

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21677

研究課題名(和文)顎骨嚢胞自然発症マウスモデルを用いた、顎骨嚢胞形成の分子機構解明への挑戦

研究課題名(英文)The challenge to elucidate the mechanisms underlying the jaw cyst using a novel mouse model

研究代表者

犬伏 俊博(Inubushi, Toshihiro)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：30550941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Tmem2;K14-Creマウスはコントロールマウスと比較して、エナメル質の形成不全を認められた。また、HE染色の組織学的解析よりエナメル芽細胞の細胞接着の異常と細胞極性の乱れがあることを明らかにした。さらに、integrin b1、vinculinといったfocal adhesionに関与する分子のエナメル芽細胞と基底膜における発現がTmem2;K14-Creマウスにおいて低下していることが明らかになった。また、F-actinの染色性低下やClaudin1の染色性の低下をTmem2;K14-Creマウスにおいて認められたため、細胞間のtight junctionに異常が生じていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル質の形成異常は歯の存続に関わる極めて重要な病態である。エナメル質形成不全の患者は、多発性の齲蝕などによりQOLが著しく低下する。これらに対する根治的な治療法は存在しない。また、メカニズムについても不明な点が多く残されている。本研究結果は、Tmem2の遺伝子がエナメル質の形成に関わっていることを示す初めての報告である。また、顎骨嚢胞の形成についても本研究期間中に明らかにした細胞接着の異常によって一部説明することが可能である。これらの成果を踏まえ、学術雑誌に投稿準備中である。

研究成果の概要(英文)：Micro-CT analysis of epithelial-specific Tmem2 conditional knockout (Tmem2-CKO) mice exhibit significant reduction of enamel layer at postnatal day (P) 14. Histological evaluation suggests loose cell-basement membrane attachment present in Tmem2-CKO mice. The reduced and irregular expressions of vinculin and integrin b1 indicate that Tmem2 deficiency attenuated the FAs formation. Moreover, the abnormal accumulation of HA in ameloblast layer and weak immunoreactivity of claudin1 in Tmem2-CKO mice suggesting the impaired gate function of tight junction. Irregular assembly of actin filaments is also observed at apical and basal end of secretory ameloblast. Collectively, our data demonstrates the critical importance of TMEM2-dependent cell to HA rich extracellular matrix attachments and cell to cell attachments in ameloblasts differentiation and enamel matrix mineralization.

研究分野：発生生物学

キーワード：ヒアルロン酸 エナメル質形成不全 顎骨嚢胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

顎骨嚢胞は日常臨床でしばしば遭遇し、罹患患者も極めて多い。さらに臨床症状（感染など）がない限り自覚症状がなく、発見時には巨大化し、侵襲の大きな手術療法を取らざるを得ない場合も少なくない。顎骨(発育性)嚢胞形成を模倣するマウスモデルは存在せず、人を対象にした研究では限界があったため、これまでに顎骨(発育性)嚢胞形成の原因や分子機構について明らかになってこなかった。

我々は、新規ヒアルロン酸分解酵素 Tmem2 を同定し、その機能解析を進めている。その中で、Tmem2 の口腔上皮特異的ノックアウトマウスは出生時には骨格系に異常を認めないものの、生後 8 週齢において顎骨内に骨吸収を伴う嚢胞様の病変を自然発症することを見出した。Tmem2 は一次繊毛の機能発現に関わる PKHD1 遺伝子と相同配列を有しており、この PKHD1 は腎臓における多発性嚢胞形成を主徴とする多発生嚢胞腎の原因遺伝子であることが知られている。一次繊毛の機能不全は平面細胞極性の異常を介して嚢胞形成に関わることが知られており、また、顎骨における多発性歯原性角化嚢胞の原因遺伝子である PTCH 遺伝子は一次繊毛の形成・機能発現に重要なヘッジホッグシグナルの構成分子であることから、一次繊毛の機能異常が顎骨嚢胞形成の新規の分子機構であることが強く疑われる。そのため、Tmem2 の欠失は一次繊毛の機能不全により嚢胞形成を引き起こす可能性がある。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、Tmem2 の口腔上皮特異的(K14-Cre)ノックアウトマウスを解析することで、これまで明らかにされてこなかった、顎骨(発育性)嚢胞形成の分子機構に関する革新的な知見を得る。さらに、一次繊毛の機能発現においてヒアルロン酸がどのように関わっているかを検討することで、一次繊毛の機能を制御する新たな分子機構を解明する。

### 3. 研究の方法

#### ①. Tmem2 の口腔上皮特異的ノックアウトマウスの形態学的解析

Tmem2 の口腔上皮特異的ノックアウトマウス(K14-Tmem2<sup>KO</sup>)を作製し、マイクロ CT による形態学的解析や組織切片作製による組織学的解析を行う。

#### ②. Tmem2 の口腔上皮特異的ノックアウトマウスにおける細胞の動態・極性の解析

コントロールならびに Tmem2 ノックアウトマウス(K14-Tmem2<sup>KO</sup>)より下顎骨体を取り出し、組織切片を作製した。作製した組織切片は HE 染色を行い、細胞極性を解析した。また、免疫組織化学的に細胞増殖やアポトーシスといった細胞動態についての観察を行った。

#### ③. Tmem2 のノックアウトがマウスにおけるエナメル質形成不全のメカニズムの解析

Tmem2 の局在を解析可能な Tmem2 C-flag マウスを用いてエナメル上皮を含むマウス歯周組織における Tmem2 の発現を検討する。エナメル上皮細胞の細胞極性に関わる細胞接着関連因子 Vinculin, Integrin b1, Claudin1, F-actin などの組織染色を行い、細胞極性の異常を引き起こすメカニズムの検討を行う。さらに、ヒアルロン酸の染色を行うことで Tmem2 の欠失によるヒアルロン代謝への影響を検討する。

### 4. 研究成果

#### 実験①

口腔上皮特異的 Tmem2 のノックアウトマウスは、胎生 14 日目において上下顎切歯ならびに臼歯のエナメル質の低形成を認めた。上下顎骨の大きさには特に有意差は認めなかった。そこで、マイクロ CT 像を用いてエナメル質の厚み定量解析し、Control 群ならびに Tmem2 ノックアウトマウス群で比較したところ、いずれの解剖学的位置においても Tmem2 ノックアウトマウス群において有意にエナメル質の厚みが薄いことが明らかになった。さらに、3 ヶ月齢においてマイクロ CT 撮影を行い、Control 群ならびに Tmem2 ノックアウトマウス群で比較したところ、Tmem2 ノックアウトマウス群では特に臼歯部において咬耗が顕著であり、咬頭が削れて無くなっていた。また、約 20%において顎骨嚢胞を認めた。顎骨嚢胞はいずれも歯を含んでおり、歯原性の嚢胞である可能性が考えられた。しかし、顎嚢胞の発症率が 100%でないこと、また、発生部位はランダムであることから、さらに解析を進めることは難しいと判断した。エナメル質の形成不全を示すマウスの中には同様に顎骨嚢胞を生じるという報告もあることから、エナメル質の形成不全のメカニズムを解析することにより、顎嚢胞の発生機序についても明らかになる可能性があると考え、以降の実験ではエナメル質形成不全の発症メカニズムについての解析を優先して進めることとした。

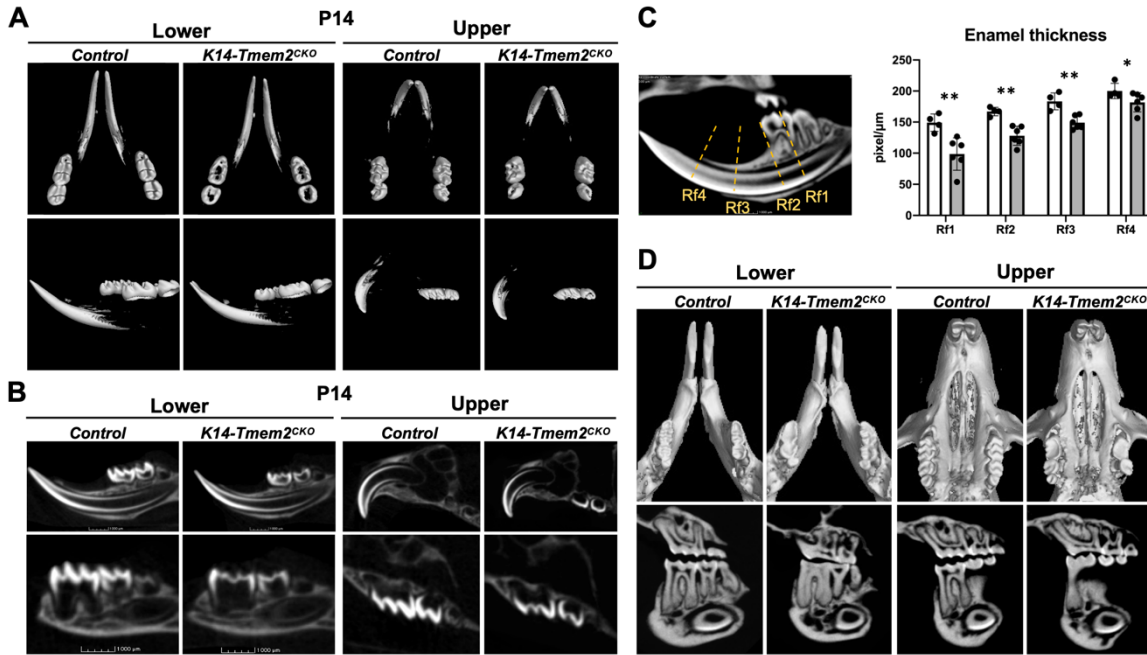


図 1. *Tmem2* ノックアウトマウス (*K14-Tmem2<sup>CKO</sup>*) は、胎生 14 日 (P14) にてエナメル質の菲薄化を認める。3 次元構築像 (A)、スライス像 (B)。エナメル質の定量解析を行った結果、*K14-Tmem2<sup>CKO</sup>* (色付き) において有意にエナメル質の厚みが薄くなっていることが明らかになった (C)。3 ヶ月齢においてマイクロ CT 撮影を行い比較したところ、*Tmem2* ノックアウトマウス群では特に臼歯部において著しい咬耗を認めることが明らかになった。

### 実験②

コントロール群と比較して *Tmem2* ノックアウトマウス (*K14-Tmem2<sup>CKO</sup>*) 群では、前エナメル芽細胞 (PAB)、分泌エナメル芽細胞 (SAB)、成熟期エナメル芽細胞 (MAB) いずれにおいてもエナメル芽細胞の基底膜からの剥離と細胞間隙の増大を認めた。また、細胞極性の乱れを認めた。これらの結果より、*Tmem2* はエナメル上皮の細胞接着において重要な役割を果たしていると考えられた。

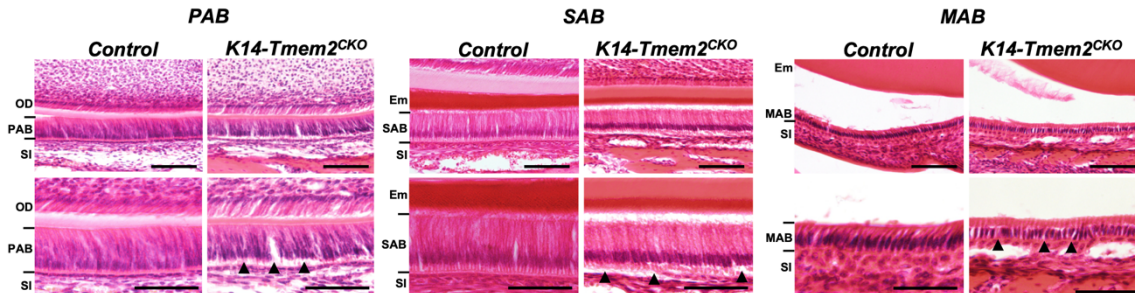


図 2. *Tmem2* ノックアウトマウス (*K14-Tmem2<sup>CKO</sup>*) では、前エナメル芽細胞 (PAB)、分泌エナメル芽細胞 (SAB)、成熟期エナメル芽細胞 (MAB) いずれにおいてもエナメル芽細胞の基底膜からの剥離と細胞間隙の増大を認めた。

### 実験③

次に、*Tmem2* の発現を検出可能な C-Flag マウスを用いて切歯の歯胚における *Tmem2* の発現を抗 Flag 抗体を用いて検討を行った。その結果、エナメル上皮の基底膜側に強発現していることが明らかになった。前エナメル芽細胞 (PAB) や成熟期エナメル芽細胞 (MAB) においても発現を認めるが、これらの細胞層では *Tmem2* の発現に極性を認めない。

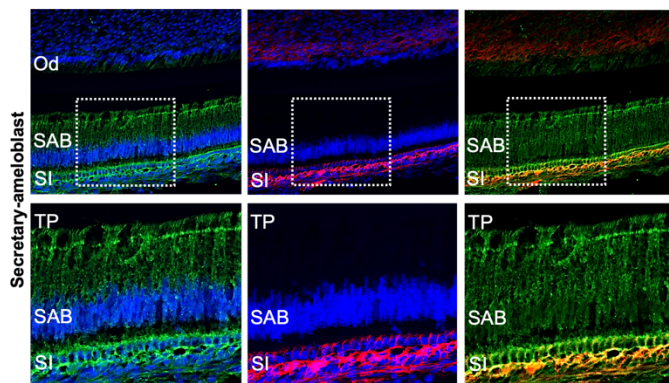


図 3. *Tmem2* は分泌エナメル芽細胞 (SAB) において apical と basal において発現を認める。特に、基底膜 (SI) において強く発現している。TP: トームス突起。

Tmem2はIntegrin  $\beta 1$ と結合することでfocal adhesionの形成に関わっていることが示されている(Firie et al., 2021 J Biol Chem)。そこで、Tmem2のノックアウトマウスにおいてVinculin, Integrin  $\beta 1$ の発現を調べた。その結果、Tmem2ノックアウトマウスにおいて基底膜側にてVinculinやIntegrin  $\beta 1$ の発現が著しく低下していることが明らかになった(図4A, B)。これらの結果は、HE染色組織切片においてTmem2ノックアウトマウスのエナメル芽細胞が基底膜から剥離している結果を裏付けている。また、基底膜側においてヒアルロン酸が豊富に存在していることが知られており、このことからエナメル芽細胞が基底膜にfocal adhesionを介して強固に接着するためにはTmem2が必要であることが明らかになった。基底膜における細胞接着はborder機能を有しており、ヒアルロン酸を含む水溶性の分子がエナメル芽細胞層に進入しないように制御していることが知られている。また、HE染色組織切片にてTmem2ノックアウトマウスでは細胞間の接着が疎になっていたことから、細胞間の接着機構に異常が生じている可能性を考えた。そこで、まずHA結合タンパクにてHAの局在を確認した。その結果、control群ではHAはエナメル芽細胞層では局在を認めないのに対して、Tmem2ノックアウトマウス群では基底膜を超えてエナメル芽細胞層に進入していることが明らかになった(図4C)。そこで、細胞間接着に重要であるClaudin1やactinケーブルの発現を組織化学的手法にて検討したところ、Claudin1の発現は連続性が失われて不規則になっており、F-actinにおいても同様の発現パターンを示したことから、細胞間接着が一部失われていることが明らかになった(図4D)。

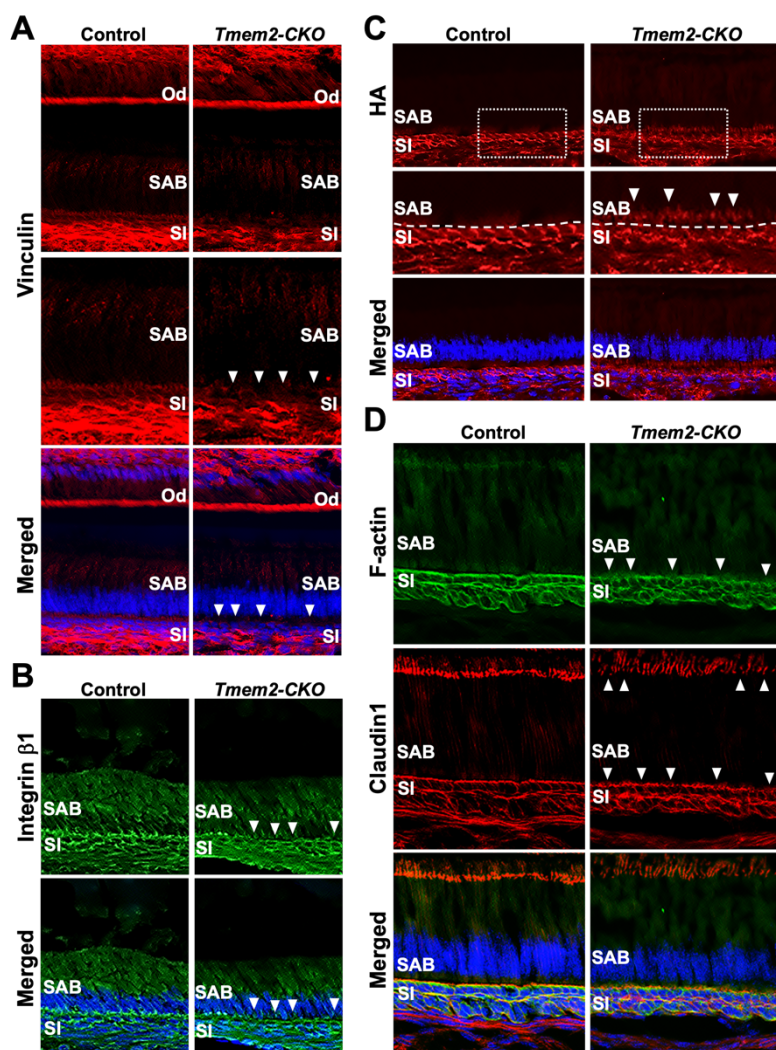


図4. Tmem2のノックアウトマウスでは、controlマウスと比較して基底膜(SI)におけるVinculinの発現が低下していることが明らかになった(A)。さらに、integrin  $\beta 1$ の発現についてもTmem2ノックアウトマウスの基底膜とエナメル芽細胞との境界において低下していることが明らかになった(B)。ヒアルロン酸結合タンパク(HABP)を用いたヒアルロン酸の局在の検討では、エナメル芽細胞におけるヒアルロン酸の発現が、Tmem2ノックアウトマウスにおいて増加していた(C)。さらに、細胞間接着分子であるF-actinならびにClaudin1の発現はTmem2ノックアウトマウスにおいて連続性が失われており、細胞間接着の異常が疑われた(D)。

Tmem2はエナメル芽細胞をはじめ基底膜を含んだエナメル器において発現が認められ、Tmem2のノックアウトマウスではIntegrin  $\beta 1$ を含むfocal adhesionの形成が抑制されており、エナメル芽細胞の基底膜への接着が疎になっており、これによって基底膜のborder機能が失われていることが明らかになった。これにより、Tmem2のノックアウトマウスではエナメル質の形成低下やエナメル質の脆弱化が起こっていることが分かった。興味深いことに、Integrin  $\beta 1$ のノックアウトマウスはTmem2ノックアウトマウス同様のエナメル質の低形成に加えて、嚢胞を自然発症することが知られており、本研究期間では十分に明らかにできなかったが、Tmem2のノックアウトマウスにおいて認められて顎骨嚢胞はfocal adhesionの形成異常によって引き起こされている可能性が考えられる。今後その点を踏まえて、Tmem2のノックアウトマウスにおける顎骨嚢胞形成メカニズムを明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nag Priyanka, Toshihiro Inubushi, Yuichiro Nakanishi, Yu Yamaguchi, Takashi Yamashiro
2. 発表標題 Epithelial-specific Tmem2 plays an essential role in tooth development
3. 学会等名 9th IOC (国際学会)
4. 発表年 2020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	田中 晋 (TANAKA SUSUMU) (00367541)	大阪大学・歯学研究科・教授  (14401)	
研究分担者	黒坂 寛 (KUROSAKA HIROSHI) (20509369)	大阪大学・歯学部附属病院・講師  (14401)	
研究分担者	内橋 俊大 (UCHIHASHI TOSHIHIRO) (60757839)	大阪大学・医学部附属病院・助教  (14401)	
研究分担者	山城 隆 (YAMASHIRO TAKASI) (70294428)	大阪大学・歯学研究科・教授  (14401)	

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