

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460081

研究課題名(和文) FAM83H遺伝子変異に起因するエナメル形成不全症の発症メカニズム解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism by which mutations of the FAM83H gene cause amelogenesis imperfecta

研究代表者

久家 貴寿 (Kuga, Takahisa)

京都薬科大学・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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：FAM83Hは歯の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。これまでに我々は、FAM83Hが、大腸がん細胞において、ケラチン骨格制御に関わっていることを明らかにしてきた。本研究課題では、エナメル上皮系細胞株においても、FAM83Hがケラチン骨格構築を制御していることを明らかにした。FAM83H変異タンパク質の発現で、エナメル上皮系細胞のケラチン骨格が壊れることが明らかになり、それに付随してデスモソームの形成に異常が出る可能性が示唆された。さらに我々は、ヒトの患者と類似のFAM83H遺伝子変異を持つマウスを作成した。現在、このマウスを用いて、in vivoでの解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：FAM83H plays an essential role in the formation of dental enamel and its heterozygous mutation causes autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. We have demonstrated that FAM83H regulates the organization of the keratin cytoskeleton in human colorectal cancer cells. In the present study, we showed that the keratin cytoskeleton in cultured ameloblastoma cells is also regulated by FAM83H. Mutant proteins of FAM83H prevented proper organization of the keratin cytoskeleton and concomitantly dis-localized component proteins of desmosomes form the cell-cell interface in cultured ameloblastoma cells. We additionally generated mice with a mutation in the FAM83H gene. We are testing whether the FAM83H mutation causes the disorganization of the keratin cytoskeleton and desmosomes in dental ameloblasts in vivo.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：エナメル質形成不全症 FAM83H ケラチン

1. 研究開始当初の背景

FAM83H は、歯のエナメル質形成不全症の原因遺伝子として、2008 年に特定された。本研究計画の開始当初 (2013 年) において、FAM83H がエナメル質形成時にどのような役割を担っているのか、FAM83H の遺伝子変異でなぜ疾患が起こるのかが全く分かっていなかった。

我々は、2013 年に、FAM83H が大腸がんを高発現していることを報告した。FAM83H が高発現すると、CK1 キナーゼの機能が異常となり、ケラチン骨格が崩壊することを明らかにした [Kuga et al., J Cell Sci, 2013]。

ケラチン骨格は、正常なエナメル質形成に必要であることが知られていた。エナメル質形成を担うエナメル上皮細胞 (エナメル芽細胞など) では、ケラチン 5、ケラチン 14 が発現しており、ケラチン 14 の遺伝子変異でエナメル質形成異常が起こることが報告されていた。ケラチン骨格は、デスモソーム細胞間接着構造体、ヘミデスモソーム細胞-細胞外基質間接着構造体の支持体としての働きを持つ。これら接着構造体の異常がエナメル質形成異常に繋がることも知られていた。

以上のことから、我々は次のような仮説を立てていた。FAM83H の遺伝子変異は、エナメル芽細胞などのケラチン骨格を異常にし、その結果、デスモソームやヘミデスモソームの形成が阻害され、エナメル質形成が異常になる。

2. 研究の目的

大腸がん細胞においてだけでなく、エナメル上皮細胞においても、FAM83H がケラチン骨格を制御しているのかどうかを検討し、FAM83H 変異タンパク質がケラチン骨格の異常を誘導するのかどうかを検討した。さらに、FAM83H 遺伝子変異の影響を *in vivo* で調べるために、FAM83H 遺伝子改変マウスを作成した。

3. 研究の方法

(1) エナメル上皮系細胞株を用いた FAM83H の機能解析 (ケラチン骨格制御への関与の検討)

研究に用いるエナメル上皮系細胞株としては、ヒトのエナメル芽細胞株が望ましい。しかし、これまでにヒトのエナメル芽細胞株は樹立されていないため、代わりに、ヒトのエナメル上皮腫から樹立された細胞株 (HAM2 および HAM3 細胞株) を用いて、FAM83H の機能解析を行った。HAM 細胞株は、エナメル芽細胞と同様に、ケラチン 14 やいくつかのエナメルマトリクスタンパク質を発現する [Hatakeyama et al., J Oral Pathol Med, 2011]。

FAM83H の機能解析は、FAM83H の過剰

発現法とノックダウン法などを用いて行った。FAM83H の発現量変化がケラチン骨格に与えるの影響を、抗ケラチン 14 抗体などを用いた免疫染色法で調べた。

ケラチン骨格に与える FAM83 遺伝子変異の影響は、変異型 FAM83H の発現ベクターを用いて行った。ヒトの患者で検出される全ての変異型 FAM83H 遺伝子では、ナンセンス変異などによる早期ストップコドンが生じる。本研究では、287 番目の Ser のナンセンス変異遺伝子 (FAM83H-S287X) と 297 番目の Tyr のナンセンス変異遺伝子 (FAM83H-Y297X) から発現するタンパク質の発現ベクターを用いた。FAM83H 変異タンパク質を発現させた細胞のケラチン骨格を、抗ケラチン 14 抗体などを用いた免疫染色法で調べた。

(2) FAM83H 遺伝子改変マウスの作成

ヒトの患者と同様に、FAM83H 遺伝子に早期ストップコドンを持つ遺伝子改変マウスを、CRISPR/Cas9 システムを用いて作成した。マウス FAM83H の標的配列を組み込んだ pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 ベクターを、2 細胞期の胚に注入し、偽妊娠 Slc:ICR マウスの卵管に移植した。ヘテロ接合型の FAM83H 遺伝子改変マウスを樹立した後、そのオスとメスを掛け合わせることで、ホモ接合型の FAM83H 遺伝子改変マウスを作成した。

4. 研究成果

(1) FAM83H はエナメル上皮系細胞株のケラチン骨格構築を制御する

HAM2 細胞に FAM83H siRNA を導入し、ケラチン 14 の免疫染色を行った。Control siRNA を導入した細胞では、細胞全体がケラチン線維で覆われていたが、FAM83H siRNA を導入した細胞では、細胞辺縁部のケラチン骨格が顕著に消失していた (図 1)。

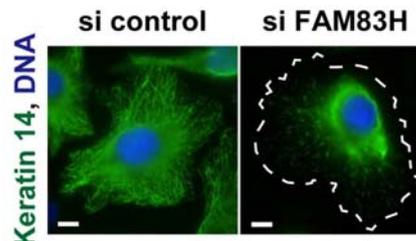


図 1. siRNA を導入した HAM2 細胞の免疫染色像。青: DAPI による DNA 染色、緑: 抗ケラチン 14 抗体を用いた染色。

次に FAM83H を過剰発現させた HAM2 細胞の免疫染色を行った。FAM83H の過剰発現は、ケラチン線維を消失させ、代わりに細胞内小胞様のケラチン構造体を形成させた (図 2)。以上の結果から、エナメル上皮系細胞

のケラチン骨格構造が、FAM83H の発現レベルによって制御されていることが示唆された。

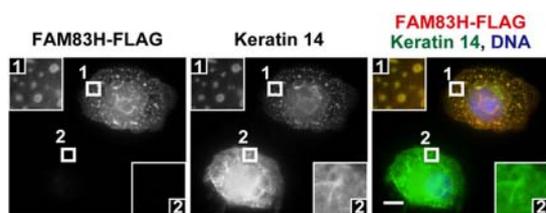


図 2. FAM83H-FLAG 発現ベクターを導入した HAM2 細胞の免疫染色画像。赤：抗 FAM83H 抗体を用いた免疫染色像、緑：抗ケラチン 14 抗体を用いた免疫染色像、青：DAPI による DNA 染色像。

(2) FAM83H 変異タンパク質はケラチン骨格を異常にする

FAM83H 変異タンパク質 (FAM83H-S287X または FAM83H-Y297X) を過剰発現させた HAM2 細胞または HAM3 細胞の免疫染色を行った。FAM83H 変異タンパク質を発現した細胞では、細胞辺縁部のケラチン線維が消失していた (図 3)。この結果は、エナメル上皮系細胞のケラチン骨格が FAM83H 変異タンパク質発現によって異常になることを示唆していた。

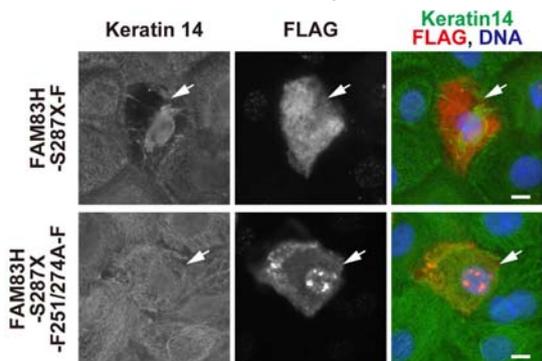


図 3. FLAG 標識型 FAM83H 変異体発現ベクターを導入した HAM3 細胞の免疫染色画像。赤：抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色像、緑：抗ケラチン 14 抗体を用いた免疫染色像、青：DAPI による DNA 染色像。

我々は、2013 年に、FAM83H が、CK1 キナーゼをケラチン骨格上に係留させる働きを持つことを明らかにしていた。FAM83H-S287X は、CK1 結合領域を持つが、ケラチン結合領域を持たないため、FAM83H-S287X の作用は CK1 の結合を介して起こっている可能性が考えられた。この可能性は、CK1 結合領域に変異を持つ FAM83H-S287X 発現ベクター (FAM83H-S287X-F251/274A) を用いた結果から支持された。CK1 との結合能を持たない FAM83H-S287X-F251/274A は、ケラチン骨格構築に影響を与えなかった (図 3)。CK1 阻害剤 D4476 を HAM 細胞に添加した場合でも、ケラチン骨格の異常が誘導されたこと

から、おそらく FAM83H 変異タンパク質はドミナントネガティブ効果で CK1 の機能を阻害し、ケラチン骨格の異常を生じさせているものと思われた。

(3) FAM83H 変異タンパク質によるケラチン骨格異常はデスモソームの形成を阻害する

FAM83H 変異タンパク質発現によってケラチン骨格が異常になった HAM3 細胞では、デスモソーム構成タンパク質の細胞内局在異常が観察された (図 4)。この結果は、FAM83H 変異体によって誘導されるケラチン骨格異常が、デスモソーム形成・維持を妨げた可能性を示唆した。このような、ケラチン骨格異常に付随したデスモソーム形成異常が、生体内のエナメル芽細胞で実際に起こっているのかどうかを、今後 in vivo で検討する必要がある。

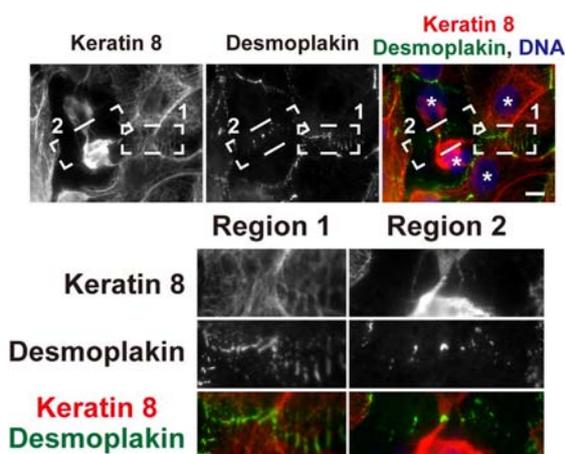


図 4. FLAG 標識型 FAM83H 変異体発現ベクターを導入した HAM3 細胞の免疫染色画像。赤：抗ケラチン 8 抗体を用いた免疫染色像、緑：抗デスモプラキン抗体を用いた免疫染色像、青：DAPI による DNA 染色像。

(4) FAM83H 遺伝子改変マウスの作成

培養細胞で見られた FAM83H 変異タンパク質の作用が、実際に生体内のエナメル芽細胞で見られるのかどうかを検討するために、FAM83H 遺伝子改変マウスを作成した。ゲノムシーケンス解析によって、FAM83H-S287X 変異と類似した変異が、マウスに導入されたことを確認した。ヘテロ接合型、ホモ接合型のマウスの両方を作成し、それらが変異タンパク質を発現していることも確認した。現在、これらのマウスを用いて、エナメル質形成不全症の疾患発症メカニズムの解明に向けた解析を進めている。今後は、この疾患モデルマウスを用いて、新規治療法の開発も進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件) 全て査読有

1. Mikami H, Saito Y, Okamoto N, Kakihana A,

- Kuga T, Nakayama Y.**
Requirement of Hsp105 in CoCl₂-induced HIF-1 α accumulation and transcriptional activation.
Experimental Cell Research, 352:225-233, 2017
2. Yamaguchi N, Shibasaki M, Yamada C, Anzai E, Morii M, **Nakayama Y, Kuga T**, Hashimoto Y, **Tomonaga T**, Yamaguchi N. Tyrosine Phosphorylation of the Pioneer Transcription Factor FoxA1 Promotes Activation of Estrogen Signaling.
Journal of Cellular Biochemistry, 118:1453-1461, 2017
 3. Morii M, Kubota S, Honda T, Yuki R, Morinaga T, **Kuga T, Tomonaga T**, Yamaguchi N, Yamaguchi N. Src Acts as an Effector for Ku70-dependent Suppression of Apoptosis through Phosphorylation of Ku70 at Tyr-530.
Journal of Biological Chemistry, 292:1648-1665, 2017
 4. Kakae K, Ikeuchi M, **Kuga T, Saito Y**, Yamaguchi N, **Nakayama Y.**
v-Src-induced nuclear localization of YAP is involved in multipolar spindle formation in tetraploid cells.
Cell Signalling, 30:19-29, 2017
 5. **Kuga T**, Kume H, Adachi J, Kawasaki N, Shimizu M, Hoshino I, Matsubara H, **Saito Y, Nakayama Y, Tomonaga T.**
Casein kinase I is recruited to nuclear speckles by FAM83H and SON.
Scientific Reports, 6:34472, 2016
 6. **Kuga T, Sasaki M**, Mikami T, Miake Y, Adachi J, Shimizu M, **Saito Y**, Koura M, Takeda Y, Matsuda J, **Tomonaga T, Nakayama Y.**
FAM83H and casein kinase I regulate the organization of the keratin cytoskeleton and formation of desmosomes.
Scientific Reports, 6:26557, 2016
 7. Kikuchi W, Nishimura M, **Kuga T**, Tsuchida S, Saito T, Satoh M, Noda K, Kodera Y, **Tomonaga T**, Nomura F.
Fibrinogen alpha C chain 5.9 kDa fragment (FIC5.9), a biomarker for various pathological conditions, is produced in post-blood collection by fibrinolysis and coagulation factors.
Clinical Proteomics, 13:27, 2016
 8. Bologna-Molina R, Takeda Y, **Kuga T**, Chosa N, Kitagawa M, Takata T, Ishisaki A, Mikami T.
Expression of Wilms' tumor 1 (WT1) in ameloblastomas.
Journal of Oral Science, 58:407-413, 2016
 9. Ikeuchi M, Fukumoto Y, Honda T, **Kuga T, Saito Y**, Yamaguchi N, **Nakayama Y.**
v-Src Causes Chromosome Bridges in a Caffeine-Sensitive Manner by Generating DNA Damage.
International Journal of Molecular Sciences, 17:871, 2016
 10. **Saito Y**, Nakagawa T, Kakihana A, Nakamura Y, Nabika T, Kasai M, Takamori M, Yamagishi N, **Kuga T**, Hatayama T, **Nakayama Y.**
Yeast Two-Hybrid and One-Hybrid Screenings Identify Regulators of hsp70 Gene Expression.
Journal of Cellular Biochemistry, 117:2109-2117, 2016
 11. Iwamoto E, Ueta N, Matsui Y, Kamijyo K, **Kuga T, Saito Y**, Yamaguchi N, **Nakayama Y.**
ERK Plays a Role in Chromosome Alignment and Participates in M-Phase Progression.
Journal of Cellular Biochemistry, 117:1340-1351, 2016
 12. Yamaguchi N, Yuki R, Kubota S, Aoyama K, **Kuga T**, Hashimoto Y, **Tomonaga T**, Yamaguchi N
c-Abl-mediated tyrosine phosphorylation of JunB is required for Adriamycin-induced expression of p21.
The Biochemical journal, 47: 67-77, 2015
 13. Aoyama K, Yamaguchi N, Yuki R, Morii M, Kubota S, Hirata K, Abe K, Honda T, **Kuga T**, Hashimoto Y, **Tomonaga T**, Yamaguchi N.
c-Abl induces stabilization of histone deacetylase 1 (HDAC1) in a kinase activity-dependent manner.
Cell Biology International, 39: 446-456, 2015
 14. Kubota S, Morii M, Yuki R, Yamaguchi N, Yamaguchi H, Aoyama K, **Kuga T, Tomonaga T**, Yamaguchi N.
Role for Tyrosine Phosphorylation of A-kinase Anchoring Protein 8 (AKAP8) in its Dissociation from Chromatin and the Nuclear Matrix.
Journal of Biological Chemistry, 290: 10891-10904, 2015
 15. Kazami T, Nie H, Satoh M, **Kuga T**, Matsushita K, Kawasaki N, **Tomonaga T**, Nomura F.
Nuclear accumulation of annexin A2 contributes to chromosomal instability by coillin-mediated centromere damage.
Oncogene, 34: 4177-4189, 2015
 16. **Kuga T**, Nie H, Kazami T, Satoh M, Matsushita K, Nomura F, Maeshima K, **Nakayama Y, Tomonaga T.**
Lamin B2 prevents chromosome instability by ensuring proper mitotic chromosome segregation.
Oncogenesis, 3: e94, 2014

17. Kume H, Muraoka S, **Kuga T**, Adachi J, Narumi R, Watanabe S, Kuwano M, Kodera Y, Matsushita K, Fukuoka J, Masuda T, Ishihama Y, Matsubara H, Nomura F, **Tomonaga T**.
Discovery of colorectal cancer biomarker candidates by membrane proteomic analysis and subsequent verification using selected reaction monitoring (SRM) and tissue microarray (TMA) analysis.
Molecular and Cellular Proteomics, 13: 1471-1484, 2014
18. **Nakayama Y**, **Saito Y**, Soeda S, Iwamoto E, Ogawa S, Yamagishi N, **Kuga T**, Yamaguchi N.
Genistein induces cytokinesis failure through RhoA delocalization and anaphase chromosome bridging.
Journal of Cellular Biochemistry, 115: 763-771, 2014
19. Yamagishi N, Nakaoka R, Kondo R, Nishitani M, **Saito Y**, **Kuga T**, Hatayama T, **Nakayama Y**.
Increased expression of sorcin is associated with multidrug resistance in leukemia cells via up-regulation of MDR1 expression through cAMP response element-binding protein.
Biochemical and Biophysical Research Communications, 448: 430-436, 2014
20. **Saito Y**, Yukawa A, Matozaki M, Mikami H, Yamagami T, **Kuga T**, Yamagishi N, Hatayama T, **Nakayama Y**.
Nmi interacts with Hsp105beta and enhances the Hsp105beta-mediated Hsp70 expression.
Experimental Cell Research, 327: 163-170, 2014

〔学会発表〕 (計 19 件)

1. 久家貴寿. FAM83H は新規のがん浸潤関連タンパク質である. 日本薬学会第 137 年会 (仙台) 2017 年 3 月 25~27 日
2. 久家貴寿. インタラクトーム解析を用いた疾患関連タンパク質 FAM83H の機能解明. 日本薬学会第 135 年会 (神戸) 2015 年 3 月 25~28 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久家 貴寿 (Kuga Takahisa)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号 : 20551857

(2) 研究分担者

中山 祐治 (Nakayama Yuji)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 10280918

齊藤 洋平 (Saito Youhei)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号 : 90422032

朝長 毅 (Tomonaga Takeshi)
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・創薬基盤研究部・医薬基盤研究所 プロテオームリサーチプロジェクト・プロジェクトリーダー
研究者番号 : 80227644

佐々木 光穂 (Sasaki Mitsuho)
国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・創薬基盤研究部・医薬基盤研究所 疾患モデル小動物研究室・プロジェクト研究員
研究者番号 : 20432536

- (3) 連携研究者 なし
- (4) 研究協力者 なし