

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08293

研究課題名(和文) エナメル質形成不全症原因遺伝子FAM83Hの遺伝子改変マウスを用いた疾患研究

研究課題名(英文) Analysis of FAM83H gene-modified mice to reveal the mechanism of amelogenesis imperfect

研究代表者

久家 貴寿 (Kuga, Takahisa)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：20551857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：優性遺伝性低石灰化型エナメル質形成不全症(ADHCAI)は、FAM83Hのナンセンス変異が原因で生じる。本研究では、ADHCAIの仕組み等を解明するために、FAM83H遺伝子改変マウスを作製、解析した。その結果、マウスでは、FAM83Hに遺伝子変異が入っても、ADHCAIが発症しないことが明らかになった。マウスはADHCAIのモデル動物作製には適していないことが分かった。一方で、FAM83H遺伝子改変マウスの解析から、FAM83Hが広範な上皮系組織において、ケラチン骨格構造を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、マウスがADHCAIのモデル動物作製には適していないことを明らかにした。本結果は、マウス以外の動物種を使ってADHCAIのモデル動物作製を促すことに繋がる。FAM83Hが上皮組織でケラチン骨格構造制御に関与していることを見出した点は重要である。ケラチン骨格により裏打ちされるヘミデスモソームの構成タンパク質の変異が、エナメル質形成不全症の原因になることが知られており、歯牙組織のケラチン骨格構造異常がADHCAIに繋がる可能性が考えられる。FAM83Hが、マウスよりもヒトで、ケラチン骨格構造制御により強く関わっている可能性の検証を促す成果であると考えている。

研究成果の概要(英文)：A heterozygous nonsense mutation in the FAM83H gene has been demonstrated to cause autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta (ADHCAI) in humans. In the present study, we generated genetically modified mice with a mutation in the FAM83H gene, and tested whether the FAM83H mutation causes ADHCAI in mice; however, the FAM83H-mutant mice did not show any signs of defects in enamel. Our results suggest that a mutation in the FAM83H gene is not sufficient to cause ADHCAI in mice. On the other hand, mice with the homozygous mutation in the FAM83H gene showed the phenotypes of retardation in the postnatal growth and a scruffy coat. The disorganization of the keratin cytoskeleton, the disordered cell alignment, and the impaired intercellular adhesion were observed in various epithelial tissues of homozygous mutant mice. Our data suggest that FAM83H plays an important role in the establishment of epithelial tissues through properly organizing the keratin cytoskeleton.

研究分野：分子生物学

キーワード：エナメル質形成不全症 FAM83H ADHCAI ケラチン骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

FAM83H は優性遺伝性低石灰化型エナメル質形成不全症の原因遺伝子である。優性遺伝性低石灰化型エナメル質形成不全症は、歯の表面を覆うエナメル質の石灰化度が低下し、その結果、歯の軟化、摩耗が生じる疾患である。原因となる *FAM83H* 遺伝子変異は、ナンセンス変異タイプ、もしくはフレームシフト変異タイプであり、どちらのタイプにおいても、*FAM83H* 遺伝子に早期終止コドンが生じる。*FAM83H* 変異遺伝子にコードされる、*FAM83H* の N 末端断片タンパク質の発現により、疾患が発症すると考えられている。

我々はこれまでに、*FAM83H* がカゼインキナーゼ 1 (CK1) の細胞内局在を制御するタンパク質であることを明らかにしている (J. Cell Sci., 2013, 126, 4721-4731; Sci. Rep., 2016, 34472)。*FAM83H* は N 末端側に CK1 結合領域を有しており、CK1 結合領域よりも C 末端側に、セラチンタンパク質、もしくはスプライシング制御タンパク質 (SON) との結合領域を持つ。これらの結合を介して、*FAM83H* は、CK1 を、セラチン骨格もしくは核内スペckル (スプライシング制御因子が集まる核内構造体) に局在化させる。

疾患原因となる *FAM83H* N 末端断片タンパク質は、CK1 と結合するが、セラチンタンパク質とは結合しないことを我々は明らかにしている (J. Cell Sci., 2013, 126, 4721-4731)。*FAM83H* N 末端断片タンパク質を、培養細胞内に大量に発現させると、ドミナントネガティブ効果により、CK1 のセラチン骨格上への局在化が妨げられ、セラチン骨格構造に異常が生じる。このドミナントネガティブ効果が、培養細胞だけでなく、患者体内においても起こっているのかどうかは、現在のところ不明である。

2016 年に、Wang らによって、*FAM83H* ノックアウトマウスが樹立された (Mol. Genet. Genomic Med., 2016, 4, 46-67)。Wang らは、*FAM83H* ノックアウトマウスが、エナメル質形成不全症様の表現系を示さないことを報告した。この結果から、次の 2 つの可能性が考えられている。

- (1) *FAM83H* 自体はエナメル質形成に必要ではなく、*FAM83H* の N 末端断片タンパク質が新規に、エナメル質形成を妨げる働きを獲得する
 - (2) *FAM83H* は、ヒトのエナメル質形成には関与するが、マウスにおいては関与しない
- 現在のところ、上記 2 つの可能性のどちらが正しいのかについての答えは出ていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*FAM83H* N 末端断片タンパク質の発現によって、エナメル質形成不全症が発症するのかどうかを明らかにすることである。ヒト患者と同様の *FAM83H* 遺伝子変異を持ったマウスを樹立、解析する。もう一つの目的は、*FAM83H* N 末端断片タンパク質によるセラチン骨格構造異常が、生体内レベルでも生じるのかどうかを検証することである。*FAM83H* 遺伝子改変マウスの歯牙組織を含む上皮組織内細胞のセラチン骨格構造を解析する。

3. 研究の方法

(1) *FAM83H* 遺伝子改変マウスの歯の表現型解析

我々は、CRISPR/Cas9 システムを用いて、ヒト患者と同様の遺伝子変異を有する、2 系統の *FAM83H* 遺伝子改変マウス (C57BL6/NCrSlc 由来) を樹立している。それぞれが有する *FAM83H* 遺伝子の変異はやや異なっているが、どちらも *FAM83H* N 末端断片タンパク質をコードしている。これらのマウスの疾患発症の評価は、走査型電子顕微鏡 (SEM) によるエナメル質構造解析と、コンタクトマイクロラジオグラフィー (CMR) による石灰化度測定等で行った。

(2) *FAM83H* 遺伝子改変マウスの皮膚、歯牙組織細胞等におけるセラチン骨格構造解析

皮膚、下顎組織等を摘出し、凍結組織切片作製用包埋剤に浸漬し、液体窒素を使って急速凍結した。凍結標本をクリオスタットで薄切し、5 μm 厚の切片を作製した。組織切片を、各種抗体を用いて免疫染色し、組織細胞内のセラチン骨格や、セラチン骨格により裏打ちされる細胞間接着構造体等の構造を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) *FAM83H* 遺伝子改変マウスの歯の表現型解析結果

2 つの系統の *FAM83H* 遺伝子改変マウスはそれぞれ、マウス *FAM83H* cDNA の 999 - 1018、993 - 1002 番目の塩基を欠失しており、フレームシフトにより変異直後に終止コドンが生じていた。それぞれの変異型 *FAM83H* 遺伝子は、1 - 286、1 - 284 番目のアミノ酸をコードしており、ヒト患者で見られた変異遺伝子 (1 - 287 番目のアミノ酸をコード) とほぼ同様と考えられた。マウス体内において、実際に *FAM83H* N 末端断片タンパク質が発現していることを、ウエスタンブロット法で確認した。

2 つの系統のマウスどちらにおいても、ヘテロ接合改変型では、外見上の表現型は全く見られ

なかった。一方で、ホモ接合型では、両系統ともに、躯体が小さく、脱毛傾向が見られた。これらの表現型は、*FAM83H* ノックアウトマウスの表現型と一致した。ヘテロ接合型変異マウスにおいても、N 末端断片タンパク質の発現が検出されていることから、ホモ接合型変異マウスの表現型は、*FAM83H* の N 末端断片タンパク質の発現ではなく、*FAM83H* の機能欠損に起因していると推測された。

FAM83H 遺伝子変異マウスのエナメル質を SEM と CRM で解析した。6 週齢マウスの下顎の切歯、臼歯を解析したが、野生型、ヘテロ接合型変異、ホモ接合型変異間でエナメル質の違いは見られなかった (図 1)。マウスにおいては、*FAM83H* N 末端断片タンパク質が発現しても疾患が発症しないことが明らかになった。*FAM83H* は、ヒトのエナメル質形成には必須だが、マウスにおいては必須ではない可能性が示唆された。本研究より、マウスは、*FAM83H* 遺伝子変異疾患のモデル動物作製には不適切であると考えられた。

(2) *FAM83H* 遺伝子変異マウスの皮膚、歯牙組織細胞等におけるケラチン骨格構造解析結果

FAM83H 遺伝子変異マウスの脱毛等の症状から、皮膚組織に何らかの影響が出ていると考えられた。*FAM83H* がケラチン骨格制御に関与していること、ケラチン遺伝子の変異により皮膚疾患が生じることが知られていることから、*FAM83H* 遺伝子変異マウスの皮膚細胞では、ケラチン骨格異常が生じている可能性を考えた。これを検証するために、*FAM83H* 遺伝子変異マウス皮膚組織を、抗ケラチン抗体を用いた免疫染色法で解析した。

基底層細胞のケラチン骨格は、抗ケラチン 5 抗体、抗ケラチン 14 抗体を用いて可視化した。どちらの抗体を用いた場合においても、野生型、ヘテロ接合型変異マウスと比べて、ホモ接合型変異マウスで粗大なケラチン骨格メッシュが観察された。抗ケラチン 14 抗体を用いた結果を図 2 に示した。顆粒層、有棘層細胞のケラチン骨格は、抗ケラチン 1 抗体、抗ケラチン 10 抗体を用いて可視化した。野生型では、明確な繊維状の染色パターンを見ることができなかったが、細胞全体に密な染色像を見ることができた。ヘテロ接合型変異マウスの染色像は野生型と同様であったが、ホモ接合型変異マウスでは、細胞間に隙間が見える染色像が観察された。抗ケラチン 1 抗体を用いた結果を図 3 に示した。これらの結果によって、ホモ接合型変異マウスにおいてケラチン骨格構造異常が生じていることが示唆された。

ホモ接合型変異マウスでは、ケラチン骨格異常に伴って、ケラチン骨格が裏打つ構造体(デスモソーム、ヘミデスモソーム)にも何らかの異常が生じている可能性を検討した。デスモソーム形成

については、その構成タンパク質(デスモグレイン 1、デスモプラキン)に対する抗体を用いた免疫染色で評価した。どちらの抗体を用いた場合でも、全ての遺伝子型で、同様の、細胞間境界部染色が見られたため、ホモ接合型変異マウスでもデスモソームが形成されていることが示唆された。図 4 に、抗デスモグレイン 1 抗体を用いた実験の結果を示した。ヘミデスモソームの形成については、その構成タンパク質(インテグリンβ4、プレクチン、コラーゲン 17)に対する抗体を用いた免疫染色で評価した。全ての遺伝子型で、ヘミデスモソーム構成タンパク質の染色が、基底層細胞と真皮層の境界部に検出されたことから、ホモ接合型変異マウスでもヘミデスモソームが形成されていることが示唆された。図 5 に抗プレクチン抗体を用いた実験の結果を

図 1. SEM、CRM によるエナメル質の解析

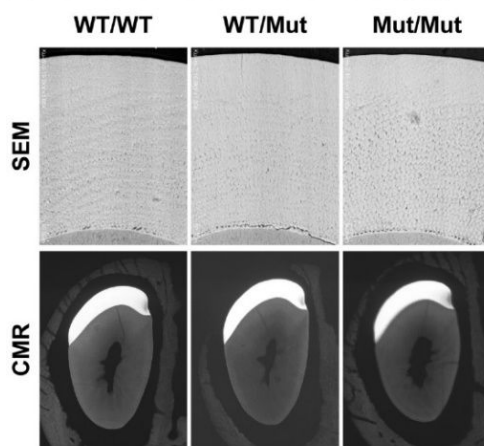


図 2. 抗ケラチン 14 抗体を用いた皮膚組織の免疫染色

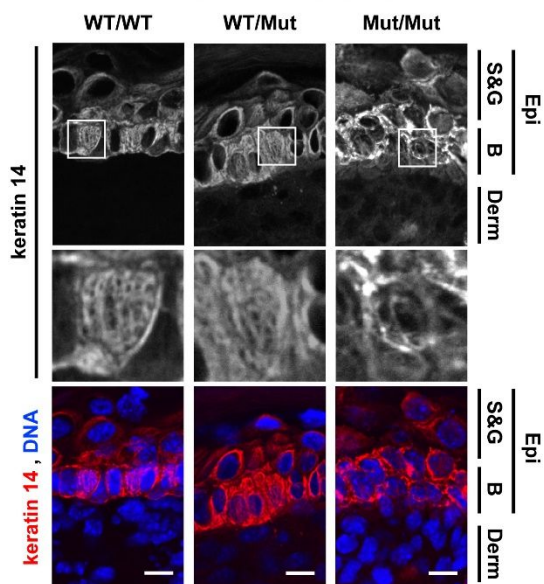
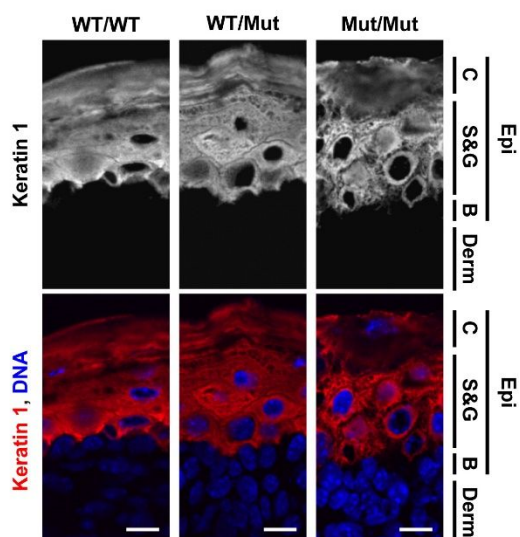


図 3. 抗ケラチン 1 抗体を用いた皮膚組織の免疫染色



示した。これらの結果から、ホモ接合型改変マウスで生じるケラチン骨格異常が、デスモソーム、ヘミデスモソームの形成に重大な影響を与えるほどに深刻なものではないことが推測された。

FAM83H 遺伝子改変が、歯牙組織細胞内のケラチン骨格構造にも影響を与えるのかどうかを検討した。いくつかのタイプのケラチンタンパク質に対する抗体を用いた免疫染色を行った結果、エナメル芽細胞等においても粗大なケラチン骨格メッシュ構造が観察された。図6に抗ケラチン8抗体を用いた実験の結果を示した。

ケラチン骨格構造の異常は、ホモ接合型改変マウスの食道、大腸等でも観察されている。*FAM83H* は、広範な上皮系組織において、ケラチン骨格構造制御に関与していることが推測された。

(3) 結論

本研究の目的は、*FAM83H* 遺伝子改変マウスを樹立し、疾患発症メカニズム研究に活用することであったが、C57BL6/NCrSlc マウスでは、ヒト患者と同様の遺伝子変異が生じても、エナメル質形成不全症が発症しないことが分かった。*FAM83H* 遺伝子変異疾患のモデル動物を作製するためには、別の動物種を選択する必要があると考えられた。

一方で、本研究によって、*FAM83H* が、歯牙組織を含む、広範な上皮系組織のケラチン骨格構造制御に関与していることが明らかになった。エナメル質形成不全症が、ケラチン骨格に裏打ちされるヘミデスモソーム構成因子の変異で生じることが知られているため、ケラチン骨格構造異常によりエナメル質形成不全症が発症する可能性が考えられる。*FAM83H* 遺伝子改変マウスにおいて、ケラチン骨格異常が検出されているにも関わらず、疾患が発症していなかったのは、ケラチン骨格構造異常の程度が十分ではなかったのかもしれない。今後ヒトの歯牙組織において、*FAM83H* N 末端断片タンパク質がより重度のケラチン骨格異常を誘発する可能性を検査する必要があると考えている。

図4. 抗デスモグレイン1抗体を用いた免疫染色

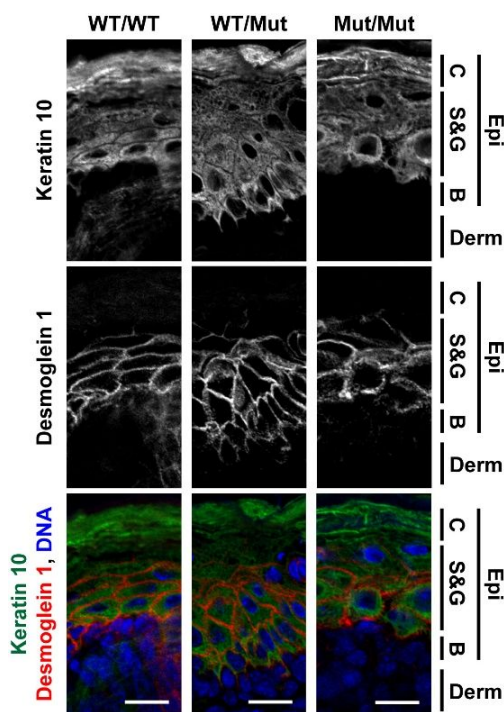


図5. 抗プレクチン抗体を用いた免疫染色

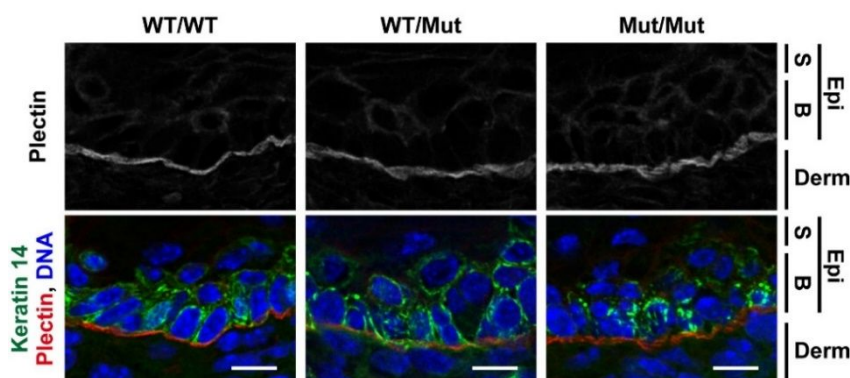
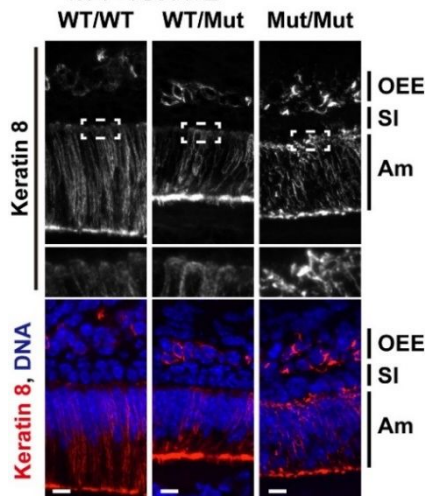


図6. 抗ケラチン8抗体を用いた下顎切歯の免疫染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuki R, Tatewaki T, Yamaguchi N, Aoyama K, Honda T, Kubota S, Morii M, Manabe I, Kuga T, Tomonaga T, Yamaguchi N	4. 巻 38
2. 論文標題 Desuppression of TGF- signaling via nuclear c-Abl-mediated phosphorylation of TIF1 /TRIM33 at Tyr-524, -610, and -1048.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 637-655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0481-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horiuchi M, Kuga T, Saito Y, Nagano M, Adachi J, Tomonaga T, Yamaguchi N, Nakayama Y	4. 巻 293
2. 論文標題 The tyrosine kinase v-Src causes mitotic slippage by phosphorylating an inhibitory tyrosine residue of Cdk1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 15524-15537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA118.002784	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ifuji A, Kuga T, Nakayama Y	4. 巻 5
2. 論文標題 Air-drying of cells enables visualization of antiparallel microtubule overlaps in the spindle midzone.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 MethodsX	6. 最初と最後の頁 431-437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mex.2018.04.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ifuji Aya, Kuga Takahisa, Kaibori Yuichiro, Saito Youhei, Nakayama Yuji	4. 巻 360
2. 論文標題 A novel immunofluorescence method to visualize microtubules in the antiparallel overlaps of microtubule-plus ends in the anaphase and telophase midzone	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 347 ~ 357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2017.09.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Yuichi, Nagano Maiko, Kuga Takahisa, Tada Asa, Isoyama Junko, Adachi Jun, Tomonaga Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Deep Phospho- and Phosphotyrosine Proteomics Identified Active Kinases and Phosphorylation Networks in Colorectal Cancer Cell Lines Resistant to Cetuximab	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-10478-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuki Kazumasa, Yamaguchi Noritaka, Iwasawa Shuto, Takakura Yuki, Aoyama Kazumasa, Yuki Ryuzaburo, Nakayama Yuji, Kuga Takahisa, Hashimoto Yuuki, Tomonaga Takeshi, Yamaguchi Naoto	4. 巻 490
2. 論文標題 Enhancement of TGF- β -induced Smad3 activity by c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of its coactivator SKI-interacting protein (SKIP)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.06.163	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 染谷健介、久家貴寿、村高紫野、井上直樹、谷口将済、山岸伸行
2. 発表標題 FAM83Hがケラチン骨格に局在化するために必要なアミノ酸領域の同定
3. 学会等名 第68回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩野真理、堀内麻利安、久家貴寿、齊藤洋平、山口直人、中山祐治
2. 発表標題 v-SrcはCdk1リン酸化を介して抗がん剤感受性を低下させる
3. 学会等名 第68回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋野真理、堀内麻利安、久家貴寿、齋藤洋平、山口直人、中山祐治
2. 発表標題 v-Srcにより誘導されるmitotic slippageは抗がん剤感受性を低下させる
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久家貴寿、佐々木光穂、鈴木治、中山祐治、朝長毅、山岸伸行
2. 発表標題 FAM83Hはケラチン細胞骨格を制御することでメナメル芽細胞の維持に働く
3. 学会等名 第59回 歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 居藤亜弥、久家貴寿、海堀祐一郎、齋藤洋平、中山祐治
2. 発表標題 ミットゾーン制御機構の解明を目指した新規免疫蛍光染色法の構築
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上拾石佐和、久家貴寿、齋藤洋平、山口直人、中山祐治
2. 発表標題 Rab35が制御する輸送に対するv-Srcの影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 出口桃子、西川奈央子、久家貴寿、山岸伸行
2. 発表標題 フラボノイド類による小胞体分子シャペロンGRP78 発現誘導性と伸長ポリグルタミン鎖含 有タンパク質の凝集抑制効果の検討
3. 学会等名 第67回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西脇祐貴、沢田成矢、永長遼一、久家貴寿、山岸伸行
2. 発表標題 カルシウム結合タンパク質Sorcin による伸長ポリグルタミン鎖含有タンパク質の凝集抑制 効果の検討
3. 学会等名 第67回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017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
研究分担者	佐々木 光穂 (Sasaki Mitsuho) (20432536)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 難治性疾患研究開発・支援センター・プロジェクト研究員 (84420)	
研究分担者	朝長 毅 (Tomonaga Takeshi) (80227644)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・上級研究員 (84420)	
研究分担者	山岸 伸行 (Yamagishi Nobuyuki) (60298685)	摂南大学・薬学部・教授 (34428)	