The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	頭蓋顎顔面の形態形成における硫酸代謝の役割
Author(s)	吉田, 侑加
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87978
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学位論文

頭蓋顎顔面の形態形成における
硫酸代謝の役割

歯学研究科　口腔科学専攻

顎顔面口腔矯正学教室

吉田　侑加

緒言

頭蓋顎顔面の形成異常や歯の発生異常を伴う先天異常症は、様々な遺伝的要因、環境的要因によって引き起こされると考えられている。環境的要因としては、胎児の感染、母親の病気、栄養不足、薬物摂取、化学物質への暴露、大気汚染、放射線などが挙げられるが、先天性異常症の病因はまだ一部しか明らかになっていない。[1]

身体を構成する細胞は、細胞外液と細胞内液で満たされており、さまざまな電解質と非電解質が溶けている。これらの電解質は浸透圧の維持、酸塩基平衡や酵素の機能維持など、さまざまな生命活動を担っている。そしてその電解質の一つに、硫酸イオン（SO_4^{2-}）があり、硫酸イオンは、多糖鎖、ステロイドホルモン、チロシンの硫酸化修飾を介して組織の発生や形態形成に重要な働きをしていることが報告されている。[2-4] 硫酸イオンは細胞膜を通過することができないため、哺乳類では硫酸イオンを細胞内へ取り込むための輸送機構が必要となる。哺乳類では、陰イオントランスポーターとして、SLC26 ファミリーが知られており、基質特異性と組織分布の異なる 11 の遺伝子（SLC26A1-A11）から構成されている。SLC26 ファミリーメンバーは、HCO3-、Cl-、SO_4^{2-}などの幅広い陰イオン基質を輸送する。[5]

SLC26A1-A11 のうち SLC26A1、SLC26A2 は、硫酸/塩化物交換体である SAT1、DTDST というタンパク質をコードしており、細胞膜上で硫酸イオントランスポーターとして機能し、硫酸イオンの細胞内への取り込みを可能にする。[5,6] 硫酸イオンは細胞内へ取り込まれた後、細胞質または核において、ATP sulfurylase と adenosine 5'-phosphosulfate kinase (APS kinase)の二つの酵素反応によって、ATP と硫酸イオンから 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate（以下 PAPS）が合成される。PAPS はゴルジ体へ輸送された後、硫酸転移酵素によって PAPS からグリコサミノグリカン、チロシンへ硫酸基が転移する。[7] 細胞質で

は細胞質硫酸転移酵素によって PAPS からステロイドホルモンへ硫酸基が転移する。[8] 一方、硫酸イオン供給の一部は硫黄を含むアミノ酸であるシステインとメチオニンの分解によって得られることが知られている。[9]

ヒトでは、SLC26A2 遺伝子の変異やノックアウトにより、さまざまな軟骨異形成症が生じる。SLC26A2 遺伝子関連疾患として achondrogenesis type IB、atelosteogenesis type Ⅱ、diastrophic dysplasia、ecessive multiple epiphyseal dysplasia の 4 つが報告されている。前者 2 つは、致死性骨軟骨異形成症、後者 2 つは非致死性骨軟骨異形成症に分類される。[10,11] 表現型は SLC26A2 遺伝子変異の種類によって異なるが、主な臨床的特徴としては、低身長、関節拘縮、内反足、四肢の短縮などが挙げられる。主な顎顔面領域の異常としては、大きな上顔面高、小顎症、高口蓋、口蓋裂（25-60%）、歯の先天欠如（30%）、矮小歯などがあげられる。[12-14] これまでに、遺伝子改変マウスを用いて SLC26A2 関連軟骨異形成症の病態を解析する試みがされてきた。Forlino A らは、*Slc26a2* のエクソン 3 に C1184T 転移を導入し、DTDST の第 8 膜貫通ドメインに A386V の置換を持つトランスジェニックマウス[YY1][YY2][YY3]を作製し、低身長、関節拘縮、軟骨のトルイジンブルー染色の減少、軟骨細胞のサイズの不揃い、などの表現型を報告した。[15] さらに Liu Yang らは、エクソン 3 および 4 を欠失させた *Slc26a2* ノックアウトマウス（以下 *Slc26a2*-KO）が、著しい四肢の短小化、短い肋骨、多発性の脊椎骨などの表現型を示すことを報告し、そのメカニズムとして軟骨細胞の増殖が阻害され、アポトーシスが促進されるため、成長板の形態異常が引き起こされることを明らかにしている。[16]SLC26A2 関連軟骨異形成症の患者は、矮小歯、歯の先天欠如をはじめとする頭蓋顎顔面領域の異常を示すことが知られているにも関わらず、*Slc26a2*-KO の歯の異常に関する報告はいまだなく、メカニズムの解明には至っていない。[17]

歯胚の発生はヒトでは胎生 6 週、マウスでは胎生 10 日から認められ、頭部神経堤由来の外胚葉性間葉細胞の誘導により口腔粘膜上皮が肥厚し歯原性上皮細胞へと変化することから始まる。上皮間葉の相互作用によって歯は形成され、蕾状期、帽状期、鐘状期を経て成長する。[18] 象牙芽細胞は頭部神経堤由来の間葉細胞である歯乳頭細胞から分化する。歯乳頭細胞は内エナメル上皮細胞と基底膜で隔たれ、内エナメル上皮から分泌される線維芽細胞増殖因子（FGF）などの成長因子が、基底膜を介して歯乳頭細胞から象牙芽細胞への分化を誘導すると考えられている。[19,20] 歯胚の発生の過程において、硫酸イオンの細胞内への取り込みの阻害が歯の異常を引き起こすメカニズムの詳細は不明である。

本研究では、*Slc26a2*-KO を用いて、特に歯胚の象牙芽細胞分化における *Slc26a2* トランスポーターを介した硫酸イオン代謝の生物学的意義を検索することを目的とした。

実験方法

① 実験動物

実験動物として、CRISPR/CAS9 遺伝子編集法により、*Slc26a2* 遺伝子のノックアウトマウス（以下 *Slc26a2*-KO）を作製した。エレクトロポレーションによって guideRNA と cas9 タンパクを受精卵に共導入することで *Slc26a2* 遺伝子の Exon2 から Exon4 までを切断し、遺伝子をノックアウトした後、偽妊娠マウスへの胚移植を行った。E18.5 でマウスを母体から取り出し、観察を行った。

guideRNA は以下に示す。

guideRNA Left: AGTCTGAGACCGGTCATGGC

guideRNA Right: ACAATGAGCTCGACCGGAAT

対照群として、妊娠した ICR 系統野生型雌性マウス(日本チャールス・リバー株式会社、神奈川)の胎仔を使用した。観察は E18.5 にて母体より胎仔を取り出して行った。また，本実験では，実験動物は、固形飼料と紫外線照射滅菌水は自由摂取とした。動物施設の環境条件としては，温度と湿度を一定に維持し，明暗 12 時間（明時間帯として 8 : 00–20 : 00）のサイクル下で飼育した。本研究は，大阪大学動物実験委員会および大阪大学遺伝子組み換え実験委員会の承認を得て行った（動物実験承認番号 : 動歯-29-033-0，遺伝子組み換え実験承認番号：3745）。

② 定量 PCR による遺伝子発現の絶対定量

妊娠した C57BL/6J 系統野生型雌性マウス (日本エスエルシー株式会社、静岡) の胎仔の上下顎骨を摘出し、トライゾール (Thermo Fisher Scientific 社) にて溶解後、クロロホルム (ナカライテスク社) を添加した。4℃, 13200rpm で 20 分遠心分離を行い、得られた上清みに 2-プロパノール (ナカライテスク社) を

添加して混濁した。再度遠心分離を行い、2-プロパノールを捨てて 70%エタノールを添加し、遠心分離を行った。70%エタノールを乾燥して全 RNA を精製した。精製された全 RNA は Kit (TaKaRa RNA PCR Kit, タカラバイオ株式会社、滋賀) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。mRNA の定量は得られた cDNA を鋳型として、SYBR Green PCR protocol に従い、ライトサイクラー (Roche 社) を用いて行った。使用した SYBR GREEN のプライマーは以下に示す。

Rn 18s　F　5’ - GCAATTATTCCCCATGAACG - 3’
Rn 18s　R　5’ - GGCCTCACTAAACCATCCAA - 3’
Slc26a2　F　5’ - AAGAGCAGCATGACCTCTCAC - 3’
Slc26a2　R　5’ - CTGCCTCAAGTCAGTGCCT- 3’

③　*in situ* hybridization 法

DIG 標識 RNA プローブは、cDNA クローンを鋳型として、メーカーのプロトコルに従って DIG RNA ラベリングキット（Roche 社、Basel, Switzerland）を用いて事前に作成した。プローブは、T7 および SP6 アダプタープライマーを用いて PCR により増幅した。ハイブリダイゼーション後、各 mRNA の発現パターンを、抗 DIG-AP Fabfragments（Roche 社）にて検出し可視化して観察した。

④　透明骨格標本

新生児を出生直後に採取し、摘出後、95％エタノールで一晩室温にて固定した。その後，試料をアセトンに入れて室温で一晩置き，0.03%(w/v)アルシアンブルー，80%エタノール，20%酢酸を含む軟骨染色液に一晩浸した。最初の洗浄は 70％エタノールを数回交換して行った。軟骨の形態を見やすくするため、軟骨が完全に脱色される前に洗浄を終了した。骨化した組織は、1%(w/v)KOH に 0.005%(w/v)のアリザリンレッドを含むアリザリンレッド溶液により、室温で 4 時間染色し、順次、4℃で一晩置いて染色を遅らせた。サンプルを 1%(w/v)KOH を含む 50%グリセロール溶液に入れ、過剰な染色を除去した。

⑤　マイクロ CT を用いた臼歯，切歯と頭蓋の三次元的解析

臼歯，切歯と頭蓋の三次元的形態観察をする目的で，E18.5 の対照群と実験群の上下顎にリンタングステン酸を造影剤として用いてマイクロ CT 撮影を行った。マイクロ CT 装置(R_mCT2，Rigaku，Tokyo, Japan）を用いて撮影した。撮影条件は，管電圧 : 90 kV，管電流 : 160 μA，スライス厚さ : 10 μm, pixel size : 20.0 μm×20.0 μm とし，その後断層画像の再構成を行った。三次元構築は，VG Studio（ボリュームグラフィックス）にて行った。

⑥　ヘマトキシリンエオジン染色

E18.5 の対照群、実験群の上下顎を摘出し，4%パラホルムアルデヒド固定液を用いて 4℃で一晩固定した。固定後に 10%, 20%, 30%スクロース/0.1M PBS(pH7.4)の順に 4°C で 4 時間以上浸漬し，凍結包埋は Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek, CA, USA)を用いて行った。連続凍結切片は，クリオスタット (CM1950, Leica, Germany)を用いて，10 μm の厚さで作製した。薄切方向は，矢状断とした。凍結切片は，Hematoxylin and Eosin (HE)染色処理を行った。HE 染色切片は，光学顕微鏡の BX51TF (OLYMPUS, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

⑦　レーザーマイクロダイセクション

E18.5 の実験群と対照群の上下顎を摘出し、Tissue-Tek Oct compound を用いて凍結包埋を行い、実験に使用するまで-80℃暗所にて保管した。クリオスタットを用いて 25 μm の連続切片を前頭断にて作成した。上下顎臼歯歯胚の約 60 枚の切片を作成し、切片はメンブレンスライド (Leica 社)にマウントした。Hematoxylin and Eosin (HE)染色処理を行った後、上下顎臼歯歯胚の象牙芽細胞をレーザーマイクロダイセ

クション (LMD6500, Leica 社)を用いて切り出し、チューブに回収した。

⑧　歯胚の腎移植

対照群と *Slc26a2*-KO の E18.5 の上顎臼歯歯胚を 8 週齢の BALB/cSlc-nu/nu マウスの腎被膜下に移植した。4 週間後に移植した歯胚を摘出し、マイクロ CT を撮影した。VG Studio にて 50μm ごとの矢状断スライス画像を撮影し、画像処理ソフトウェア ImageJ にて歯根を切断し、歯冠部象牙質の体積を測定した。

⑨　hDPSC（ヒト歯髄幹細胞）を用いた *Slc26a2* ノックダウン株の作製

ヒト歯髄幹細胞にレンチウイルス（Mission shRNA ベクター Sigma）をトランスフェクションし、1 日培養後、ピューロマイシン処理を行った。対照群には、PLVshRNA/EGFPpurou6>scrs、実験群には TRCN8607 を用いた。骨分化培地（αMEM 10%FBS,デキサメタゾン,β グリセロリン酸,L アスコルビン 2 リン酸）にて 2 週間培養したのち、細胞を回収し、定量 PCR を行った。

⑩　硫酸化プロテオグリカンの総量の定量

硫酸化糖鎖に特異的に結合する Blyscan Dye(1,9-dimethyl-methylene blue)を用いて，上下顎臼歯歯胚の可溶性硫酸化プロテオグリカン総量を比色法にて定量した。定量には Blyscan Glycosaminoglycan Assay Kit（BIOColor）を用いて行った。

⑪　統計処理

平均値および標準誤差をグラフに示した。 スチューデントの *t* 検定を用いて 2 つの群の有意差を検討した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

研究結果

1,　頭蓋顎顔面の発生期における *Slc26a1*、*Slc26a2* トランスポーター遺伝子の発現パターンの解析

頭蓋顎顔面の形成や歯胚の形成が起こる E9.5、E10.5、E12.0、E13.0 の各発生段階でのマウス胎仔の上下顎骨を摘出し、全 RNA を精製した。上下顎骨の全 RNA を cDNA 化し、定量 PCR を行い、*Slc26a1* と *Slc26a2* の遺伝子発現の絶対定量を行った。各発生段階において、*Slc26a1* と比較して、*Slc26a2* の発現量が優位に高いことが明らかとなった。さらに、*Slc26a2* は発生段階の進行に伴い、発現量が増加することが明らかとなった（図 1-A）。またこれらの結果から、頭蓋顎顔面の形成や歯胚の形成が起こる発生段階で、細胞内への硫酸イオンの取り込みに *Slc26a2* トランスポーターが中心的な役割を担っていることが示唆された。

2,　頭蓋顎顔面領域における *Slc26a2* 遺伝子発現部位の解析

実験 1 より顎顔面領域における細胞内への硫酸イオンの取り込みに *Slc26a2* トランスポーターが中心的な役割を担っていることが示唆されたことから、*Slc26a2* 遺伝子の顎顔面領域における発現部位を解析することとした。E18.5 のマウス胎仔の上下顎骨を摘出し、通法に従い、パラフィン切片を作製し、*in situ* hybridization 法を行った。その結果、顎顔面領域において、*Slc26a2* 遺伝子は軟骨細胞、上下顎歯胚の象牙芽細胞、エナメル芽細胞に高発現していることが明らかとなった（図 1-B-E）。

3,　*Slc26a2*-KO の作製と形態学的解析

硫酸代謝異常がどのように頭蓋顎顔面の形態形成異常を引き起こすかを明らかにするため、CRISPR/CAS9 遺伝子編集法により、*Slc26a2* 遺伝子のノックアウトマウス（以下 *Slc26a2*-KO とする）を作製した。*Slc26a2*-KO は E18.5 で母体から取り出すと、すべて、生後間もなく呼吸運動を示すことなく死亡した。*Slc26a2*-KO は対照群と比較し、四肢の短小化、上顎骨の前後方向の低形成を認めた（図 2-A-D）。形態学的解析を行うため、マイクロ CT の撮影、透明骨格標本の作製を行った。マイクロ CT の解析から、長管骨は長径が短いことが分かった（図 2-E-F）。透明骨格標本から、*Slc26a2*-KO は対照群と比較し、鼻中隔軟骨、肋軟骨のアルシアンブルーの染色性の低下が認められた（図 2-G-N）。これらの結果から、*Slc26a2* 遺伝子ノックアウトにより、軟骨形成や内軟骨内骨化において表現型が現れることが明らかとなった。

4, *Slc26a2*-KO 歯胚の形態学的、組織学的解析

実験 2 より、*Slc26a2* 遺伝子が象牙芽細胞、エナメル芽細胞に高発現していることから、E18.5 の対照群と *Slc26a2*-KO の歯胚の形態学的、組織学的解析を行った。リンタングステン酸を造影剤として用いて μCT を撮影し解析を行った。対照群と比較して *Slc26a2*-KO の歯胚の形態学的所見として、上顎切歯歯胚のサービカルループから切縁までの長径が短いこと、上顎臼歯歯胚の歯冠近遠心幅径が短いことが分かった（図 3-A-J）。組織学的所見として、上顎骨の前頭断、矢状断の切片を作製し、観察したところ、上顎切歯歯胚、臼歯歯胚の象牙芽細胞が扁平化し、核の極性が見られないことが明らかとなった。

エナメル芽細胞の表現型には差は見られなかった（図 4-A-H）。下顎切歯歯胚、臼歯歯胚においては象

牙芽細胞の丈は短いものの、核の極性を認め、上顎歯胚ほど著明な差は認めなかった（図 5-A-D）。これらの結果から *slc26a2* トランスポーターを介した硫酸イオンの取り込みが特に上顎歯胚の象牙芽細胞の分化に関与していることが明らかとなった。

5, *Slc26a2*-KO 上顎臼歯歯胚の象牙芽細胞分化の解析

実験 4 より *Slc26a2*-KO の象牙芽細胞形態異常が明らかとなったことから、*Slc26a2*-KO の象牙芽細胞の分化に異常がないか確認するため、E18.5 の対照群と *Slc26a2*-KO の上顎歯胚象牙芽細胞をレーザーマイクロダイセクションにて回収した。回収した象牙芽細胞から RNA 抽出を行い、cDNA 化した後に定量 PCR を行い、象牙質シアロリンタンパク質（DSPP），象牙質マトリックスタンパク質 1（DMP1）の発現量を比較した。象牙質の非コラーゲン性の有機質である DSPP、DMP1 は、どちらも象牙芽細胞によって分泌され、象牙質の形成や石灰化と関わる象牙芽細胞分化マーカーである。[MOU4][21]*Slc26a2*-KO の上顎臼歯歯胚の象牙芽細胞では、対照群と比較して、*Dspp*、*Dmp1* の発現が有意に低下していた（図 6-A）。これらの結果から *Slc26a2*-KO の上顎歯胚の象牙芽細胞の分化異常が明らかとなった。

６， ヒト歯髄幹細胞の *Slc26a2* ノックダウン株の分化能の解析

歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化に対する *Slc26a2* 欠失の影響を明らかにするため、ヒト歯髄幹細胞（hDPSC）を用いて、*Slc26a2* ノックダウン株の分化能の解析を行った。レンチウイルスを用いて *Slc26a2* ノックダウンを行い、骨分化培地にて２週間培養した。その結果、*Slc26a2* ノックダウン株は対照群と比

較して、象牙芽細胞分化マーカーである *Dspp*、*Dmp1* の発現量が有意に減少していた（図 6-B-C）。

７， 腎皮膜下に移植し発生した *Slc26a2*-KO の上顎臼歯の象牙質の解析

S*lc26a2*-KO はすべて生後間もなく死亡するため、歯胚発生の長期的な観察ができない。そこで、我々は、歯胚発生後の象牙質形成を観察するため、歯胚の器官培養を行うこととした。対照群と *Slc26a2*-KO の E18.5 の上顎歯胚をヌードマウス腎被膜下に移植した。4 週間後に移植した歯胚を取り出し、マイクロ CT にて解析した結果、*Slc26a2*-KO の上顎臼歯における象牙質の体積は有意に低下していることが明らかになった（図 6-D-E）。これらの結果から、*Slc26a2* トランスポーター欠損によって、象牙質の低形成が引き起こされることが明らかとなった。

８， 象牙芽細胞における *Slc26* トランスポーター遺伝子発現パターンの解析

Slc26a2-KO の上顎歯胚の表現型が下顎歯胚より顕著であることから、対照群と *Slc26a2*-KO の上下顎臼歯歯胚の硫酸化プロテオグリカン総量を比色法にて定量を行った。結果、対照群の上顎臼歯歯胚と比較して、*Slc26a2*-KO の上顎臼歯歯胚では硫酸化プロテオグリカン総量が低下していることが明らかとなった。一方で、対照群の下顎臼歯歯胚と比較して、*Slc26a2*-KO の下顎臼歯歯胚では硫酸化プロテオグリカン総量に有意な差は認めなかった（図 7-A）。この理由を、*Slc26a1* と *Slc26a2* の Genetic redundancy によるものと仮説を立て、E18.5 のマウス胎仔の上下顎臼歯歯胚の象牙芽細胞をレーザーマイクロダイセクションにて回収し、RNA 抽出を行い、cDNA 化した後に定量 PCR を行った。*Slc26a1* と *Slc26a2* の遺伝子

発現の絶対定量を行った結果、下顎歯胚の象牙芽細胞と比較して、上顎歯胚の象牙芽細胞において *Slc26a1* の発現が低いことが明らかとなった（図 7-B）。上下顎臼歯歯胚で *Slc26a2* の発現量に差は認められなかった。下顎歯胚では *Slc26a1* が *Slc26a2* の機能を代償している可能性が示唆された（図 7-C）。これらの結果から *Slc26a2* トランスポーターによる硫酸イオンの象牙芽細胞内への取り込みが特に上顎臼歯歯胚の象牙芽細胞分化に必須であることが示された。

考察

1, CRISPR/CAS9 遺伝子編集法を用いて作製した *Slc26a2*-KO の有用性

我々は、CRISPR/CAS9 遺伝子編集法を用いて、標的遺伝子上に 2 種類の guide RNA を設定し，標的のゲノム領域を欠失させる方法により， *Slc26a2*-KO を作製し、解析を行った。CRISPR/CAS9 遺伝子編集法の遺伝子配列特異性に関する初期の研究では、CRISPR/CAS9 遺伝子編集法によるオフターゲット効果が高いことが報告されており、本技術をノックアウトマウスの作製に利用できるか懐疑的であることが報告されていた。[22] そのためオフターゲット効果に注意が払われ技術改良が進んだ結果、近年の研究では、オフターゲット効果が著しく改善され、CRISPR/CAS9 遺伝子編集法の特異性が高いことがわかってきた。[23] さらに我々は、guideRNA 配列の遺伝子配列特異性や切断効率を予測するソフトウェアを利用することで、オフターゲット効果を少なくするよう guideRNA の設計に留意した。[24] 以上のことから、CRISPR/CAS9 遺伝子編集法は ES 細胞を用いた従来法と比較してデザインや作業工程が簡便であり、高い遺伝子配列特異性をもち、正確な遺伝子変異を導入することができるため、その有用性は高いと考えられる。

我々が作製した *Slc26a2*-KO は、すべて生後間もなく呼吸運動を示すことなく死亡した。*Slc26a2*-KO は四肢の短小化、長管骨の長径は小さく、短径が大きくなること、軟骨低形成、歯胚の短小化といったヒトの臨床症状を再現していた。さらに、*Slc26a2*-KO は、個体間での表現型の差異はほぼ認めず、四肢の短小化、軟骨低形成といった表現型を示し、それらは過去の報告と一致していた。これらのことから、CRISPR/CAS9 遺伝子編集法によって作製された *Slc26a2*-KO は、*Slc26a2* 欠失が頭蓋顎顔面発生に与える

影響を解明するための適切なモデルであると考えられる。

2, 頭蓋顎顔面領域における *Slc26a2* トランスポーターの重要性

SLC26A1、SLC26A2 は、それぞれ SAT1、DTDST というタンパク質をコードしており、これらは細胞膜上で主要な硫酸イオントランスポーターとして機能している。まず、我々は、頭蓋顎顔面領域の発生において、細胞内への硫酸イオンの取り込みに中心的な役割を果たしている *Slc26* ファミリーを検討した。その方法として、E9.5 以降のマウス頭蓋顎顔面領域における *Slc26a1* と *Slc26a2* の遺伝子発現量を調べた。その結果、*Slc26a1* と比較して *Slc26a2* の発現量が有意に高く、かつ発生段階の進行に伴い、発現量が増加することが明らかとなった。過去の報告でも、SLC26A1 の発現は、組織分布が限られていることが示されている。さらに、ヒトの SLC26A1 遺伝子関連疾患は、現在のところ、報告されていない。さらに *Slc26a1*、*Slc26a3*、*Slc26a4*、*Slc26a6*、*Slc26a7* のノックアウトマウスの頭蓋顎顔面領域における異常や、特に歯に関する異常の報告はない。[25,26] 一方で、SLC26A2 はユビキタスに発現し、ヒトでは SLC26A2 関連軟骨異形成症が知られており、*Slc26a2* のノックアウトマウスは頭蓋顎顔面領域において上顎骨の前後方向の低形成、上顎歯胚の短小化といった表現型を示した。[16] *Slc26a1* と *Slc26a7* のダブルノックアウトマウスで、野生型と比較して、下顎切歯のエナメル質密度が、成熟期、分泌期において有意に低かったという報告はあるが、*Slc26a2* のノックアウトマウスのような明確な表現型は見られない。[27] これらのことから、頭蓋顎顔面の形成や歯胚の形成において、細胞内への SO_4^{2-} の取り込みに *Slc26a2* が中心的な役割を果たしていることが明らかとなった。

3, *Slc26a2* 欠失が象牙芽細胞分化に与える影響

本研究で、*Slc26a2*-KO の上顎歯胚の象牙芽細胞の扁平化や核の極性が見られないことを明らかにしたことから、我々は *Slc26a2* の欠失が象牙芽細胞の分化に異常を引き起こすと考えた。

Slc26a2-KO の上顎臼歯象牙芽細胞の分化度を調べるため、象牙質シアロリンタンパク質（dentin sialophos-phoprotein DSPP）と象牙質マトリックスタンパク質 1 （dentin matrix protein1 DMP1）の発現量を調べたところ、発現量は有意に低下していた。また、本研究では、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化に対する *Slc26a2* 欠失の影響を詳細に調べるため、ヒト歯髄幹細胞の *Slc26a2* ノックダウン株を作製し、分化能の解析を行った。その結果、対照群と比べて *Slc26a2* ノックダウン群では *dmp1,dspp* の発現量の減少を確認した。象牙質の非コラーゲン性の有機質である DSPP、DMP 1 は、象牙芽細胞によって分泌され、象牙質の形成や石灰化と関わる象牙芽細胞分化マーカーである。[MOU5][28] ヒト歯髄幹細胞を用いた培養系の実験を行うことで、*in vivo* では除外できなかったエナメル上皮や基底膜からの二次的な影響を除外することが可能である。これにより、硫酸イオンの象牙芽細胞内への取り込みの阻害が、直接、歯髄幹細胞から象牙芽細胞への分化に影響を与えることが明らかになった。

Slc26a2-KO はすべて生後間もなく死亡するため、歯の発生の長期的な観察ができない。我々は、歯胚発生後の、象牙質形成を観察するため、歯胚の器官培養を行う事とした。過去の報告から、歯の器官培養には歯胚培養法や歯胚移植法が選択されることが多いが、歯は形成が進むと歯髄の周囲に象牙質やエナメル質を形成する。そのため、歯胚培養法では歯髄壊死をおこし，歯胚発生の長期間の観察が難しいことが知られている。[29] そのため、我々は、歯胚移植法を選択し、腎被膜下に移植し発生した *Slc26a2*-KO の上顎臼歯の象牙質の体積が減少し、歯根が短小化することを示した。過去の報告で、*Dspp* ノックアウトマ

ウスは、III 型象牙質形成不全症患者の歯と同様に、歯胚は低石灰化し、象牙質が薄くなり、大きな歯髄腔を有することが報告されており、今回の表現形と一致する。[MOU6][30] これらのことから、*Slc26a2* トランスポーター欠損によって、象牙質の低形成が引き起こされることが明らかとなった。しかし、腎被膜下移植実験では、移植歯胚によって、発生する歯冠の形態にばらつきがあり、歯冠形態の観察には適切でなかったため、*slc26a2* の欠失が歯の形態にどのような影響を与えるかについてはさらなる検討が必要である。

一方で *Slc26a2*-KO の上下歯胚のエナメル芽細胞に異常は示さなかった。エナメル芽細胞には *Slc26a1*、*Slc26a2* をはじめとする *Slc26* ファミリーメンバーの遺伝子発現が確認されている。*Slc26a1* ノックアウトマウスにおいては、その他の *Slc26* ファミリーメンバーの genetic redundancy によってエナメル芽細胞に異常を示さないと考えられている。[25] これらのことから、エナメル芽細胞においては、 *Slc26a2* 遺伝子が欠失した場合に、他の *SLC26* ファミリーメンバーによって機能が代償されている可能性が示唆される。

４， *Slc26a2* 欠失が象牙芽細胞分化異常を引き起こすメカニズム

硫酸化プロテオグリカンは高度に糖鎖修飾されたタンパク質で、グリコサミノグリカン鎖が共有結合により、コアプロテインに結合している。硫酸化プロテオグリカンは発生過程にある細胞膜の表面や細胞外マトリックスにおいて，FGF，BMP，TGFβ，WNT といった成長因子の移動や、受容を制御していることが知られており、象牙芽細胞、エナメル芽細胞の分化と基質形成に関わっている。[31,32]FGF は多能性タンパク質であり、主に細胞分裂促進作用があり、歯の発生において必須の成長因子である [33]。硫酸化プロテオグリカンであるヘパラン硫酸（HS）と FGF リガンドとの親和性は、*O*-6-硫酸化など HS の微

細構造により調整されうることが示唆されている。[34] これは、ヘパラン硫酸の硫酸化が FGF シグナル伝達に必須であることを示唆している。また、Hayano らは、Sulf1、Sulf2 による細胞表面のヘパラン硫酸の脱硫酸化によって、Wnt のシグナル伝達経路が活性化されることを報告している。[35] 硫酸化プロテオグリカンの硫酸化と脱硫酸化の適切なバランスによって象牙芽細胞分化が促進されると考えられる。本研究では、E18.5 の *Slc26a2*-KO の上顎臼歯歯胚は野生型と比較して、細胞外マトリクスおよび、細胞膜表面に存在する硫酸化プロテオグリカン総量が有意に低下していることを示した。SO_4^{2-}は細胞内へ供給された後、細胞質または核において、ATP sulfurylase と adenosine 5'-phosphosulfate kinase (APS kinase)の二つの酵素反応によって、ATP と SO_4^{2-}から PAPS が合成される。PAPS はゴルジ体へ輸送された後、硫酸転移酵素によって PAPS からグリコサミノグリカンへ硫酸基が転移する。[8] 過去の報告で、*Slc26a2* トランスポーター欠失による細胞内への硫酸イオンの取り込み阻害に関して[MOU7]、 *Slc26a2* 硫酸トランスポーターの機能を部分的に欠損させた Dtdst ノックインマウスの軟骨細胞、骨芽細胞、および皮膚の線維芽細胞では、硫酸イオンの取り込みが著しく抑制されることがすでに分かっている。[15,36] 上記細胞においては *Slc26a2* トランスポーターが、細胞内への硫酸イオンの取り込みにおいて中心的な役割を果たしている。これらからのことから、*Slc26a2*-KO の上顎歯胚の象牙芽細胞において、硫酸イオンの細胞内への取り込みが阻害され、PAPS の産生量が低下することで、糖鎖修飾の過程でプロテオグリカンの硫酸化が十分に行われない可能性が考えられる。象牙芽細胞分化異常が、象牙芽細胞の細胞外マトリクスおよび基底膜に存在する硫酸化プロテオグリカンの総量の低下により引き起こされている可能性が示唆された。

５， *Slc26a2*-KO の上下顎歯胚の表現型の差異について

Slc26a2-KO の歯の表現型は、下顎歯胚より上顎歯胚で顕著であった。さらに、E18.5 の *Slc26a2*-KO の上下顎臼歯歯胚を摘出し、細胞外マトリクスおよび、細胞膜表面に存在する硫酸化プロテオグリカン総量を比色法により定量した結果、野生型と比較して、下顎臼歯歯胚の硫酸化プロテオグリカン総量に有意差はなかったが、上顎臼歯歯胚の硫酸化プロテオグリカン総量は有意に低下していた。これらの結果から、上下顎歯胚において、*Slc26a1* と *Slc26a2* の genetic redundancy が存在すると仮説を立て、上下顎歯胚の象牙芽細胞における *Slc26a1* と *Slc26a2* の遺伝子発現量の絶対定量を行った。その結果、下顎歯胚の象牙芽細胞は上顎歯胚の象牙芽細胞と比較して *Slc26a1* を高発現していた。下顎臼歯の象牙芽細胞においては *SLC26* ファミリーメンバーによって硫酸の取り込み機能が代償される一方で、上顎歯胚の象牙芽細胞においては、*Slc26a2* 遺伝子が欠失した場合に、他の *SLC26* ファミリーメンバーでは代償できない可能性が考えられる。

また、上下顎の歯種ごとの歯冠の形態、歯根の数は Msx-1，Msx-2，Dlx-1，Dlx-2 などのホメオボックス遺伝子が関係しており、Dlx1,2 は上顎、Dlx1,2,5,6 は下顎を制御することが知られている。[37,38] 硫酸イオントランスポーターの上下顎における発現の差異は、上下顎のパターニングの違いにより生み出されている可能性が考えられる。

結論

本研究は、頭蓋顎顔面領域において、*Slc26a2* トランスポーターを介した細胞内への硫酸イオンの取り込みが、特に上顎歯胚の象牙芽細胞分化、象牙質形成に重要な役割を果たしていることを示した初めての報告である。本研究結果は硫酸代謝と歯の発生の関与について有用な知見となり得る。また、SLC26A2 関連軟骨異形成症の予防や治療に役立つ可能性がある。

文献

1. Baldacci S, Gorini F, Santoro M, Pierini A, Minichilli F, Bianchi F. Environmental and individual exposure and the risk of congenital anomalies: a review of recent epidemiological evidence. *Epidemiol Prev*. 2018 May-Aug 2018;42(3-4 Suppl 1):1-34. doi:10.19191/EP18.3-4.S1.P001.057

2. Foster PA, Mueller JW. SULFATION PATHWAYS: Insights into steroid sulfation and desulfation pathways. *J Mol Endocrinol*. 08 2018;61(2):T271-T283. doi:10.1530/JME-18-0086

3. He X, Guo J, Niu W. Studying Protein Tyrosine O-Sulfation in Mammalian Cells with Genetically Encoded Sulfotyrosine. *Curr Protoc*. Nov 2021;1(11):e301. doi:10.1002/cpz1.301

4. Soares da Costa D, Reis RL, Pashkuleva I. Sulfation of Glycosaminoglycans and Its Implications in Human Health and Disorders. *Annu Rev Biomed Eng*. 06 21 2017;19:1-26. doi:10.1146/annurev-bioeng-071516-044610

5. Seidler U, Nikolovska K. Slc26 Family of Anion Transporters in the Gastrointestinal Tract: Expression, Function, Regulation, and Role in Disease. *Compr Physiol*. 03 15 2019;9(2):839-872. doi:10.1002/cphy.c180027

6. Alper SL, Sharma AK. The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr-Jun 2013;34(2-3):494-515. doi:10.1016/j.mam.2012.07.009

7. Ohana E, Shcheynikov N, Park M, Muallem S. Solute carrier family 26 member a2 (Slc26a2) protein functions as an electroneutral SOFormula/OH-/Cl- exchanger regulated by extracellular Cl-. *J Biol Chem*. Feb 10 2012;287(7):5122-32. doi:10.1074/jbc.M111.297192

8. The Subcellular PAPS Synthesis Pathway Responsible for the Sulfation of Proteoglycans

9. Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Nutr*. 1986;6:179-209. doi:10.1146/annurev.nu.06.070186.001143

10. Dogan P, Varal IG, Gorukmez O, Akkurt MO, Akdag A. Achondrogenesis Type 2 in a Newborn with a Novel Mutation on the. *Balkan J Med Genet*. Jun 2019;22(1):89-94. doi:10.2478/bjmg-2019-0001

11. Li J, Meng Y, Li M, Liu C, Li-Ling J, Lyu Y. [Diagnosis of a fetus with atelosteogenesis type 2 through combined prenatal ultrasonography and whole exome sequencing]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. Jul 10 2020;37(7):767-770. doi:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2020.07.016

12. Cai T, Yang L, Cai W, et al. Dysplastic spondylolysis is caused by mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 30 2015;112(26):8064-9. doi:10.1073/pnas.1502454112

13. Härkönen H, Loid P, Mäkitie O. -Associated Diastrophic Dysplasia and rMED-Clinical Features in Affected Finnish Children and Review of the Literature. *Genes (Basel)*. 05 11 2021;12(5)doi:10.3390/genes12050714

14. Paganini C, Gramegna Tota C, Monti L, et al. Improvement of the skeletal phenotype in a

mouse model of diastrophic dysplasia after postnatal treatment with N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol*. 03 2021;185:114452. doi:10.1016/j.bcp.2021.114452

15. Forlino A, Piazza R, Tiveron C, et al. A diastrophic dysplasia sulfate transporter (SLC26A2) mutant mouse: morphological and biochemical characterization of the resulting chondrodysplasia phenotype. *Hum Mol Genet*. Mar 15 2005;14(6):859-71. doi:10.1093/hmg/ddi079

16. Haila S, Hästbacka J, Böhling T, Karjalainen-Lindsberg ML, Kere J, Saarialho-Kere U. SLC26A2 (diastrophic dysplasia sulfate transporter) is expressed in developing and mature cartilage but also in other tissues and cell types. *J Histochem Cytochem*. Aug 2001;49(8):973-82. doi:10.1177/002215540104900805

17. Zheng C, Lin X, Xu X, et al. Suppressing UPR-dependent overactivation of FGFR3 signaling ameliorates SLC26A2-deficient chondrodysplasias. *EBioMedicine*. Feb 2019;40:695-709. doi:10.1016/j.ebiom.2019.01.010

18. Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res*. 1995;32(1-4):9-15. doi:10.3109/03008209509013700

19. Vidovic-Zdrilic I, Vining KH, Vijaykumar A, Kalajzic I, Mooney DJ, Mina M. FGF2 Enhances Odontoblast Differentiation by αSMA. *J Dent Res*. 09 2018;97(10):1170-1177. doi:10.1177/0022034518769827

20. Cho SW, Kwak S, Woolley TE, et al. Interactions between Shh, Sostdc1 and Wnt signaling and a new feedback loop for spatial patterning of the teeth. *Development*. May 2011;138(9):1807-16. doi:10.1242/dev.056051

21. Chen Y, Zhang Y, Ramachandran A, George A. DSPP Is Essential for Normal Development of the Dental-Craniofacial Complex. *J Dent Res*. Mar 2016;95(3):302-10. doi:10.1177/0022034515610768

22. Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*. Sep 2013;31(9):822-6. doi:10.1038/nbt.2623

23. Shen CC, Hsu MN, Chang CW, et al. Synthetic switch to minimize CRISPR off-target effects by self-restricting Cas9 transcription and translation. *Nucleic Acids Res*. 02 20 2019;47(3):e13. doi:10.1093/nar/gky1165

24. Makino S, Fukumura R, Gondo Y. Illegitimate translation causes unexpected gene expression from on-target out-of-frame alleles created by CRISPR-Cas9. *Sci Rep*. 12 21 2016;6:39608. doi:10.1038/srep39608

25. Jalali R, Zandieh-Doulabi B, DenBesten PK, et al. Slc26a3/Dra and Slc26a6 in Murine Ameloblasts. *J Dent Res*. Dec 2015;94(12):1732-9. doi:10.1177/0022034515606873

26. Yin K, Lei Y, Wen X, et al. SLC26A Gene Family Participate in pH Regulation during Enamel Maturation. *PLoS One*. 2015;10(12):e0144703. doi:10.1371/journal.pone.0144703

27. Yin K, Guo J, Lin W, Robertson SYT, Soleimani M, Paine ML. Deletion of. *Front Physiol*. 2017;8:307. doi:10.3389/fphys.2017.00307

28. Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, et al. Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation*. Jun

2007;75(5):452-62. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00150.x

29. Ono M, Oshima M, Ogawa M, et al. Practical whole-tooth restoration utilizing autologous bioengineered tooth germ transplantation in a postnatal canine model. *Sci Rep*. 03 16 2017;7:44522. doi:10.1038/srep44522

30. Jia J, Bian Z, Song Y. Dspp mutations disrupt mineralization homeostasis during odontoblast differentiation. *Am J Transl Res*. 2015;7(11):2379-96.

31. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*. Apr 26 2007;446(7139):1030-7. doi:10.1038/nature05817

32. Lai JP, Sandhu DS, Yu C, et al. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. Apr 2008;47(4):1211-22. doi:10.1002/hep.22202

33. Jastrebova N, Vanwildemeersch M, Rapraeger AC, Giménez-Gallego G, Lindahl U, Spillmann D. Heparan sulfate-related oligosaccharides in ternary complex formation with fibroblast growth factors 1 and 2 and their receptors. *J Biol Chem*. Sep 15 2006;281(37):26884-92. doi:10.1074/jbc.M600806200

34. Kamimura K, Koyama T, Habuchi H, et al. Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in Drosophila FGF signaling. *J Cell Biol*. Sep 11 2006;174(6):773-8. doi:10.1083/jcb.200603129

35. Hayano S, Kurosaka H, Yanagita T, et al. Roles of heparan sulfate sulfation in dentinogenesis. *J Biol Chem*. Apr 06 2012;287(15):12217-29. doi:10.1074/jbc.M111.332924

36. Gualeni B, Facchini M, De Leonardis F, et al. Defective proteoglycan sulfation of the growth plate zones causes reduced chondrocyte proliferation via an altered Indian hedgehog signalling. *Matrix Biol*. Jul 2010;29(6):453-60. doi:10.1016/j.matbio.2010.05.001

37. Haddaji Mastouri M, De Coster P, Zaghabani A, et al. Genetic study of non-syndromic tooth agenesis through the screening of paired box 9, msh homeobox 1, axin 2, and Wnt family member 10A genes: a case-series. *Eur J Oral Sci*. 02 2018;126(1):24-32. doi:10.1111/eos.12391

38. Xin T, Zhang T, Li Q, et al. A novel mutation of MSX1 in oligodontia inhibits odontogenesis of dental pulp stem cells via the ERK pathway. *Stem Cell Res Ther*. 08 22 2018;9(1):221. doi:10.1186/s13287-018-0965-3

図表

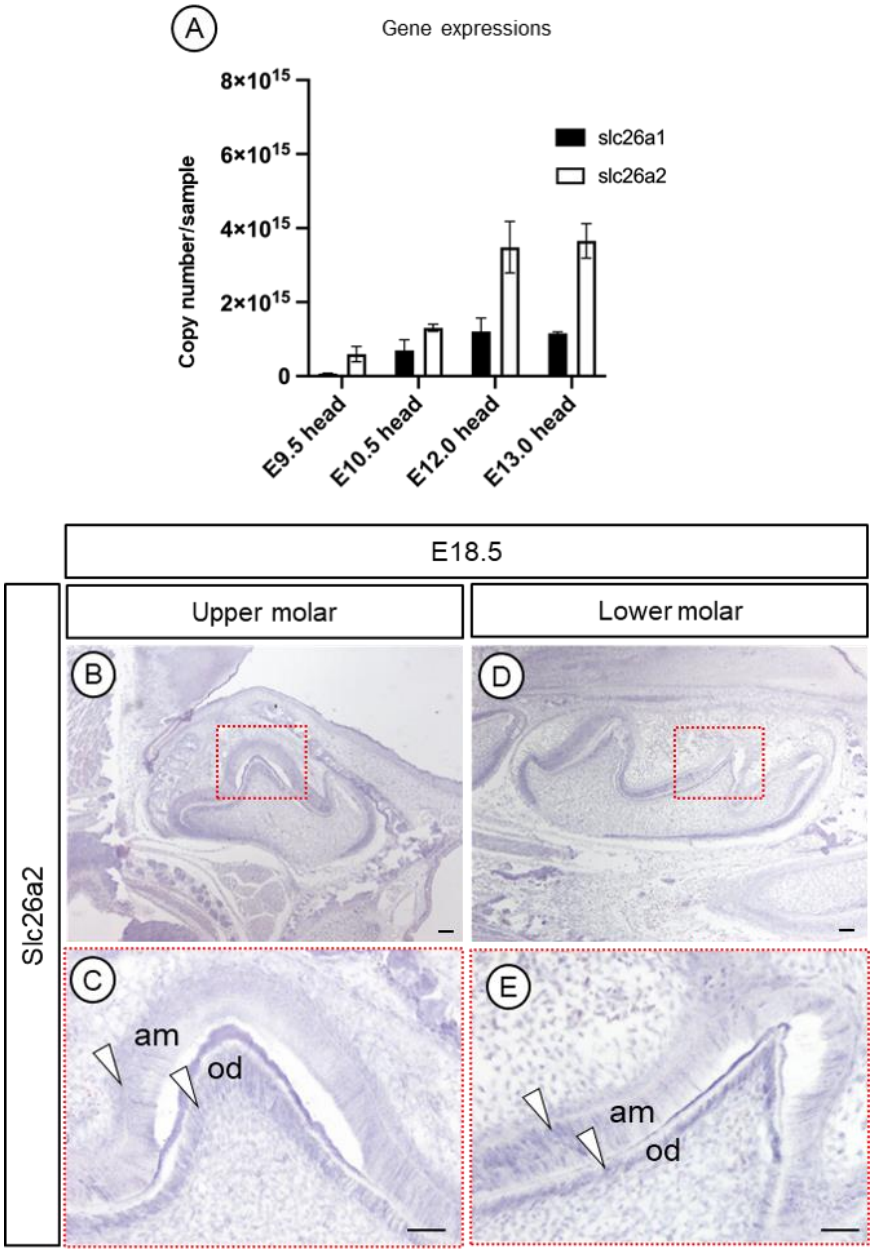

図１　*Slc26a1*、*Slc26a2* トランスポーター遺伝子の発現パターン

A)　頭蓋顎顔面領域における胎生 9.5 日齢、胎生 10.5 日齢、胎生 12 日齢、胎生 13 日齢の *Slc26a1* と *Slc26a2* の RT-qPCR 法による遺伝子発現の絶対定量

B)-E)　胎生 18.5 日齢のマウスの上下顎骨のパラフィン切片の in situ hybridization 法の実体顕微鏡像

B)-C)　上顎臼歯の前頭断切片

D)-E)　下顎臼歯の矢状断切片

▷ *Slc26a2* 発現部位を示す。

am, エナメル芽細胞; od, 象牙芽細胞

赤点線で囲まれた領域は拡大像領域である。

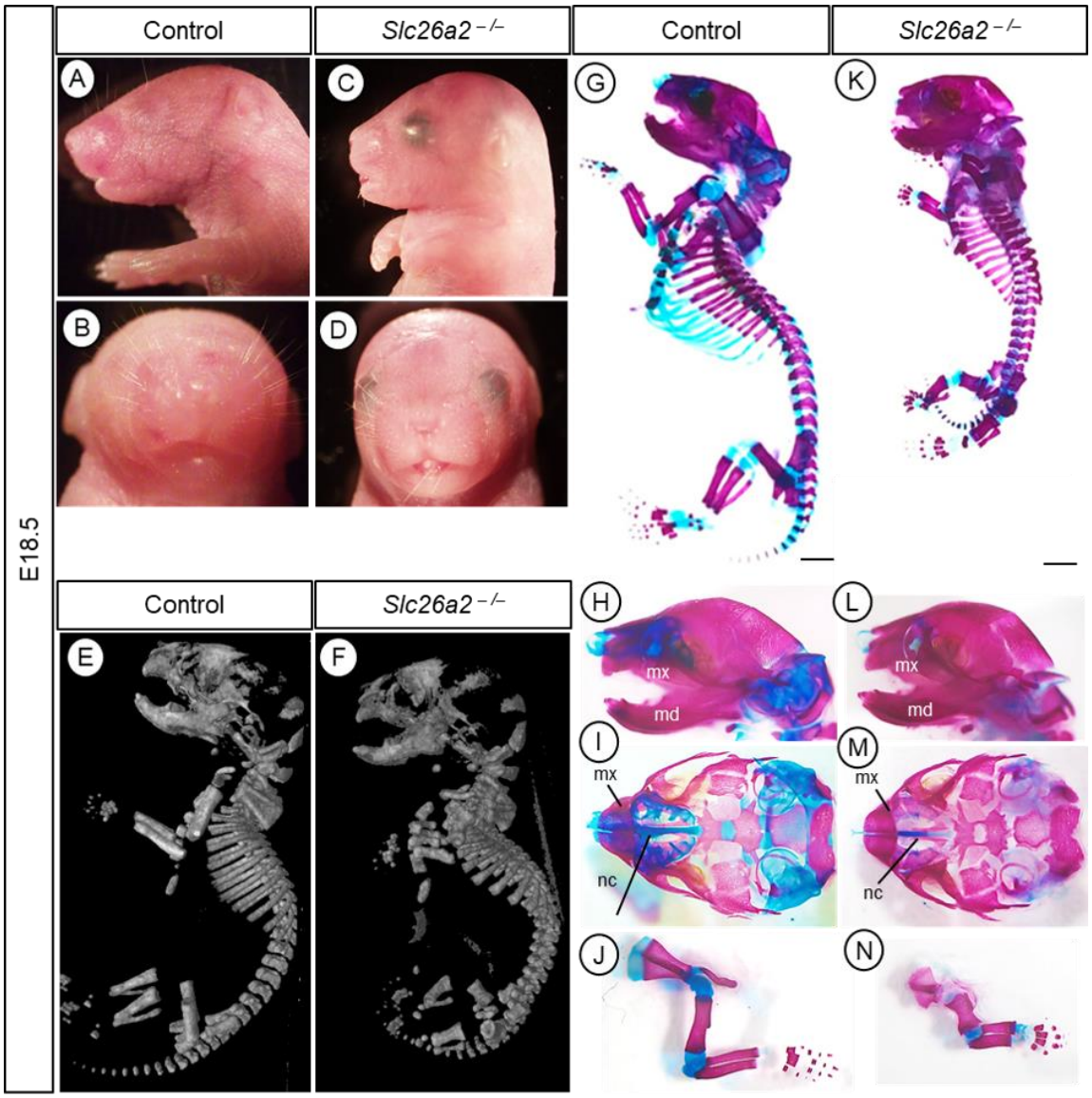

図 2　*Slc26a2* ノックアウトマウス（*Slc26a2*-KO）の形態学的解析

A)-D)　胎生 18.5 日齢のマウスの上下顎の実体顕微鏡像

A) 対照群側面観、B) 対照群正面観

C) *Slc26a2*-KO 側面観 D) *Slc26a2*-KO 正面観

E) -F)　胎生 18.5 日齢のマウスの μCT 像

E) 対照群、B) 対照群

G)-N)　胎生 18.5 日齢のマウス二重染色骨格標本像

mx, 上顎骨; md, 下顎骨; nc, 鼻腔

G)-J)　対照群

G) 全体像、H)上下顎骨側面観、 I) 頭蓋底、J)上肢

K)-N)　*Slc26a2*-KO

K) 全体像、L)上下顎骨側面観、 M) 頭蓋底、N)上肢

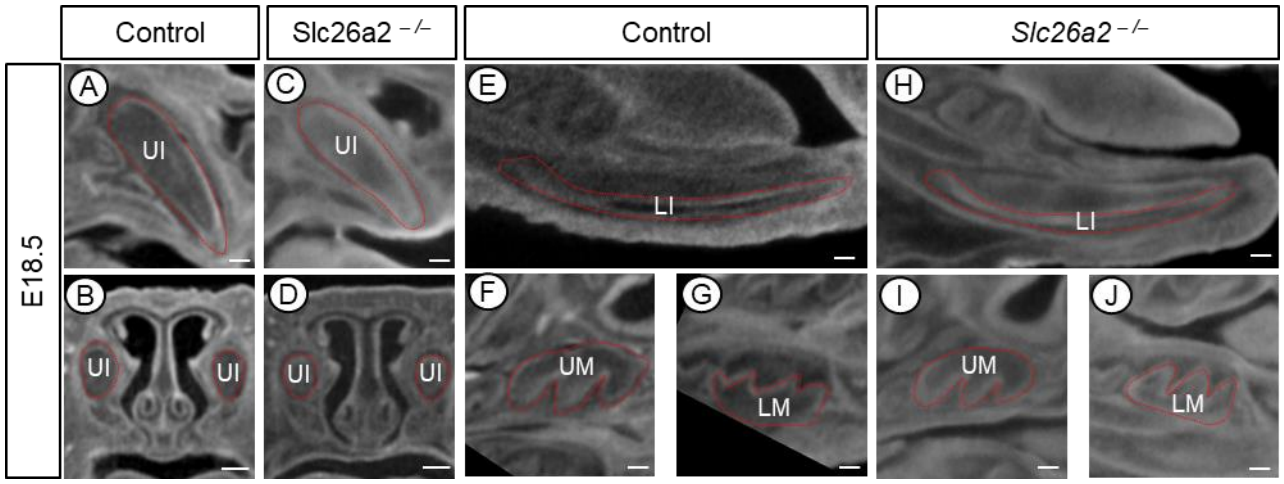

図 3　胎生 18 日齢の *Slc26a2*-KO の歯胚の形態学的解析

UI 上顎切歯; LI, 下顎切歯; UM, 上顎臼歯; LM, 下顎臼歯

A)-D)　上顎切歯の μCT タングステン造影像

A) 対照群矢状断、B) 対称群前頭断

C) *Slc26a2*-KO 矢状断、D) *Slc26a2*-KO 前頭断

E)-G)　対照群の矢状断 μCT タングステン造影像

E) 下顎切歯、F) 上顎臼歯、G) 下顎臼歯

H)-J)　*Slc26a2*-KO の矢状断 μCT タングステン造影像

H) 下顎切歯、I) 上顎臼歯、J) 下顎臼歯

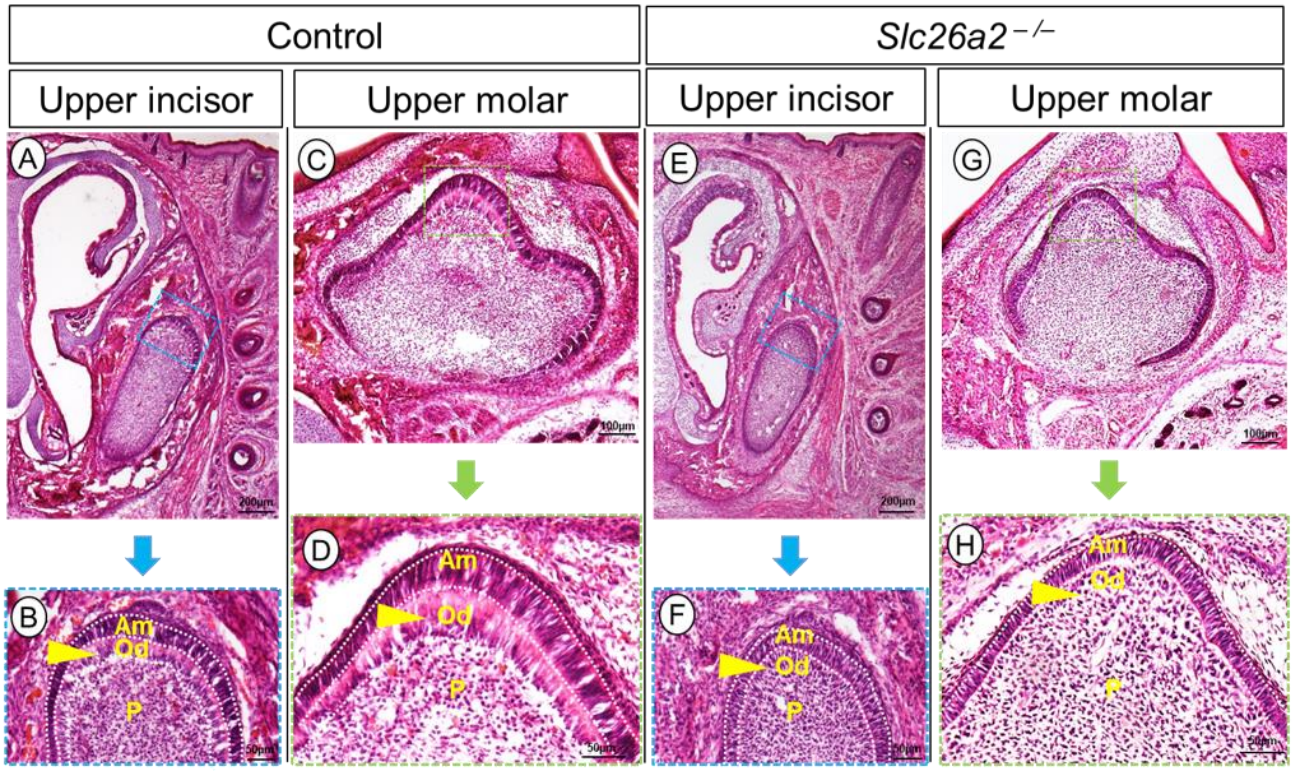

図４　胎生 18.5 日齢の *Slc26a2*-KO の上顎歯胚の組織学的解析

Od, odontoblasts（象牙芽細胞）; Am, ameloblasts（エナメル芽細胞）; P, dental pulp（歯髄）

A)-D)　胎生 18.5 日齢の対照群の上顎歯胚の HE 染色像

A)-B)　上顎切歯前頭断

C)-D)　上顎臼歯前頭断

E)-H)　胎生 18.5 日齢の *Slc26a2*-KO の上顎歯胚の HE 染色像

E)-F)　上顎切歯前頭断

G)-H)　上顎臼歯前頭断

点線で囲まれた領域は拡大像領域である。

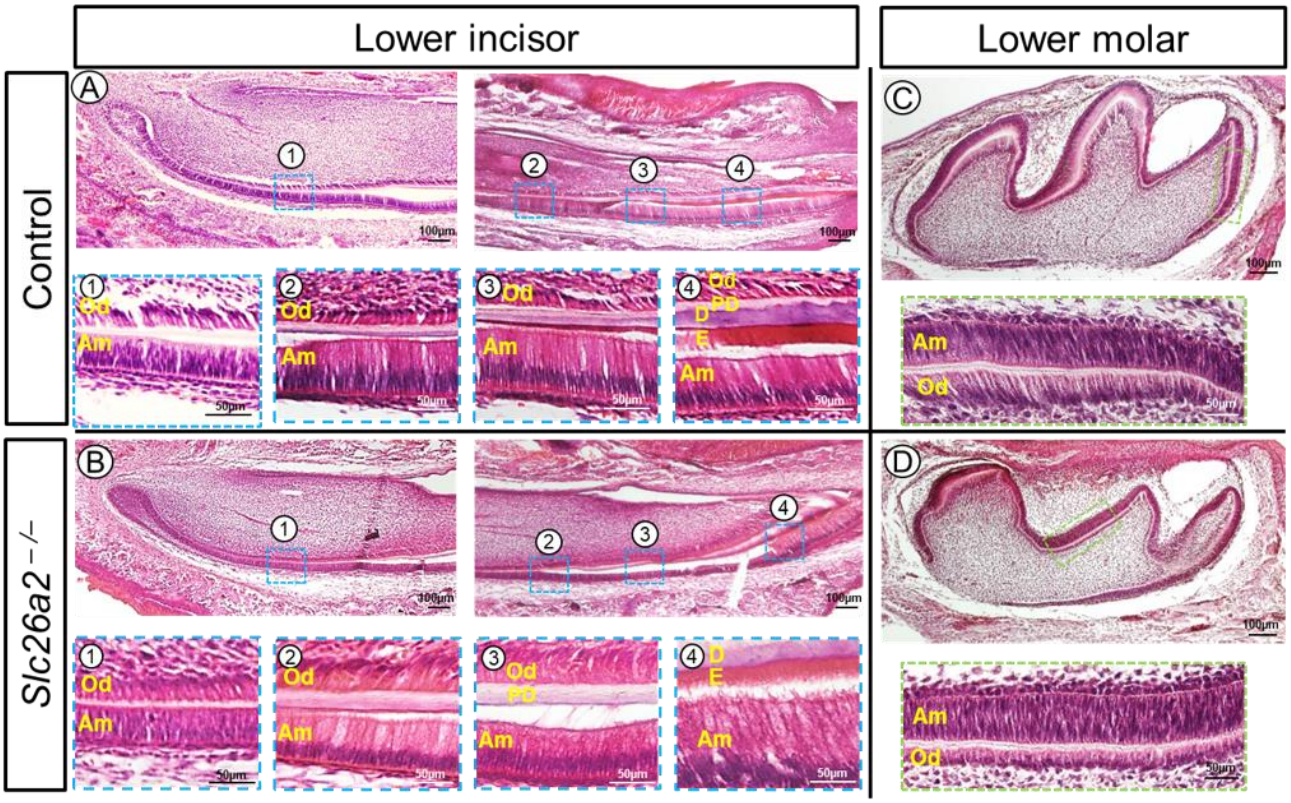

図 5　胎生 18.5 日齢の *Slc26a2*-KO の下顎歯胚の組織学的解析

Am, ameloblast（エナメル芽細胞）; PD, pre-dentin（象牙前質）; D, dentin（象牙質）; E, enamel（エナメル質）;OD, odontoblasts（象牙芽細胞）; P, dental pulp（歯髄）

A)-B)　胎生 18.5 日齢の下顎切歯歯胚の HE 染色像

A)　対照群矢状断

B)　*Slc26a2*-KO 矢状断

C-D)　胎生 18.5 日齢の下顎臼歯歯胚の HE 染色像

C)　対照群矢状断

D)　*Slc26a2*-KO 矢状断

点線で囲まれた領域は拡大像領域である。

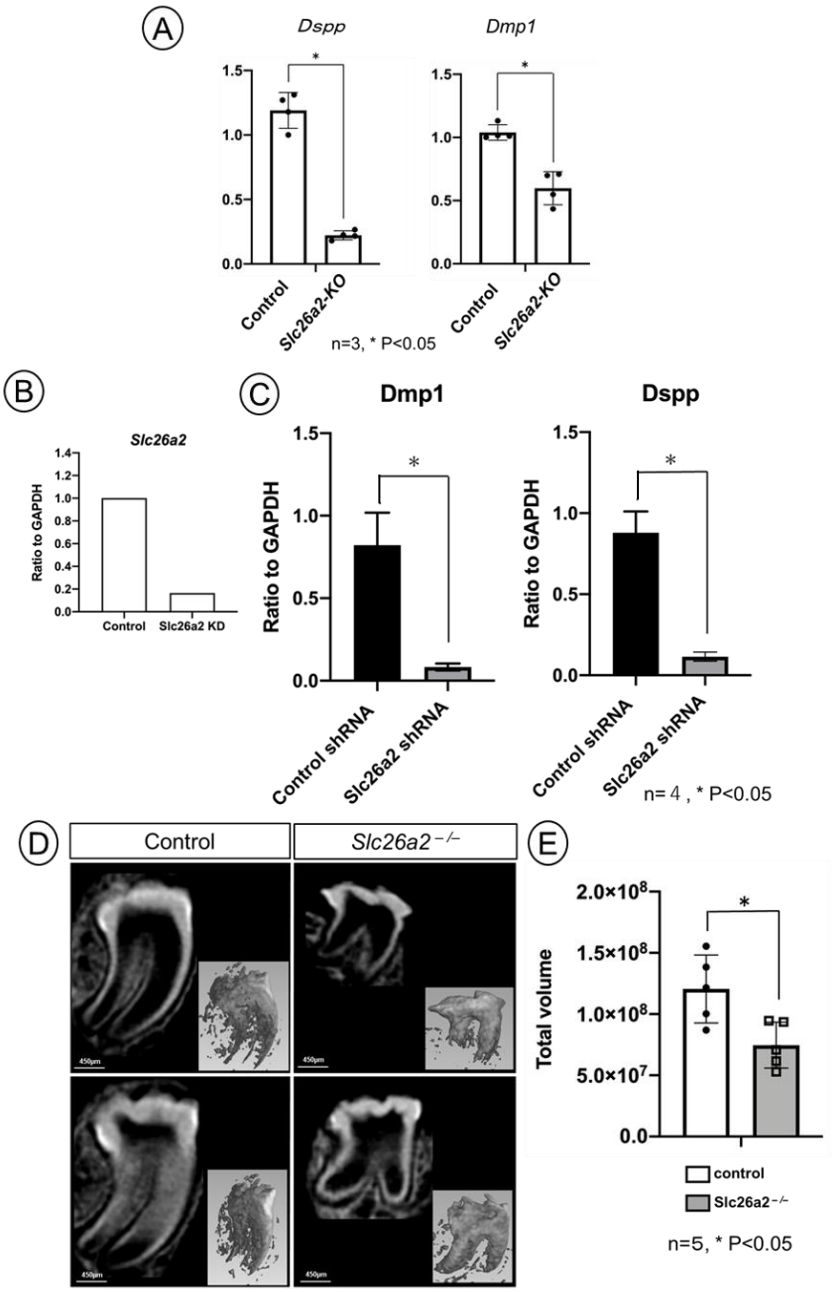

図 6　*Slc26a2* 欠失が象牙芽細胞分化に与える影響の解析

A)　*Slc26a2*-KO 上顎臼歯歯胚の象牙芽細胞分化の解析
象牙質シアロリンタンパク質；*Dspp*, 象牙質マトリックスタンパク質 1；*Dmp1*
n=3, ＊:P<0.05

B)　ヒト歯髄幹細胞における *Slc26a2* 遺伝子ノックダウン効率

C)　ヒト歯髄幹細胞の *Slc26a2* 遺伝子ノックダウン株の分化能の解析
n=4, ＊:P<0.05

D)　腎被膜下に移植し 30 日後に発生した対照群、*Slc26a2*-KO の上顎臼歯

E)　腎移植下に移植し、発生した歯胚の象牙質の体積
n=5, ＊:P<0.05

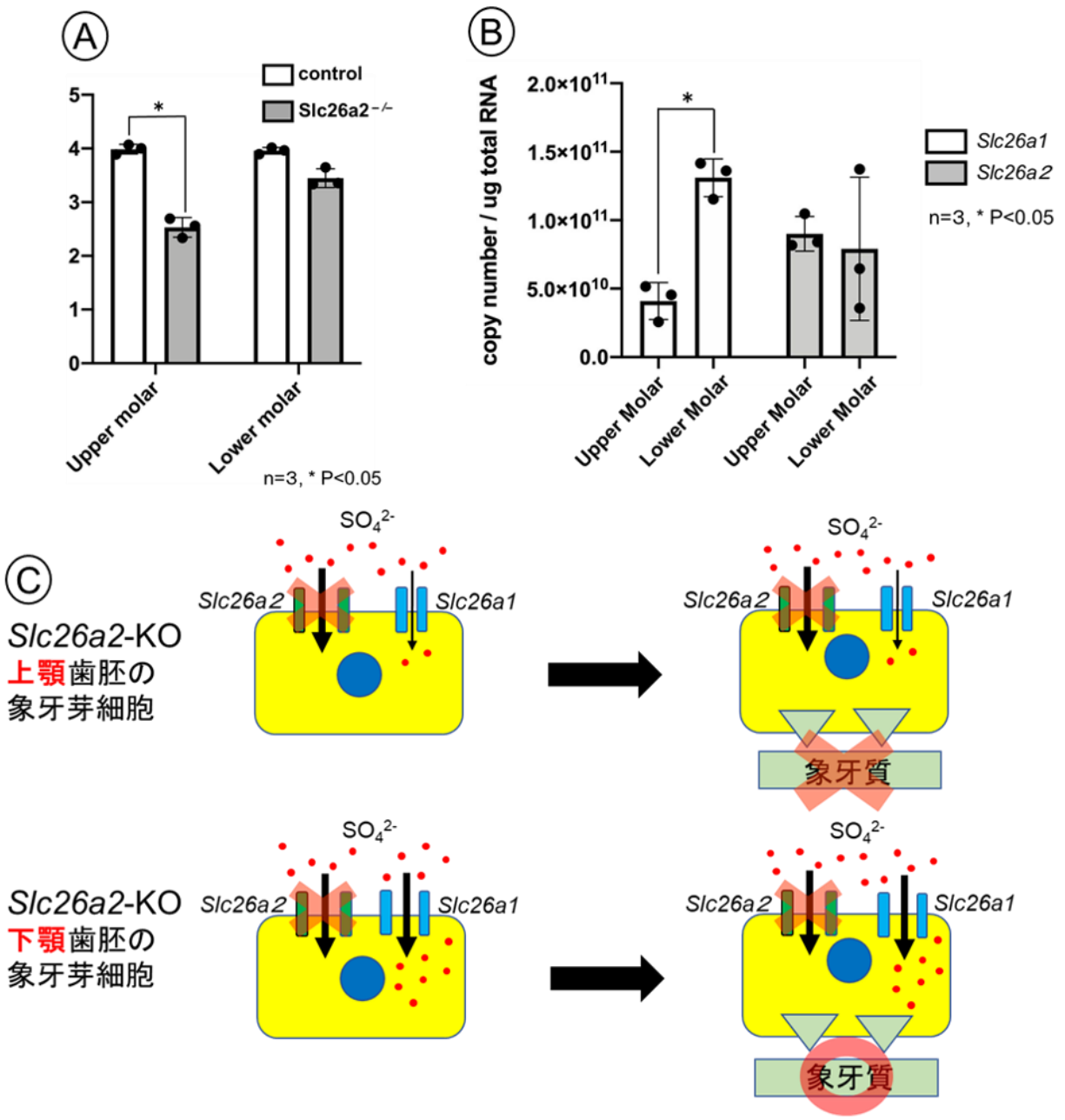

図 7　*Slc26a2*-KO の上下顎歯胚の表現型の差異についての解析

A) 対照群と *Slc26a2*-KO の上下顎臼歯歯胚の硫酸化プロテオグリカンの総量
n=3, ＊:P<0.05

B) 象牙芽細胞における *Slc26a1*、*Slc26a2* 遺伝子発現パターン
n=3, ＊:P<0.05

C) 上下顎歯胚における象牙質形成時の *Slc26a1* と *Slc26a2* の functional redundancy の模式図