

2023年10月30日

新潟大学

頭蓋底における組織非特異的アルカリホスファターゼの 新しいメカニズムを解明

－無機リン酸とピロリン酸による細胞シグナル伝達－

新潟大学医歯学総合病院 歯の診療科の大倉直人助教（研究当時：ミシガン大学歯学部小児矯正歯科 Nan Hatch 教授研究室・博士研究員）らの研究グループは、頭蓋神経堤細胞（注1）でのみ組織非特異的アルカリホスファターゼ（TNAP, 注2）が欠損するマウスを用いて、免疫組織学的解析の他に頭蓋底の器官培養を行い、無機リン酸塩とピロリン酸塩が蝶形骨間軟骨結合（ISS, 注3）における細胞シグナル伝達と表現系変化に特異的な影響を与えることを明らかにしました。成長板軟骨細胞における TNAP 発現は頭蓋底の正常な発達に不可欠であり、そのメカニズムはピロリン酸塩だけでなく Sox9, PTHrP や IHH（注4）といったタンパクへ関与している可能性が高いことを確認しました。本研究成果は、2023年10月20日、科学誌「International Journal of Molecular Sciences」のオンライン版に掲載されました。

【本研究成果のポイント】

- 頭蓋神経堤細胞でのみ組織非特異的アルカリホスファターゼ（TNAP）を欠損させたマウスでは、軟骨細胞の増殖、成熟およびアポトーシス（注5）に異常を示す。
- TNAP を欠損させたマウスでは、蝶形骨間軟骨結合（ISS）での Sox9, PTHrP や IHH のシグナル伝達にも影響を及ぼす。
- TNAP が頭蓋神経堤細胞の分化や幹細胞性に関与しており、神経堤細胞における TNAP の細胞自律的な役割を確認した。

1. 研究の背景

低ホスファターゼ症（注6）モデルマウスの1つである TNAP の global ノックアウトマウス（*Alpl*^{-/-}マウス）は、頭蓋骨癒合症や頭蓋骨の異常形状を発症します。さらに、この global ノックアウトマウスは、沿軸中胚葉由来の頭蓋骨よりも頭蓋神経堤細胞由来の頭蓋骨に大きな影響を与えます。出生時は正常な表現系であるものの、急速に健康状態が低下し、ほとんどが離乳前もしくは離乳直後に死亡してしまうため、本研究グループは、頭蓋神経堤発現 *P0-Cre* プロモーター発現マウスとフロックス化 *Alpl* マウスを交配させ、頭蓋神経堤細胞由来の組織でのみ発現している TNAP を特異的に欠損させることで死亡を回避させ、生後発達の初期および後期

における TNAP の影響を調査しました。

* *P0-Cre* プロモーター発現マウスとフロックス化 *Alpl* マウスを交配したマウスを *Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* と呼び、頭蓋神経堤細胞由来の組織でのみ TNAP の発現を特異的に欠損させる conditional knockout マウス（注 7）です。

II. 研究の概要・成果

作製した conditional knockout マウスである *Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* マウスについて調査しました。すべての TNAP が欠損してしまう global ノックアウトマウス (*Alpl^{-/-}* マウス) では出生後、すぐに死亡してしまいますが、*Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* マウスでは出生後 35 日目まで健康に生存していました。しかし、野生型との比較ではサイズと体重は減少しており、さらに中顔面の劣成長を含め異常な頭蓋骨形状が明らかになりました (図 1A)。さらに、nanoCT 画像撮影を行い、*Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* マウスにおける頭蓋底部の解析を行ったところ、頭蓋神経堤細胞由来の蝶形骨間軟骨結合で異常発達を引き起こすことが明らかになりました (図 1B)。

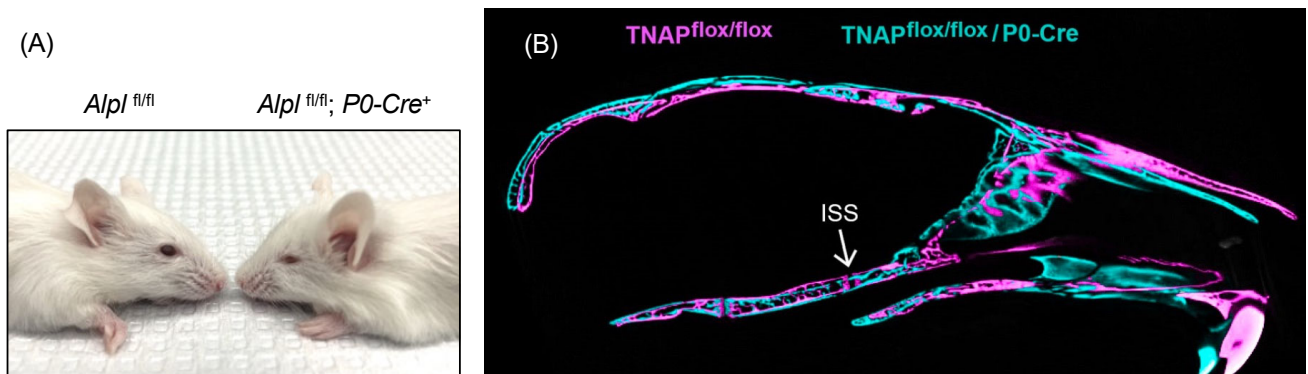


図 1. *Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* について

図 1 A. 表現系, B. NanoCT 解析。

Alpl^{fl/fl} がコントロール (野生型) で *Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* が conditional knockout マウス。

Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺ では、異常な頭蓋骨形状と、ISS での異常発達を認めた。

Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺ マウスにおける ISS で引き起こされる頭蓋底軟骨結合成長板での異常発達のメカニズムを解明するために細胞増殖の定量化を Ki67 の特異的抗体を用いた免疫組織学的解析を行いました。その結果、静止軟骨細胞層と増殖軟骨細胞層で増加していることが明らかになりました。さらに、軟骨細胞のアポトーシスについても調べたところ、減少していることが明らかになりました。肥大軟骨細胞のアポトーシスは無機リン酸によって刺激され、無機ピロリン酸によって抑制されることが知られているため、今回の結果は TNAP の欠損によって局所的に無機リン酸が産生されず、一方で無機ピロリン酸の割合が増加したためアポトーシスが刺激されず、さらに抑制方向に傾いたことが示唆されました。

相互作用的な PTHrP-IHH (PTHrP: Parathyroid hormone-related Peptide, IHH: Indian

hedgehog) シグナル伝達は、長骨成長板や頭蓋底結合成長板で様々な調節をすることが知られています。*Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* マウスで観察された成長異常の根底には、異常な PTHrP-IHH シグナル伝達があるのではないかと考えました。そこで、5 日齢マウスの ISS における PTHrP と IHH の免疫蛍光染色解析を行ったところ、前肥大軟骨細胞層と肥大軟骨細胞層で各陽性細胞の増殖が観察されました (図 2-A, B)。これらの結果は、TNAP の欠損が IHH の高発現を引き起こし、肥大軟骨細胞層での PTHrP の異所性発現と、PTHrP が正常に発現している静止軟骨細胞層における PTHrP 発現の増加を引き起こしていることを示唆しています。

さらに *P0-Cre* による *Alpl* 欠損 (TNAP 欠損) が軟骨細胞の成熟に影響するかどうかを調査するために、Sex determining region Y-box9 (*Sox9*) および collagen X の免疫蛍光染色を行ったところ、静止軟骨細胞層と前肥大軟骨細胞層で発現が高かったです (図 2-C, D)。Collagen X は軟骨細胞の分化マーカーとして使用しており、前述した Ki67 の免疫染色の結果と合わせて軟骨細胞における増殖の亢進に加えて早期の分化が起こっていることを示しています。*Sox9* は軟骨細胞のマスター転写制御因子ですので、頭蓋神経堤細胞における TNAP 欠損後の下流で見られる ISS 軟骨細胞の変化を仲介している可能性が考えられます。

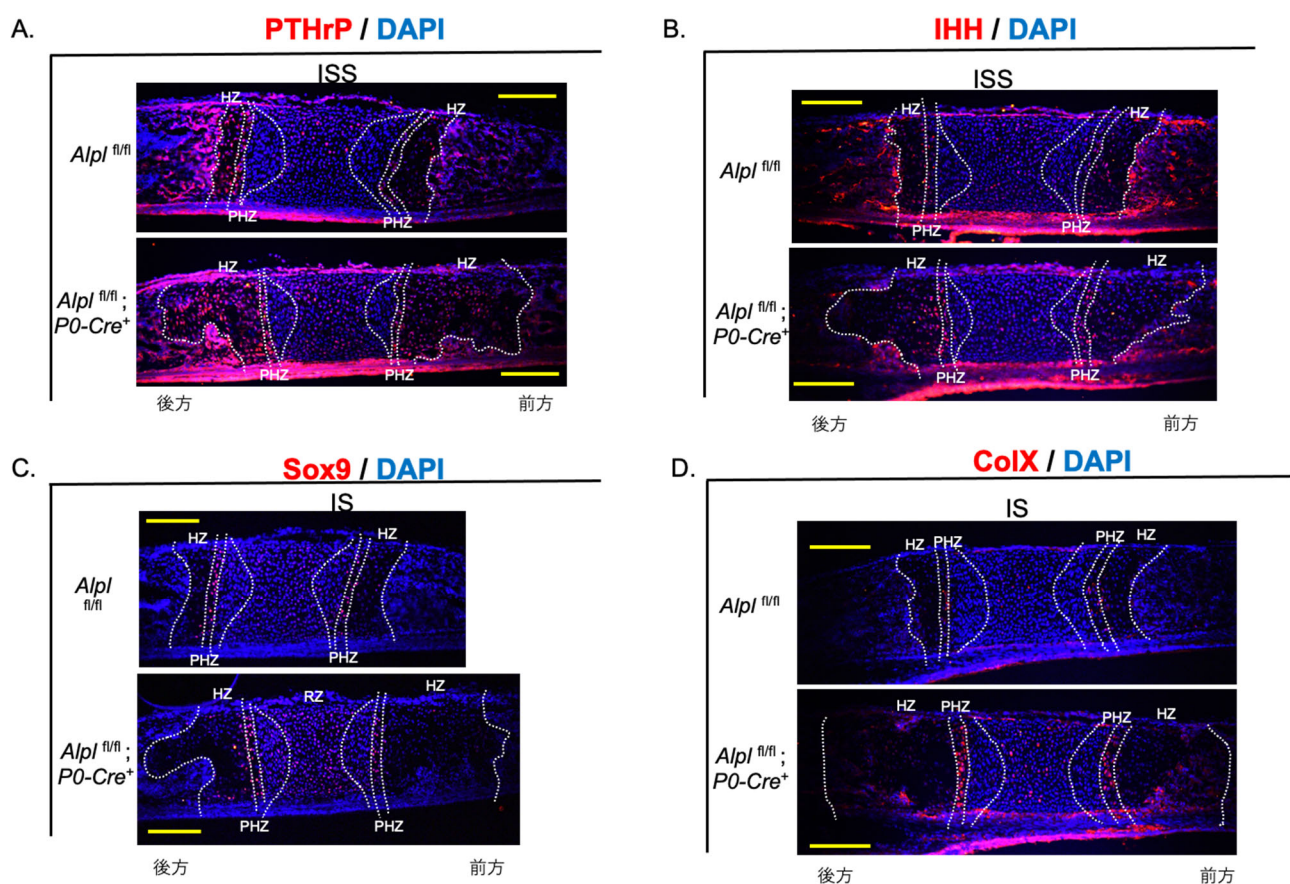


図 2. *Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* の頭蓋底に対する免疫蛍光染色の結果

図 1 A. PTHrP, B. IHH, C Sox9, D Collagen X (ColIX)。

Alpl^{fl/fl} がコントロール (野生型) と比較すると *Alpl^{fl/fl};P0-Cre⁺* マウスにおいて、PTHrP, IHH, Sox9 および ColIX の異所性発現や免疫陽性細胞の増加を認めた。

RZ: 静止軟骨細胞層, PHZ: 前肥大軟骨細胞層, HZ: 肥大軟骨細胞層, バーは 200 μ m。

*Alpl^{f/f};P0-Cre⁺*マウスの頭蓋底で観察された様々な現象は、無機ピロリン酸と無機リン酸が局所的に変化したためと考え、次に野生型マウスから単離した新生児の前頭蓋底を、無機ピロリン酸あるいは無機リン酸を添加/無添加の培地を用いて器官培養を行ない、その後、免疫蛍光染色法で観察しました。その結果、ISSにおいて無機リン酸添加群ではIHHが有意に増加しましたが、無機ピロリン酸添加群ではPTHrPが有意に増加しました（**図 3A, B**）。軟骨細胞の分化マーカーであるSox9とcollagen Xでは、無機リン酸添加によって有意に増加しました（**図 3C, D**）。以上の結果から、無機ピロリン酸と無機リン酸の割合が、頭蓋底の発達時におけるシグナル伝達を正常に起動させるために重要であることを意味しています。

III. 今後の展開

TNAPの欠損が頭蓋底の成長に大きく関わるということが今回の研究から示唆されました。しかし、その詳細なシグナル伝達経路は不明なままです。TNAPは主に、ピロリン酸とピリドキサーリン酸が化学的な基質として認められておりますが、まだ数は少ないですが上記2つ以外にも病理生理学的な基質も確認されつつあります。今回のTNAP欠損も、こうした病理生理学的基質の機能が抑制された結果であるかもしれませんので、今後、調査を行っていく予定です。

また、TNAPの欠損は頭蓋底だけでなく歯根（歯の根）の成長にも大きく関与していることがわかっています。こちらはその詳細は不明ですので、このマウスを用いて詳しく調査していく予定です。

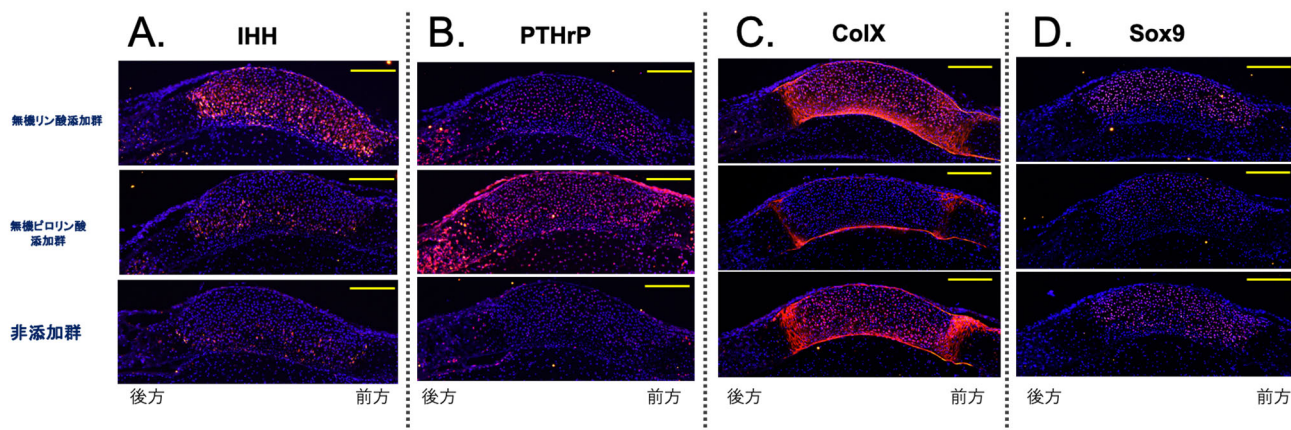


図 3. 頭蓋底の器官培養

図 1 A. IHH, B. PTHrP, C Collagen X (ColX), D Sox9.

無機リン酸と無機ピロリン酸の割合を変化させることで、PTHrP, IHH, Sox9 および ColX の異所性発現や免疫陽性細胞の増加を認めた。バーは 200 μ m。

IV. 研究成果の公表

これらの研究成果は、2023年10月20日、科学誌「International Journal of Molecular Sciences」のオンライン版に掲載されました。

論文タイトル： Cranial Neural Crest Specific Deletion of *A/p/* (TNAP) via P0-Cre Causes Abnormal Chondrocyte Maturation and Deficient Cranial Base Growth

著者： Naoto Ohkura^{1,2)}, Hwa Kyung Nam¹⁾, Fei Liu³⁾, Nan Hatch¹⁾

doi: 10.3390/ijms242015401

1) Department of Orthodontics and Pediatric Dentistry, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA.

2) Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata Japan.

3) Department of Biomaterials Sciences and Prosthodontics, School of Dentistry, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA.

V. 謝辞

本研究は、National Institutes of Health (NIH) の研究プロジェクト R1 DE025827 の支援を受けて行われました。

【用語解説】

(注 1) 頭蓋神経堤細胞・・・頭蓋の大部分を構成し、成長に伴い最終的に歯、軟骨、頭蓋顔面骨および結合組織を形成する。

(注 2) 組織非特異的アルカリホスファターゼ (Tissue non-specific alkaline phosphatase: TNAP)・・・無機ピロリン酸を加水分解して無機リン酸に変換する酵素。TNAP の活性は骨の無機化を促進。

* 無機ピロリン酸・・・マトリックスの無機化を阻害。無機リン酸・・・ハイドロキシアパタイト形成の基質。

(注 3) 蝶形骨間軟骨結合 (ISS)・・・頭蓋底の成長部位の 1 つで、出生時に成長が終わる。ISS は、蝶形骨と後頭骨底部をつなぐ軟骨結合。図 4 を参照。

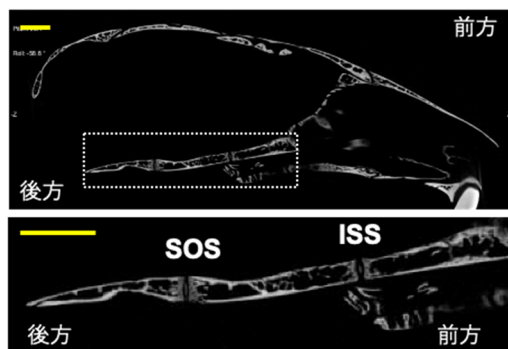


図 4. マウスの頭蓋に対する nanoCT 解析

ISS: 蝶形骨間軟骨結合, SOS: 蝶形後頭軟骨結合
バーは 200 μ m。

(注 4) Sox9, PTHrP, IHH・・・軟骨形成時に関与する転写因子,あるいは間葉系幹細胞から分泌される因子。

(注 5) アポトーシス・・・個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされるプログラムされた細胞死のこと。

(注 6) 低ホスファターゼ症・・・TNAP をコードする遺伝子 (*Alp*) の不活性化変異によって引き起こされるまれな遺伝性疾患。

(注 7) Conditional knockout マウス・・・標的となる遺伝子の働きを,任意の時期と場所で機能を欠損させたマウス。

本件に関するお問い合わせ先

新潟大学大学院医歯学総合研究科 (歯学部)

新潟大学医歯学総合病院 歯の診療科

助教 大倉 直人 (おおくら なおと)

教授 野杵 由一郎 (のいり ゆういちろう)

E-mail : ohkura@dent.niigata-u.ac.jp