

令和 4 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10309

研究課題名(和文) TMEM16E変異による顎骨に生じる硬組織形成線維性病変の発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of fibrous-osseous lesions in the jawbone caused by TMEM16E mutation

研究代表者

水田 邦子 (MIZUTA, KUNIKO)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：40432679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、TMEM16E関連遺伝性疾患発症の分子メカニズムを解明する手がかりとして、申請者らは、TMEM16E遺伝子に認められるGDD型ミスセンス変異がTMEM16E異常タンパクを産生、蓄積することで骨系統疾患(GDD)を発症させるという仮説のもとに、疾患モデルマウスとしてTMEM16Eノックインマウスの繁殖・系統維持および表現型解析を継続して進め、疾患モデルの確立に努めてきた。しかしながら、GDDミスセンス変異型TMEM16Eノックインマウスは個体サイズが大きくなるが早期に男性不妊の傾向が認められ、研究最終年度の段階までに作製した動物モデルではGDDの臨床症状の再現まで至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、TMEM16E遺伝子の機能および生理的役割を解明することを目的とした。これまでの研究成果から、TMEM16Eに機能獲得型変異がおこると蛋白の安定性獲得による生理機能発揮がGDDを発症させることが予想される。顎骨に生じる線維骨性病変の発症機構は未だ解明されておらず、これを明らかにすることで、その病態の理解と病態に応じた治療法や将来の遺伝子治療の開発が可能になる。TMEM16Eの活性制御が骨の分化および代謝に重要な機能を果たしていることは明らかで、TMEM16Eの機能と安定化調節機構を解明することにより、様々な骨疾患の病態の理解と治療法の開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, as a clue to elucidate the molecular mechanism of the onset of TMEM16E-related hereditary diseases, we hypothesized that GDD-type TMEM16E missense mutations produce and accumulate TMEM16E abnormal proteins to develop a bone rare disorder (GDD). Based on this, we have continued to maintain the mouse strain and analyze the phenotype of TMEM16E knock-in mice, and have tried to establish a disease model. However, it was difficult to maintain the strain of the GDD missense mutant TMEM16E knock-in mouse, and no clinical symptoms of GDD could be observed in the knock-in mice.

研究分野：口腔外科

キーワード：TMEM16E ANO5 GDD

1. 研究開始当初の背景

顎骨の骨性異形成症を主要症状の一つとする顎骨骨幹異形成症 (GDD) は, TMEM16E の変異を原因とする常染色体優性の遺伝性骨系統疾患である。

イオンチャンネル様の膜貫通型蛋白をコードする TMEM16E 遺伝子の mRNA は骨格筋および骨組織に高発現している。その一方で, TMEM16E mRNA を過剰発現させた培養細胞では顕著な TMEM16E 蛋白不安定性を示しその検出に非常に苦慮する。ところが, 筋分化誘導させた培養筋芽細胞あるいは筋組織においては TMEM16E 蛋白が非常によく検出できることから, TMEM16E 機能発現組織は組織特異的な遺伝子発現だけではなく, 細胞環境が提供する翻訳後の TMEM16E 蛋白安定化により 2 重制御されていると考えた。骨格は骨組織自体が硬度を持つことにより保たれているが, メカニカルストレスによる損傷と修復により組織のターンオーバーが恒常的に起きている可塑性に富んだ組織でもある。上下顎骨あるいは四肢長管骨は持続的に方向性を持った荷重を受け続けるため, 筋組織と共通する恒常的な細胞膜損傷負荷が TMEM16E 蛋白を安定化し, 細胞膜損傷を修復する過程で GDD 変異アリル由来の gain of function 型 TMEM16E が骨性異形成症を発症させると考えている。すなわち, GDD ミスセンス変異は gain of function 型変異として骨系統疾患を, ナンセンス変異は loss of function 型変異として筋ジストロフィーをそれぞれ遅延性に発症させると予想した。

GDD 患者の報告はこれまでに国内外を含め数家系にしかなく, 極めてまれな遺伝疾患といえるが, 上下顎の骨性異形成症を必発し, 同部位にしばしば歯周組織經由の 2 次的感染を伴うため, 難治性の顎骨骨髓炎様症状を呈し, 顎骨搔爬や切除等の口腔外科的処置が必要になることが多い。本研究により GDD 病態の発症メカニズムを解明することは, 顎骨に生じる硬組織形成線維性病変の発症機構および治療方法の確立に寄与すると考えられ, 本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

GDD 患者の顎骨病変は, 混合歯列期の段階から下顎前歯部の根尖性骨性異形成症様透過像や臼歯部の綿様不透過像などを認め, 徐々に全顎の開花性骨性異形成症へ移行し, 硬組織成分の融解と線維性成分の消失により局所の循環不全に陥り, 二次的な感染により骨髓炎様症状至るといった経過をたどる。そのため腐骨化した部分の顎骨の切除術が必要になる。また, 罹患者の中には骨性異形成症が腫瘍性に増殖し顎骨の変形をきたし, 頻回の腫瘍減量術を必要とする場合もある。GDD の原因遺伝子である TMEM16E は, gain of function 型変異として骨系統疾患を, loss of function 型変異として筋ジストロフィーをそれぞれ発症させるが, 申請者はこれまでの独自の知見より骨と骨格筋に限局性病変を発症させるメカニズムに組織特異的蛋白安定化機構が関与する可能性を想定している。

これまでにわれわれは, TMEM16E ポリクローナル抗体の作製, TMEM16E ノックアウトマウスおよび GDD 型ミスセンス変異ノックインマウスを作製維持し, その解析を進めてきたが, 作製した TMEM16E ポリクローナル抗体は, マウス組織での免疫組織学的解析で非特異反応を認めることから, マウスの表現型解析を行う上で大きな障害となっていた。TMEM16E 遺伝子および遺伝子産物の特性は, TMEM16E の活性制御が骨・筋肉の分化および代謝に重要な機能を果たしていることを示唆し, 高い信頼度で TMEM16E を検出できるモノクローナル抗体を作製することは, 臨床診断ツールとして汎用性の高い特異抗体の開発や, 疾患の進行・発生を制御する治療法の開発につながる事が期待され, TMEM16E を切り口として顎骨に生じる硬組織形成線維性病変発症・病態のメカニズムの解明に役立つと考えた。

3. 研究の方法

遺伝子改変モデルマウスの表現型解析と系統維持

これまでに GDD の疾患モデルとして疾患変異ノックインマウス (TMEM16Egdd ノックインマウス) を作製している。これらマウスを用い, TMEM16E 分子機能及びミスセンス変異体の獲得機能を解析するとともに, GDD モデルマウスとして病態の解析を行った。

新規 TMEM16E モノクローナル抗体の作製と評価

これまでにマウス TMEM16E の遺伝子配列を組み込んだ免疫用プラスミドをラットに免疫し (DNA 免疫法), ハイブリドーマ細胞を作製した。解析用発現ベクター (pBomB1*/マウス TMEM16E C-term) を 293T 細胞にトランスフェクションした後 24 時間後に回収して得られた一過性強制発現 293T 細胞を用い, FCM 解析による作製したハイブリドーマのスクリーニングを行い, 特異的な反応を示すクローンを複数個確認した。特異的な反応を示すハイブリドーマクローンの組織特異性を評価するための免疫組織化学的検討を行った。

4. 研究成果

疾患モデルマウスとして TMEM16E ノックインマウスの繁殖・系統維持および表現型解析を継続して進め、疾患モデルの確立に努めてきたが、しかしながら、GDD ミスセンス変異型 TMEM16E ノックインマウスは個体サイズが大きくなるが早期に男性不妊の傾向が認められ、系統維持に努めているが、研究最終年度の段階までに作製した動物モデルでは GDD の臨床症状の再現まで至らなかった。

マウス TMEM16E の遺伝子配列を組み込んだ免疫用プラスミドをラットに免疫し (DNA 免疫法)、ハイブリドーマ細胞を作製した。作製したハイブリドーマのスクリーニングを行い、培養筋管細胞において、WB 及び免疫染色で強く特異シグナルを検出できる ハイブリドーマクローン (mTMEM16E clone:3-3) を同定した (図 1)。

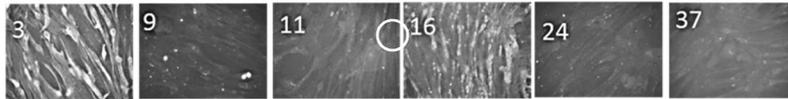


図1. 作製したハイブリドーマ細胞の培養上清を用いて細胞免疫染色を行った。
筋管誘導させた筋芽細胞で TMEM16E 蛋白特異的なシグナルが検出された。

さらに、野生型マウスの骨格筋組織の免疫組織化学的検討を行ったところ、マウス筋組織を用いた免疫染色でも新規 TMEM16E モノクローナル抗体は既製抗体よりも強いシグナルを特異的に検出することが確認できた (図 2)。

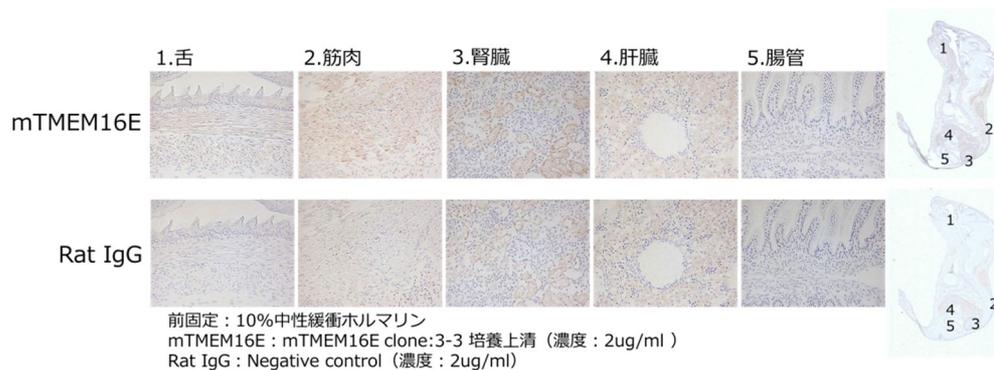


図2.IHC確認染色 (マウス新生仔 未固定凍結切片)

このため、内在性 TMEM16E の局在する細胞内小器官膜の特徴付けと形質膜へのテザリングを発見することができた。さらに、TMEM16E が DHPR とカベオリン 3 と複合体を作ることを貴重な実験ツールである TMEM16E 抗体を用いて in situ で可視化することにも成功した (業績 Biochem Biophys Res Commun. 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kubozono Kazumi, Mizuta Kuniko, Fujimoto Shinichi, Tran Ta To, Kamata Nobuyuki, Tobiume Kei	4. 巻 529
2. 論文標題 Dysferlin-deficient myotubes show tethering of different membrane compartments characterized by TMEM16E and DHPR	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 720 ~ 725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.079	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 Uetsuki Ryo, Higashikawa Koichiro, Okuda Satoshi, Yamakado Nao, Ishida Fumi, Rizqian Andra, Ono Shigehiro, Takechi Masaaki, Mizuta Kuniko, Shigeishi Hideo, Kamata Nobuyuki, Tobiume Kei	4. 巻 26
2. 論文標題 The squamous cell carcinoma cell line OM-1 retains both p75-dependent stratified epithelial progenitor potential and cancer stem cell properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101003 ~ 101003
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.101003	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 TAKECHI Masaaki, TAKAMOTO Megumi, NINOMIYA Yoshiaki, ONO Shigehiro, MIZUTA Kuniko, NAKAGAWA Takayuki, SHIGEISHI Hideo, OHTA Kouji, ISHIKAWA Kunio, TSURU Kanji	4. 巻 40
2. 論文標題 In vitro investigation of the cell compatibility and antibacterial properties of titanium treated with calcium and ozone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 712 ~ 718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2020-224	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水田 邦子, 飛梅 圭, 久保園和美, 室積 博, 武知 正晃
2. 発表標題 TMEM16Eの機能解析と特異的モノクローナル抗体の開発
3. 学会等名 第64回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水田邦子, 小野重弘, 花岡宏一, 花岡 宏, 加来真人, 佐々木和起, 室積 博, 山本多栄子, 谷本幸太郎, 武知正晃
2. 発表標題 幼児期の下顎骨関節突起骨折により生じた顔面非対称に対し顎矯正手術を行った1例
3. 学会等名 第29回 特定非営利活動法人 日本顎変形症学会
4. 発表年 2019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	飛梅 圭 (TOBIUME Kei) (40350037)	広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401)	

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