

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893176

研究課題名(和文) 外胚葉異形成症の新たな発症機構 -ストア作動性カルシウム流入の異常- の解明

研究課題名(英文) Analysis for the novel mechanisms of ectodermal dysplasia -the involvement of Store-operated calcium entry's abnormality-.

研究代表者

梅田 まりこ (Umeda, Mariko)

九州大学・大学病院・その他

研究者番号：40707618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は新規外胚葉異形成症原因遺伝子と考えられるSTIMファミリーの役割を調べ、ストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入の生物学的意義を検索することを目的とした。研究の結果、STIM1はマウス切歯のエナメル芽細胞の成熟期に特異的に発現し、上皮細胞間接着に関連するClaudin-1の発現と相関を有することがわかった。また、マウス切歯におけるエナメル芽細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度の蛍光イメージングを行い、方法を確立した。さらに、上皮特異的STIM遺伝子欠損マウスを作成し表現形解析を行った。これらの結果から、STIM1はストア作動性Ca<sup>2+</sup>流入を介してエナメル基質の石灰化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the biological roles of store operated calcium entry (SOCE) regulated by STIM gene family, the possible novel responsible genes of ectodermal dysplasia, on epithelial cells/tissues.

Immunohistochemistry revealed that STIM1 protein was distinctively expressed in maturation stage of ameloblasts, and co-localized with the Claudin-1, a protein with important functions on epithelial cell-cell junctions. We established a method for fluorescence image analysis of intra-cellular calcium concentration in mouse incisors by using multi-photon microscopy. Furthermore, we performed phenotypic analysis of epithelial cell specific STIMs deficient mice, and found that the mice showed the phenotypes resembling human amelogenesis imperfecta.

These results suggest that the STIM1 plays important roles on enamel matrix mineralization through regulating the cellular SOCE and following functional changes.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：STIM1

### 1. 研究開始当初の背景

外胚葉異形成症 (Ectodermal Dysplasia: ED) は、歯・毛髪・唾液腺・汗腺・爪など、主に全身の外胚葉由来の組織に異常を認める疾患群であり、発症頻度は 1 万人に 7 人 (7/10,000) と言われている (Am J Med Genet C Semin Med Genet. 2004; 131C(1):45-51)。臨床症状の中で歯科的に注目されるのは、外胚葉組織の機能不全により、歯数の減少やエナメル質形成不全症、歯の形態異常 (円錐歯・咬頭の縮小・副咬頭の出現) の出現が多いという点である (J Orofac Orthop. 2006; 67(5):347-55)。また、耳下腺の形成不全による唾液量の減少が加わると、非常に高いカリエスリスクにつながるという点も挙げられる (J Orofac Orthop. 2006; 67(5):347-55)。さらに、ED は口蓋裂を伴うこともあり、近年、厚生労働大臣が定める先天異常疾患として歯科矯正治療の保険適用が認められ、矯正歯科臨床の場を ED 患者が訪れる機会も次第に多くなっている。

### 2. 研究の目的

これまで、この遺伝性疾患の発症に関わる多様な原因遺伝子が示されてきたが、近年、新たに「ストア作動性カルシウム ( $Ca^{2+}$ ) 流入」に関連する分子群が、その表現型の発現に関与している可能性が示された。本研究の目的は、ストア作動性  $Ca^{2+}$  流入を担う間質相互作用分子 1 (STIM1) などの  $Ca^{2+}$  シグナル関連分子が ED の発症に関与する分子メカニズムを解明することにある。これにより、歯や毛髪、あるいは唾液腺の形態形成の分子メカニズムを解明し、歯や毛髪、唾液腺の再生などを目指した再生医療の基盤的知識の蓄積に貢献する。

### 3. 研究の方法

(1) 毛包、歯胚 (エナメル芽細胞) におけるストア作動性  $Ca^{2+}$  流入機構に関わる分子群の発現プロファイルを RT-PCR 法・免疫組織化学的解析にて確認する。

(2) 毛包、歯胚器官培養系における  $Ca^{2+}$  流入機構変化の蛍光プローブを用いた多光子顕微鏡下におけるリアルタイム解析・ $Ca^{2+}$  シグナル伝達-関連遺伝子発現変化を蛍光共焦点顕微鏡下における解析をおこなう。

(3) STIM1 および STIM1/2 遺伝子欠損マウスを用いて、ストア作動性  $Ca^{2+}$  流入の異常 (STIM1 および STIM1/2 の遺伝子異常) が、毛包・歯胚の発生 (数)・分化 (機能) にどのような影響を与えるか (すなわち上皮間葉相互作用と細胞分化 (細胞間接着・細胞骨格) への影響を in vivo にて解析する。

### 4. 研究成果

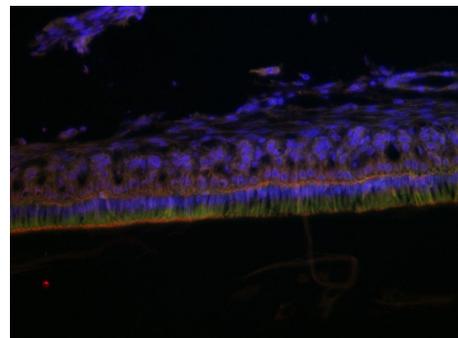
(1) マウス歯胚において RT-PCR を行ったところ、P1-12 のいずれの時期においても、

カルシウム流入に影響を与える、TRPC1、ORAI1、STIM1、STIM2 の発現が確認された。また、これらの分子に関して、HAT7 (ラットエナメル芽細胞株) において、タンパク質の発現を Western blotting 法において確認したところ、全ての分子の発現が確認された。さらに、これら分子の発現が、エナメル芽細胞の初期分化において変化が見られるか否かを確認するため、TGF $\beta$ 1 (5ng/ml)、BMP2 (300ng/ml)、NT4 (100ng/ml) を添加して、3 日、6 日間培養を行い、タンパク質を回収して Western blotting を行ったが、TRPC1、ORAI1、STIM1、STIM2 のいずれも発現量の変化が見られなかった。

そこで、異なる発生段階が認められるマウス毛包・切歯・臼歯切片を作成し免疫組織化学法により発現の局在の解析を行った。その結果、特にエナメル芽細胞において STIM1 発現が強く認められた。マウス切歯免疫染色の結果によるとエナメル芽細胞前分泌期、分泌期、前期成熟期には弱いシグナルが認められたが、成熟期に最も高いシグナルが観察された。しかし、後期成熟期、退縮期には発現が認められなかった。同様に、臼歯におけるエナメル芽細胞においては、P6 では STIM1 の発現は低く、P12 で発現が上昇していることが確認できた。この結果より、STIM1 がエナメル質の形成時期特異的に発現しており、エナメル基質の再吸収時期 (成熟期) に重要な役割を果たしていることが推測された。

さらに、免疫組織化学法による発現解析に、上皮細胞を介しての物質輸送に重要な機能を有するタイトジャンクションである Claudin-1 及び Zo-1 の発現解析を加え、エナメル芽細胞での STIM1 の発現との関連性を解析した。その結果、エナメル芽細胞分化過程において STIM1 の発現と Claudin-1 の発現に相関性が認められた (図 1)。これは、STIM1 がエナメル芽細胞の細胞間接着に関連することを示唆する。また、毛包および、唾液腺においても STIM1 の発現を確認できた。これらの組織においてはその発現パターンをさらに詳細に確認する必要がある。

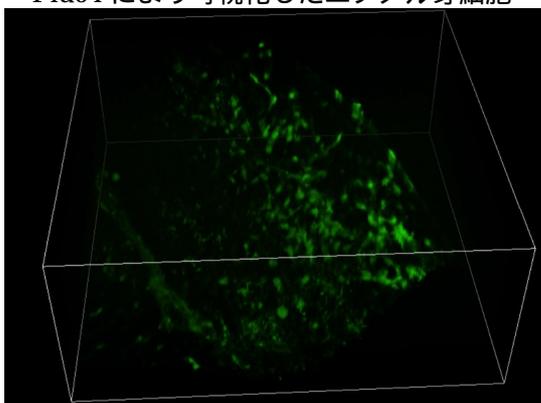
図 1  
STIM1 と Claudin-1 の多重染色像



(2)マウス歯胚(P1)において、Fluo4 を負荷後、蛍光強度を指標として高速多光子共焦点レーザー顕微鏡下で ex vivo におけるエナメル芽細胞内の  $Ca^{2+}$ 濃度変化をリアルタイムに測定する方法を確立した(図 2)。引き続き、 $Ca^{2+}$ シグナル伝達-関連遺伝子発現変化を蛍光共焦点顕微鏡下における解析を継続中である。また、(3)において作成した遺伝子欠損マウスを用いてこのリアルタイムイメージングを行う予定である。これに関しては、P12以降の切歯を使用する予定であり、P1 とはまた異なる条件検討が必要になる可能性がある。

図 2

Fluo4 により可視化したエナメル芽細胞



(3)さらに、上皮特異的 STIM 遺伝子欠損マウス (K14-Cre/STIM1<sup>flox/flox</sup> および K14-Cre/STIM1<sup>flox/flox</sup>STIM2<sup>flox/flox</sup>)の作成に成功した。現在表現形の解析を進めているところであるが、歯数の異常や顕著な毛胞の異常は見られていない。しかしながら、未だ解析は終了していないものの、上記マウスは、いずれも野生型マウス(図 3A)と比較してエナメル質形成に異常が有り、ヒトエナメル質形成不全症に類似した表現型を示している(図 3B)。

図 3



A: Control, B: K14Cre - STIM1<sup>f/f</sup>,STIM2<sup>f/f</sup>  
C: K14Cre - STIM1<sup>f/f</sup>,STIM2<sup>f/+</sup>, D: K14Cre - STIM1<sup>f/+</sup>,STIM2<sup>f/f</sup>

本研究の結果は、ごく最近報告された

STIM 1 の欠損患者あるいは SNP を有する患者において、Hypomaturation type のエナメル質形成不全症が発症しているという報告結果をサポートする。本研究の結果得られたマウスモデルを解析することは、in vitro で完全に再現することが困難な ED 患者の毛と歯の表現型について、その発症メカニズムの解明の一助となると考える。また、多光子顕微鏡を用いた歯胚の観察方法は独創的なものであり、今後の蛍光イメージング方法の 1 分野として確立を図りたいと考えている。また、今後、本研究の結果を更に発展させ、歯科のみならず全身的に影響を与える ED の新規発症メカニズム解明に有益な情報を得て、最終的には毛髪・歯の発生メカニズムや再生に役立つ知見を得ることを目指す。

#### 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 1 件)

① Umeda M, Terao F, Miyazaki K, Yoshizaki K, Takahashi I. MicroRNA-200a Regulates the Development of Mandibular Condylar Cartilage. Journal Dental Research 査読有、vol.94(6) 2015 pp795-802 DOI: 10.1177/0022034515577411

〔学会発表〕(計 1 件)

① 梅田まりこ、寺尾文恵、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、高橋一郎  
胎生期マウス下顎頭軟骨における microRNA-200a の役割 . 第 72 回日本矯正歯科学会大会,松本, 2013 10. 7-9

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅田 まりこ (Umeda, Mariko)

九州大学病院・学術研究員

研究者番号：1000040707618

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：