

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19578

研究課題名(和文)上皮細胞の分化制御と発毛制御に共通する新しい分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of common molecular mechanisms associated with epithelium differentiation and hair growth

研究代表者

片桐 岳信 (Katagiri, Takenobu)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80245802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞特異的な転写共役因子Smad4コンディショナル・ノックアウト(cK0)マウスを樹立するため、上皮細胞特異的なKeratin 14-Creマウスを導入した。本マウスを、Smad4 floxedマウスと交配し、最終的に上皮細胞で両アレルのSmad4がノックアウトされたマウスを樹立した。上皮細胞特異的Smad4 cK0マウスは、上皮間葉相互作用で形成される歯の形成不全が顕著であった。そこで、Smad4 cK0マウスと対照マウスで発現する遺伝子を比較するためにRNA-seq解析を行った。Smad4 cK0群で遺伝子発現が変動した遺伝子の中に、上皮細胞で発毛に関わる可能性のある遺伝子を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、成長因子TGF- $\beta$ ファミリーの細胞内シグナルに必須の転写共役因子Smad4の機能を、マウスの上皮細胞特異的に解析できるコンディショナルノックアウトマウスが樹立できた。このマウスで認められた歯の形成不全は、歯の形成における上皮間葉相互作用において、TGF- $\beta$ ファミリーの重要性を示唆する。また、遺伝子発現の変化を解析した結果から、発毛に関わる遺伝子が見出されたことは、Smad4シグナルが上皮細胞における発毛に重要なことを示す。

研究成果の概要(英文)：We established a mouse line of epithelium-specific conditional knockout of Smad4 by crossing Smad4 floxed mice with Keratin 14-Cre mice. These mice showed an abnormal tooth development phenotype, which is regulated by the epithelial-mesenchymal interaction. In RNA-seq analysis using control and Smad4 cK0 mice, the expression levels of a gene involved in hair growth were changed in Smad4 cK0 mice.

研究分野：骨代謝学

キーワード：転写共役因子 上皮細胞 間葉系細胞 上皮間葉相互作用 Smad4

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

成長因子群 Transforming Growth Factor- (TGF-) ファミリーは、骨や軟骨、筋肉を始めとする運動器を始め、歯、毛、皮膚等、さまざまな組織で細胞の増殖や分化を制御する分泌タンパク質である。TGF- ファミリーのリガンドは、標的細胞が膜上に発現する 2 種類 (I 型と II 型) の膜貫通キナーゼ受容体に結合し、細胞質で転写因子 Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 をリン酸化反応で活性化することにより、核内にシグナルを伝達する。活性化されたいずれの Smad タンパク質の転写活性にも、Smad4 が転写共役因子として必須であることが示されている。

すでに、研究代表者の片桐らは、TGF- ファミリーの生理的役割を *in vivo* で解析する目的で、TGF- ファミリーのシグナル伝達に必須の転写共役因子 Smad4 を、薬剤投与誘導性に全身でノックアウトできる世界初のマウス (Smad4 cK0) を樹立した (Machiya et al, Bone, 2020)。離乳後に成熟した本マウスに薬剤を投与して Smad4 をノックアウトすると、生涯成長を続ける切歯近傍の上皮細胞分化に異常が認められた (Machiya et al, Bone, 2020)。

### 2. 研究の目的

上記のような結果から、上皮細胞が Smad4 を介した細胞内シグナルの標的となる可能性が示唆された。そこで本研究では、新たに上皮細胞特異的な Smad4 cK0 マウスを樹立し、網羅的遺伝子解析から、上皮細胞の分化や上皮間葉相互作用による組織形成に関わる分子機序の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

すでに我々が保有している Smad4 floxed マウスを繁殖させた。上皮細胞特異的な遺伝子組換えマウスを樹立するため、米国ジャクソンラボラトリーから Keratin 14-Cre マウスを導入した。繁殖させた Smad4 floxed マウスと Keratin 14-Cre マウスを交配し、まず、Smad4 遺伝子の片アリルが欠失したマウスを樹立した。このマウス同士を交配し、最終的に Smad4 遺伝子の両アリルが上皮細胞で欠失した上皮細胞特異的な Smad4 cK0 マウスを樹立した。

樹立した Smad4 cK0 マウスの胎児を個別に摘出し、PCR でジェノタイピングを行った。マウスの口腔内を中心としたパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色で組織学的変化を解析した。さらに、マウスから total RNA を抽出し、コントロール群と Smad4 cK0 群における網羅的遺伝子発現の変化を RNA-seq 解析 (タカラバイオ) した。

### 4. 研究成果

#### (1) 上皮細胞特異的な Smad4 cK0 マウスの樹立

本研究のために、新たに Keratin 14-Cre マウスを米国から導入し、Smad4 floxed マウスと交配した。しかし、初回に導入した Keratin 14-Cre マウスは状態が悪く、仔マウスを全く取得できなかった。再度、米国から Keratin 14-Cre マウスを導入し、Smad4 floxed マウスと交配して仔マウスを取得した。ジェノタイピングの結果、Smad4 遺伝子が片アリル欠失したマウスを取得できていることが確認された。この雌雄マウスを交配し、目的とする上皮細胞において Smad4 遺伝子の両アリルが欠失した Smad4 cK0 マウスを取得した。

#### (2) 上皮細胞特異的な Smad4 cK0 マウスの解析

上記(1)の交配で妊娠したマウスから胎児を個別に摘出し、Smad4 遺伝子の欠失を解析した。Keratin 14-Cre 遺伝子を持たずに Smad4 が欠失していないマウス、Smad4 の片側アリルのみが欠失したマウス、Smad4 の両アリルが欠失したマウスの 3 種が得られた。

それぞれの口腔組織のパラフィン切片を解析すると、Smad4 の両アリルを欠失した cK0 マウスは、切歯と臼歯が形成不全を呈していた。一方、Smad4 cK0 マウスの骨や筋組織には著しい変化は認められなかった。

同腹の Smad4 の欠失していないマウスと Smad4 cK0 マウスにおける遺伝子発現の変化を、RNA-seq 解析した。その結果、Smad4 cK0 群で変動する遺伝子の中に、上皮細胞における発毛に関与が示唆される遺伝子が含まれていることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

埼玉医科大学 医学部 ゲノム基礎医学 <a href="http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/index.html">http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/index.html</a> 埼玉医科大学FOP診療・研究プロジェクト <a href="http://www.saitama-med.ac.jp/medlinks/saitama_univ_fop/">http://www.saitama-med.ac.jp/medlinks/saitama_univ_fop/</a>
--

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	自見 英治郎  (Jimi Eijiro)  (40276598)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	

	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
研究協力者	塚本 翔  (Tsukamoto Sho)		
研究協力者	倉谷 麻衣  (Mai Kuratani)		

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