

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249093

研究課題名(和文) 外胚葉異形成症の新たな原因遺伝子を探る - Runx 遺伝子の新たな役割

研究課題名(英文) Novel functions of Runx genes as causal genes for ectodermal dysplasia

研究代表者

山城 隆 (Yamashiro, Takashi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70294428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、Runxシグナルの形態形成における新たな役割を検討してきた。特に、上皮細胞特異的Runx1ノックアウトマウスと上皮細胞特異的Cbfbノックアウトマウスを用いてRunxシグナリングが唾液腺、歯、口蓋の形態形成に果たす役割を検討した。その結果、Runx1シグナリングは上皮において幹細胞の維持や細胞の分化に重要な役割を果たすことを見出した。また、その際、Runx1/CbfbシグナリングはStat3シグナルを介することで様々な下流の分子の発現を制御することを見出した。この成果は、器官発生、形態形成のメカニズムの理解を深めるのみならず、将来における分子治療の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the possible roles of epithelial Runx1/Cbfb signaling in the organogenesis and craniofacial development. Using the epithelial-specific Runx1 knock-out and epithelial-specific Cbfb knock-out mice, we provided evidence that Runx1/Cbfb has indispensable roles in the development of the teeth, the salivary gland, and the palate. In salivary gland, Runx1 is involved in sexual dimorphism in the induction of the granular convoluted tubules of the submandibular gland in the presence of androgen. In the incisors, Runx1 is involved in the regulation of Lgr5-positive epithelial stem cells that differentiate into ameloblasts, through regulation of phosphorylation of Stat3 in the cervical loop of the growing incisors. In the palate, Runx1 epithelial-specific deletion led to the failed disintegration of the contacting palatal epithelium and that Tgfb3 is a critical downstream target in the pathogenesis of anterior cleft palate in the mutants.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Runxシグナリング 上皮間葉相互作用 器官形成 Cbfb Runx1 唾液腺

1. 研究開始当初の背景

外胚葉異形成症は歯の低(無)形成と、それに起因する歯槽骨の成長不全を特徴とする先天性の疾患である。外胚葉異形成症は歯の症状のみならず、疎毛、口腔鼻粘膜の乾燥、爪甲変形、汗腺の未発達などの問題も生じるため、矯正歯科医は咬合の管理のみならず、これらの問題に対しても注意を払わなければならない。このように外胚葉異形成症の症状が現れる器官や組織の多くは皮膚付属器官であり、いずれの器官も同じような分子機構と上皮間葉相互作用(上皮と間葉組織の異なる胚性組織間で繰り広げられる相互作用)によって形成されることが知られている。そのため、外胚葉異形成症の原因遺伝子は、異なる器官に症状が認められる場合であっても、共通している可能性が高い。しかし、これまでその分子病態の多くは未だ解明されていない。

Runx 遺伝子ファミリー (Runx) は核内転写因子であり、Runx1、Runx2、Runx3 とこれらの共役因子である Cbfb が含まれる。造血、骨形成、ガン抑制、軸索誘導などの現象において重要な役割を果たすことが知られている。申請者らは最近 Runx 遺伝子が上皮において上皮間葉相互作用を制御することを見いだした。本研究は既に得られたこの所見をもとに、外胚葉形成不全の原因として Runx 遺伝子の関与を検討する。

2. 研究の目的

外胚葉異形成症は歯、毛髪、唾液腺、爪など様々な皮膚付属器官に症状が現れ、口唇・口蓋裂を併発することもある。このように臨床症状が多岐にわたる疾患であるが、その分子機構は未だ不明な点が多い。我々は最近 Runx ファミリーが上皮において上皮間葉相互作用を介して器官形成を制御することを見出した。本研究の目的は Runx ファミリーが異なる皮膚付属器官で働く新たな役割を組織横断的に検討する。さらにそれに関わる分子機構の一端を明らかにする。

3. 研究の方法

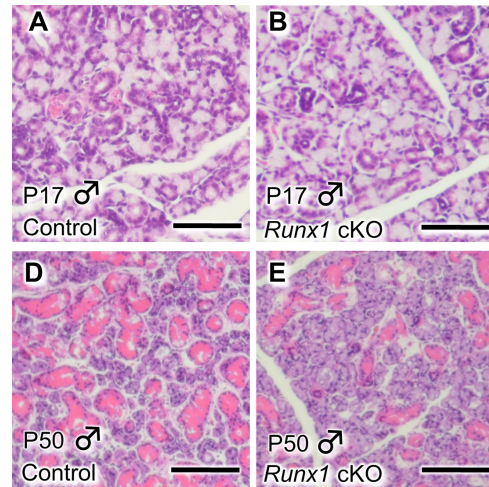
本研究は Runx ファミリーが歯、唾液腺、ならびに口蓋の形成において上皮間葉相互作用を介して作用する共通の分子機構を組織横断的に検討する。具体的には以下の検討を行う。

Runx1 や Cbfb 遺伝子改変動物を用いて、歯、唾液腺、爪ならびに口蓋の形成における表現型の解析を詳細に行う。さらに、Runx1/Cbfb の上流と下流で働く分子を網羅的に解析する。

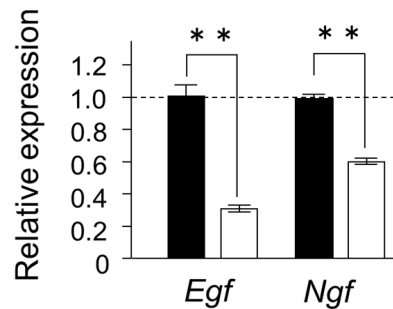
さらに、Runx1/Cbfb の下流で働く分子の中から、Runx1/Cbfb 遺伝子改変動物の歯、唾液腺、爪ならびに口蓋に生じる表現型をレスキューする分子を同定する。

4. 研究成果

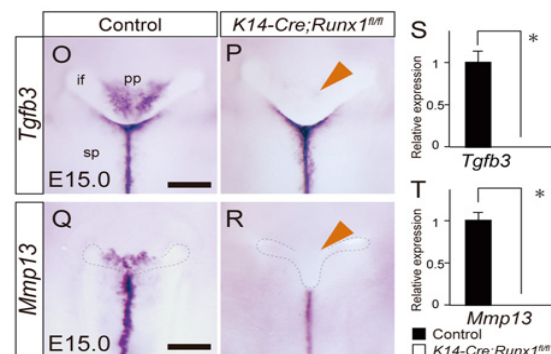
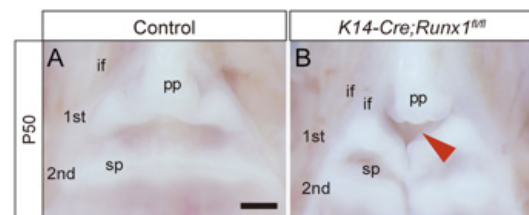
唾液腺では、Runx1 や Cbfb のノックダウンによって雄の顎下腺に特異的に局在する顆粒管組織の占める面積が有意に減少した。



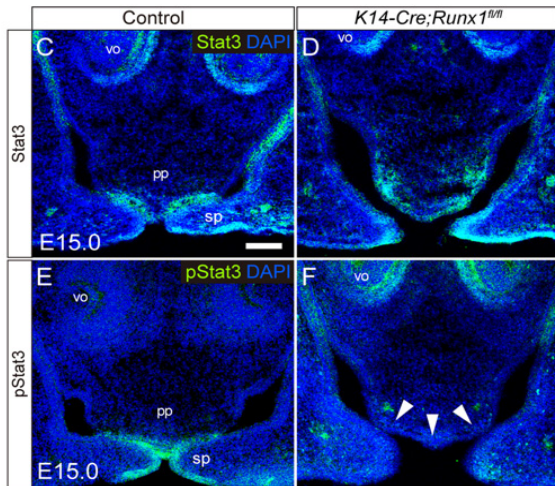
それに伴い、Klk1, Ngf, Egf の mRNA の発現レベルが有意に減少した。



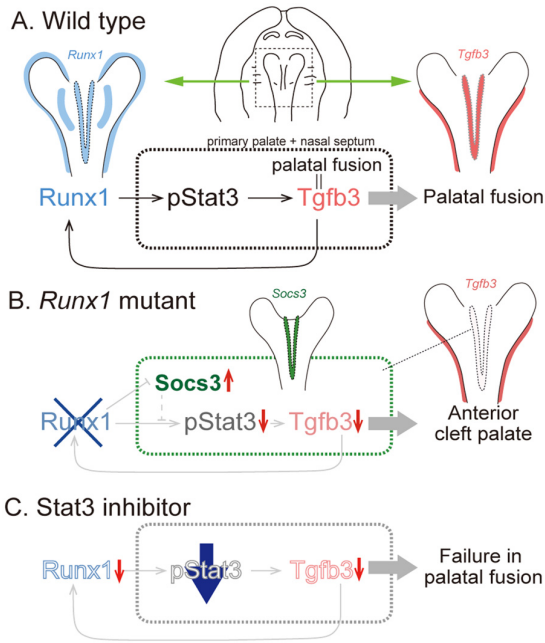
また、雄の Cbfb cKO マウスでは、アンドロゲン依存性に発現する Crisp3 の発現が有意に減少した。これらの結果から、Runx シグナリングの新たな役割として、生後において、性差に関わる唾液腺の形態形成、分化に関与することが明らかになった。



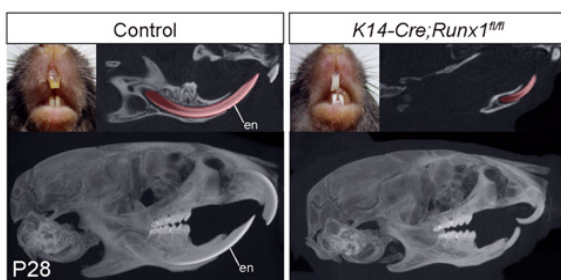
口蓋では、Runx1 や Cbfb のノックダウンによって、口蓋の前方部において上皮の癒合が阻害された。その際、Stat3 のリン酸化を介して、癒合部における Tgfb3 の発現レベルが有意に減少した。



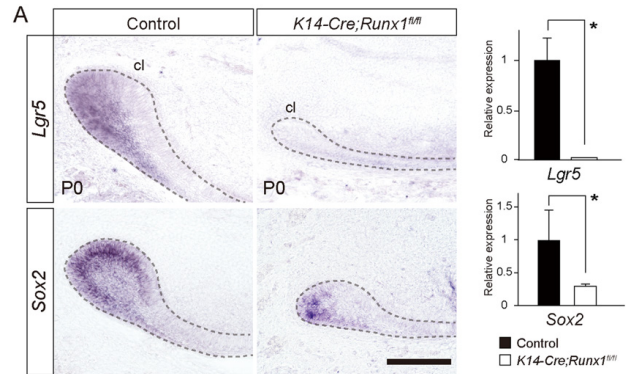
また、前方部において特異的に上皮の癒合が阻害される分子機構として、口蓋の前方部で Stat3 のリン酸化を阻害する Socs3 の発現が Runx1 によって制御されることが明らかになった。また TGFβ3 がこの表現型をレスキューした。



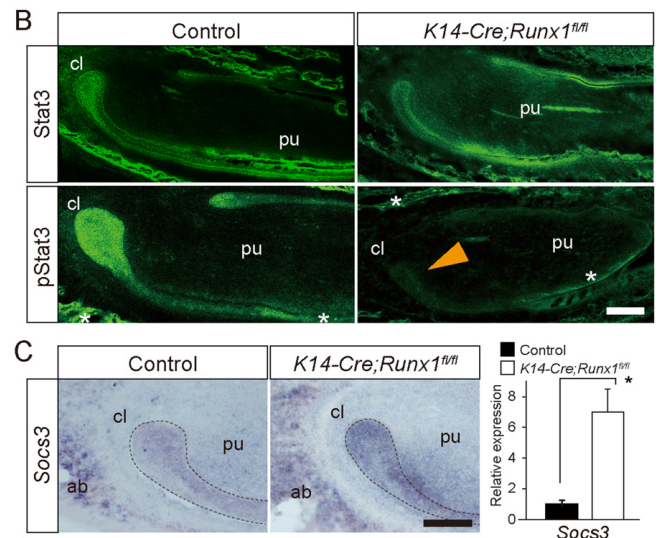
切歯では、Runx1 や Cbfb のノックダウンによって、切歯の伸長が阻害された。



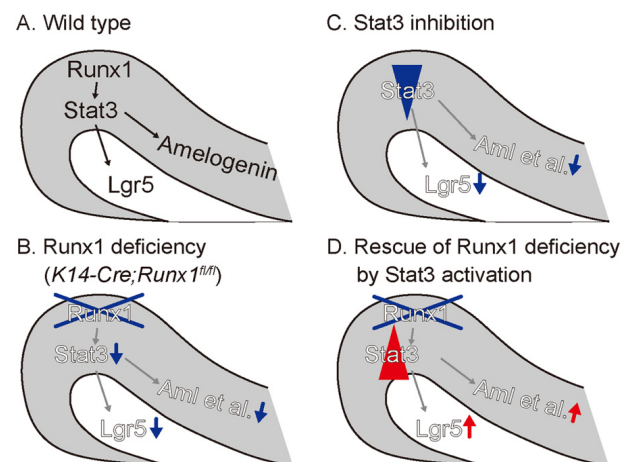
それに伴い、サービカルループにおいて切歯の幹細胞マーカーである Lgr5 の発現が著しく減弱することが明らかになった。



また口蓋と同様、Runx1 は Stat3 のリン酸化を介して Lgr5 の発現を維持することを見出し、さらに Stat3 の活性化は、Runx1 cKO マウスの切歯の表現型をレスキューすることを見出した。



また、Stat3 を薬理的に活性化させることで、切歯の伸長阻害はレスキューされた。



これらの研究成果より、Runx 遺伝子が器官形成や組織の発生に重要な役割を果たすことがあきらかになり、我々はその新たなカスケードを見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

Sarper SE, Kurosaka H, Inubushi T, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development. *Sci Rep*. 2018 Jul 25;8(1):11208.

Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx1-Stat3 signaling regulates the epithelial stem cells in continuously growing incisors. *Sci Rep*. 2018 Jul 19;8(1):10906.

Ono Minagi H, Sarper SE, Kurosaka H, Kuremoto KI, Taniuchi I, Sakai T, Yamashiro T. Runx1 mediates the development of the granular convoluted tubules in the submandibular glands. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184395.

Islam MN, Itoh S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, Kuremoto K, Kurosaka H, Honjo T, Kawanabe N, Kamioka H, Sakai T, Ishimaru N, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. *Dev Dyn*. 2015 Mar;244(3):488-96.

Kawanabe N, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Kurosaka H, Yamashiro T. Isolation and characterization of SSEA-4-positive subpopulation of human deciduous dental pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2015 Mar;19(2):363-71.

Ishimoto K, Hayano S, Yanagita T, Kurosaka H, Kawanabe N, Yamashiro T. Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121938.

Ishihara Y, Sugawara Y, Kamioka H, Kawanabe N, Hayano S, Yamashiro T. Ex vivo real-time observation of Ca(2+) signaling in living bone in response to shear stress applied on the bone surface. *Bone*. 2013 Mar;53(1):204-15.

Sugawara Y, Kamioka H, Ishihara Y, Fujisawa N, Kawanabe N, Yamashiro T. The early mouse 3D osteocyte network in the presence and absence

of mechanical loading. *Bone*. 2013 Jan;52(1):189-96.

[学会発表] (計 8 件)

Sarper S, Yamashiro T. Runx signaling is specifically involved in the fusion between the primary palate and the secondary palate by regulating Tgfb3 signaling. *Tooth Morphogenesis and Differentiation*, 2016

Yamashiro T. Runx signaling is specifically involved in the fusion between the primary palate and the secondary palate by regulating Tgfb3 signaling. *International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases*, 2016

Ono H, Sarper S, Kurosaka H, Sakai T, Yamashiro T. The role of Runx1 in salivary gland development. *International Symposium Oral and Craniofacial Development and Diseases*, 2016

Yamashiro T. Core binding factor β (Cbf β) functions in the maintenance of stem cells and orchestrates continuous proliferation and differentiation in mouse incisors. 18th International Runx Workshop, Aug. 15, 2011, San Diego, USA.

伊藤慎将、柳田剛志、山城 隆 : Runx/Cbfb シグナリングはアンドロゲン代謝を介した唾液腺の雌雄二形性発現を制御する。第 55 回 歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20~22 日、岡山

伊藤 慎将、三原 聖美、黒坂 寛、柳田 剛志、河野 加奈、上岡 寛、山城 隆 : 口蓋裂発生における Runx/Cbfb シグナリングの関与 第 73 回日本矯正歯科学会大会、2014 年 10 月 20 日~22 日、千葉

石原 嘉人、菅原 康代、上岡 寛、成瀬 恵治、山城 隆 : 先進光イメージングと骨形態研究の新展開 生きた骨組織中で起こる細胞応答のイメージング 第 33 回日本骨形態計測学会、2013 年 7 月 4 日~6 日、浜松

川邊 紀章、福島 宏明、加藤 ゆい、山城 隆 : SSEA-4 陽性ヒト乳歯歯髓細胞の幹細胞特性、第 71 回日本矯正歯科学会大会、2012 年 9 月 26~28 日、岩手

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 隆 (YAMASHIRO TAKSHI)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：70294428

(2) 研究分担者

川邊 紀章 (KAWANABE NORIAKI)

岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・准教授

研究者番号：00397879

村上 隆 (MURAKAMI TAKASHI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：00534786

上岡 寛 (KAMIOKA HIROSHI)

岡山大学・医歯（薬）学総合研究科・教授

研究者番号：80253219

柳田剛志 (YANAGITA TAKESHI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90534793

(3) 連携研究者

中川一路 (NAKAGAWA ICHIRO)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70294113