰一郎、松原琢磨、大島勇人、自見英治郎 「エナメル質成熟過程における p130Cas の役割」 第 60 回歯科基礎医学会 福岡、2018

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/about/field/field1/field1_02/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：松原 琢磨

ローマ字氏名：TAKUMA MATSUBARA

所属研究機関名：九州歯科大学

部局名：歯学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00423137

研究分担者氏名：中富 満城

ローマ字氏名：MITSUSHIRO NAKATOMI

所属研究機関名：九州歯科大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：10571771

研究分担者氏名：古株 彰一郎

ローマ字氏名：SHOICHIRO KOKABU

所属研究機関名：九州歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：30448899

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中富 千尋

ローマ字氏名：CHIIHIRO NAKATOMI

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。