

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22725

研究課題名(和文) 歯と毛の形成を制御する上皮間葉相互シグナルの解明

研究課題名(英文) Role of Smad4-dependent signaling in epithelial cells

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)：我々はTGF-betaファミリーの成体における役割を解析するため、T細胞内シグナルに必須の転写共役因子Smad4を欠失した新しいコンディショナル・ノックアウトマウス(Smad4 cKO)を樹立した。Smad4を欠失後、約1カ月後の下顎切歯では、エナメル芽細胞を含む上皮細胞の形態異常や形成不全が認められた。さらに、歯の上皮細胞では、エナメル質の石灰化に重要なアルカリホスファターゼの発現や、鉄の沈着が著しく低下していた。これらの結果より、Smad4を介したTGF-betaファミリーのシグナルは、マウスの切歯における上皮細胞の正常な分化の機能発現に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、上皮間葉相互作用に重要な成長因子であるTGF-betaファミリーの役割を、細胞内シグナルに必須の転写共役因子Smad4のコンディショナル・ノックアウトマウス(cKO)を樹立することで解析した。Smad4 cKOマウスは、歯の上皮細胞における分化や機能発現に異常を呈した。これらの結果は、TGF-betaファミリーのシグナルを人為的に操作することにより、歯の上皮細胞の分化や機能を制御できる可能性を示唆する。TGF-betaファミリーのシグナルは、歯以外の上皮細胞に於いても重要な役割を果たす可能性があり、今回樹立したSmad4 cKOが有用な情報を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To examine a physiological role of transforming growth factor-beta family, we established a mouse line of inducible Smad4 conditional knockout (cKO). Smad4 is an essential coactivator in signaling of the family. Smad4 cKO mice showed disorganization and hypoplasia in tooth epithelial cells, such as ameloblasts. Moreover, alkaline phosphatase expression and iron accumulation were reduced in dental epithelial cells in Smad4 cKO. These findings suggest that TGF-beta family signaling through Smad4 is required for the differentiation and function of dental epithelial cells.

研究分野：骨代謝学、病態生理学

キーワード：TGF-bファミリー 転写共役因子 ノックアウトマウス 上皮細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )は、さまざまな細胞の増殖、分化、機能発現を制御する成長因子群として知られる。TGF- $\beta$  ファミリーの成長因子は、歯や皮膚などの組織形成の過程に於いて、上皮細胞や間葉系細胞から分泌され周囲の細胞に作用する上皮間葉相互作用因子としても作用する。TGF- $\beta$ ファミリーの因子は、細胞内で転写因子 Smad1 と Smad5 を活性化する Bone morphogenetic protein (BMP)や Growth and differentiation factor (GDF)の群と、転写因子 Smad2 と Smad3 を活性化する群の2つに大別できる。しかし、どちらの群も、活性化された Smad は転写共役因子 Smad4 と複合体を形成することで、核内での転写活性を発揮する。従って、Smad4 は TGF- $\beta$ ファミリーのシグナル伝達全体に関わる転写共役因子である。

Smad4 を介した細胞内シグナルの役割を解析するために、Smad4 遺伝子を欠失させたノックアウトマウスが樹立された。しかし、Smad4 を生殖細胞で欠失させると、受精卵の発生は耐性初期で致死となる。そのため、出生後の成体における Smad4 依存的シグナルの役割は、組織特異的な Smad4 コンディショナルノックアウトマウスで解析されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、出生後のマウスにおいても組織形成が継続する下顎切歯における Smad4 依存的な TGF- $\beta$ ファミリーの細胞内シグナルの役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

マウスに於いて任意の時期に Smad4 を欠失させるため、Smad4<sup>flox/flox</sup> マウスと、タモキシフェン投与依存的に全身で Cre 組み替え酵素を発現する CAG-cre/Esr1 マウスを交配し、Smad4<sup>flox/flox</sup>;CAG-cre/Esr1 マウスを新たに樹立した。出生後 10 週齢の本マウスにタモキシフェンを腹腔内投与し、Cre 酵素による Smad4 の欠失を誘導した。タモキシフェン投与後、23 日目に下顎切歯を摘出し、4%中性パラホルムアルデヒドで固定後、脱灰し、4 mm のパラフィン切片を作製して組織学的に解析した。大腸を摘出後、同様に固定して切片を作製した。解析は、アザン染色、ヘマトキシリン・エオジン染色、および、抗 Smad4 抗体 (ウサギ・ポリクローナル抗体、Cell Signaling 社) 抗リン酸化 Smad1/5/9 抗体 (ウサギ・ポリクローナル抗体、Cell Signaling 社) 抗リン酸化 Smad2/3 抗体 (ウサギ・ポリクローナル抗体、Cell Signaling 社) 抗 ALP 抗体 (ウサギ・ポリクローナル抗体、Takara Bio 社) を用いた免疫染色を行った。各一次抗体は、西洋わさびペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ抗体 (Nichirei 社) で検出した。各切片は、顕微鏡 BZ-9000 (Keyence 社) で観察した。

### 4. 研究成果

(1) Smad4 cKO マウスの下顎切歯を解析すると、象牙芽細胞などの間葉系細胞に変化は認められなかった。一方、Smad4 cKO マウスでは、分化段階の成熟期以降のエナメル芽細胞を含む上皮細胞層に低形成や扁平が観察された。

(2) そこで、Smad4、リン酸化 Smad1/5/9、およびリン酸化 Smad2/3 の局在を免疫組織学的に解析した。Smad4 cKO マウスでは抗 Smad4 抗体による染色性が低下していたことから、Smad4 の欠失が確認された。

一方、リン酸化 Smad1/5/9 とリン酸化 Smad2/3 は、コントロール群と Smad4 cKO 群の間に差を認めなかった。これは、一連のシグナル伝達経路の中で、Smad4 がリン酸化後の Smad1/5/9 や Smad2/3 と会合する分子であり、Smad4 の欠失は Smad1/5/9 や Smad2/3 のリン酸化レベルには影響しないためと予想された。従って、Smad4 cKO マウスの上皮細胞で認められた変化は、Smad4 を介した遺伝子発現の変化によるものと考えられた。

(3) さらに、Smad4 cKO マウスで変化を認めたエナメル芽細胞が、切歯形成に与える影響を解析した。歯の上皮系細胞は、歯の石灰化に重要な役割果たす。

そこで、硬組織の石灰化に中心的な役割を果たすことが知られている ALP の発現を検討した。コントロール群の上皮系細胞は、中間層、成熟期エナメル芽細胞、乳頭層などの細胞群が ALP を発現していた。一方、Smad4 cKO マウスの上皮細胞では、ALP の発現が検出限界以下に低下していることが判明した。

齧歯類の切歯は肉眼的にオレンジ色を呈する。これは、石灰化の過程でエナメル芽細胞が産生する鉄結合能を有したフェリチンの働きによる。そこで、切歯における鉄の局在をベルリン・ブルー染色で検討した。すると、コントロール群の上皮系細胞は要製造を示したのに対し、Smad4

cK0 群の上皮細胞ではシグナルが減弱していた。

これらの結果から、Smad4 cK0 マウスの切歯では石灰化が低下していることが予想されたが、マイクロ CT 解析では明確な低下は検出できなかった。

(4) Smad4 cK0 マウスは、タモキシフェン投与後約 1 カ月で長管より出血して死亡した。Smad4 cK0 マウスの脾臓は、コントロール群に比べて体積が約 3 倍に増加していたことから、貧血を呈したことが確認された。Smad4 cK0 マウスの大腸を解析すると、上皮細胞の低形成が認められた。

以上の結果より、Smad4 を介した TGF- $\beta$  ファミリーのシグナルは、出生後の切歯のエナメル芽細胞や、大腸の上皮細胞の増殖、分化、機能発現に重要な可能性が示唆された。本マウスは、Smad4 依存的なシグナルの役割を *in vivo* で解析できる、新しい実験系となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Machiya A, Tsukamoto S, Ohte S, Kuratani M, Suda N, Katagiri T.	4. 巻 137
2. 論文標題 Smad4-dependent transforming growth factor- family signaling regulates the differentiation of dental epithelial cells in adult mouse incisors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115456	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>
---

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)		

6. 研究組織（つづき）

	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	倉谷 麻衣  (Kuratani Mai)		

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