

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20370

研究課題名(和文) 乳腺を唾液腺たらしめる組織間マイクロRNAシグナル

研究課題名(英文) MicroRNA signals between tissues play a role in specifying epithelial cell fate during organogenesis

研究代表者

林 徹 (Hayashi, Toru)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：10454266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔マウスの「唾液腺の間葉」と「乳腺の上皮」を組み合わせると培養すると、乳腺上皮は「唾液腺の形態」を示します (Sakakura et al., Science, 1976)。このことは、唾液腺間葉からのシグナルが、乳腺上皮にエピジェネティックな変化 (DNA塩基配列の変化によらない遺伝子発現の変化) をもたらすことを示唆しています。そこで唾液腺間葉から分泌される短いRNAが、乳腺上皮を唾液腺様へと誘導すると仮説を立てました。その結果、唾液腺上皮のエピジェネティックな変化は胎生15日齢を境に生じること、間葉から分泌される短いRNAが乳腺の発生に重要な転写因子を抑制しうることが示唆されました。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) are small RNAs that regulate gene expression. There is evidence that miRNAs are used as mobile signals for intercellular communication via extracellular vesicles including exosomes. Recently, we found that exosomal miRNAs released from the mesenchyme are mobile signals for epithelial-mesenchymal interactions during fetal submandibular gland (SMG) development. Classic recombination experiments using SMG and mammary gland showed that the salivary mesenchyme is inductive to epithelium, suggesting that the SMG mesenchyme affect epithelial epigenetic states. Epigenetics are genomic modifications without alteration of the DNA sequences. We hypothesized that the exosomal miRNAs from SMG mesenchyme could be signals to induce changes in epigenetics during the classic recombination experiments. Our data suggested that epigenetics in SMG epithelium alter at embryonic day 15 and that some exosomal miRNAs could target a transcription factor important for mammary gland development.

研究分野：発生学、解剖学

キーワード：マイクロRNA exosomes 上皮間葉相互作用 エピジェネティクス 唾液腺 器官形成

1. 研究開始当初の背景

(1)生体内の様々な器官では、上皮と間葉が互いに働きかけることでその発生が進行していきます。例えば上皮が間葉に、あるいは間葉が上皮に「シグナル」を提供することで器官特有の機能を獲得していきます。こうした上皮間葉相互作用は、唾液腺、乳腺、涙腺、腎臓、肺、歯などで広く観察されています。

1960-1970年代、異なる器官を由来とする上皮と間葉を組み合わせる試みが多くなされました。たとえば、胎仔マウスの「唾液腺の間葉」と「乳腺の上皮」を組み合わせると、乳腺上皮が「唾液腺に特徴的な形態」を示すようになります (Sakakura *et al.*, Science, 1976)。

(2)このことは、唾液腺の間葉由来のシグナルが、乳腺上皮を唾液腺たらしめることを示します。当然ながら唾液腺上皮と乳腺上皮は同じゲノムDNAを有しているため、唾液腺の間葉はエピジェネティックな変化(エピジェネティクス:DNA塩基配列の変化によらない遺伝子発現の変化)を、乳腺上皮にもたらしめているはずですが、しかし、どんなシグナルが関与しているのかは40年近く経過した現在も明らかになっておりません。

(3)そのような中、様々な細胞が分泌するエクソソームと呼ばれる小胞(直径100nm前後)に、マイクロRNAが内包されていることが分かってきました。マイクロRNAとは蛋白質をコードしないRNAの一種で、メッセンジャーRNAに結合しその発現や翻訳を阻害することから転写因子のような働きがあります。

(4)これらを踏まえ、予備研究を実施した結果、研究代表者は隣接する組織間、すなわち間葉から上皮へマイクロRNAが輸送される「マイクロRNAシグナル」の存在を突き止めました。輸送されるマイクロRNAの種類は81種類と見積もっています。

2. 研究の目的

(1)唾液腺の間葉から輸送されるマイクロRNAのうち、未成熟な上皮を唾液腺たらしめるマイクロRNAの種類を特定することを目的としました。これらのマイクロRNAはエピジェネティックな変化をもたらすと考えられるため、まずは唾液腺の発生期におけるエピジェネティクスの変化について基礎的な知見を得ることを試みました。

(2)また、エクソソームに含まれるマイクロRNAのうち、乳腺の発生にとって重要な転写因子を標的とするマイクロRNAの種類を絞り込み、特定します。

3. 研究の方法

(1)胎生期13日齢(E13)から胎生期16日齢(E16)にかけてのエピジェネティクスの変化を調べました。まず、メチル化あるいは脱メチル化されたシトシン(それぞれ5-mc、5-hmc)に着目しました。メチル化されたDNA(5-mc)はいわば遺伝子発現の「スイッチのOFF」、脱メチル化されたDNA(5-hmc)は「スイッチのON」に相当する指標です。5-mc、5-hmcそれぞれに特異的な抗体を用いたwhole mount免疫染色を実施し、共焦点レーザー顕微鏡観察により各胎生期の唾液腺上皮を観察しました。

(2)また、エクソソームに含まれるマイクロRNAについて、標的遺伝子をパイオインフォマティクスで予想しました。乳腺にとって重要な転写因子の発現を抑制するマイクロRNAを絞り込みました。

4. 研究成果

(1)免疫染色によるメチル化DNA(5-mc)検出の条件検討

背景:ゲノムDNAとタンパク質の複合体

核の中のゲノムDNAはタンパク質と複合体を形成することで高度に凝縮されています。この複合体をクロマチンと呼びます。クロマチンを構成する最も基本的な単位は、200塩基弱のDNAがヒストンというタンパク質8個に巻きついた形をしています。メチル基で修飾されたDNAを、抗原抗体反応により検出するには、DNAをマスクしているヒストンなどのタンパク質を変性させ除去する必要があります。

方法:抗原(メチル化DNA)の賦活化

メチル化DNAを抗原として検出できるよう、唾液腺を試薬で処理しました。方法は3通りを試しました。2N塩酸(Celik, Journal of Immunological Methods, 2014)、またはDNA分解酵素(Ye *et al.*, Histochemistry and Cell Biology, 2007)、そして両者を組み合わせた場合の3通りです。これらの処理を施した唾液腺を用いて、メチル化DNA特異的な抗体による免疫染色を実施し、検出方法の最適化を実施しました。その結果は以下の通りです(下表)。

	処理無し	2N 塩酸	DNA 分解酵素	両者の 組み合わせ
メチル化 DNAの検出	-	+	+	+++

まず、処理無しの場合ではメチル化DNAは検出できませんでした。2N塩酸、DNA分解酵素をそれぞれ単独で処理した場合は、唾液腺

を構成する細胞の核に、やや不鮮明ではありましたが、染色像が得られました。一方、両試薬を組み合わせて処理すると、最も鮮明な染色像が得られました。特に、核内のクロマチンの構造を反映するようなシグナルが観察されました。これらの結果を踏まえて、続く実験では両試薬を組み合わせた条件を用いました。

なお詳細は割愛しますが、処理時間や試薬の濃度も検討し、反応条件が緩すぎる又は厳しすぎるとメチル化 DNA が検出できないケースもありました。処理時間などは対象とする試料によって異なると考えられ、もし他の器官を用いる場合は再び検討が必要になります。

(2) 唾液腺上皮の発生初期におけるエピジェネティックな変化

E13-E16 の唾液腺におけるエピジェネティックな変化について調べるため、メチル化 DNA (5-mc)、脱メチル化された DNA (5-hmc) に対する免疫染色を実施しました。抗原の賦活化は(1)で述べた様に、2N 塩酸と DNA 分解酵素を組み合わせて実施しました。

5-mc と 5-hmc の染色シグナルの傾向

まず、5-mc と 5-hmc の染色シグナルは核に観察されました。特に 5-mc はドット状に観察されました。これはクロマチンが高度に凝縮している領域(ヘテロクロマチン)に相当すると考えられます。一方、5-hmc はヘテロクロマチン以外の領域(ユークロマチン)に観察されました。この領域はヘテロクロマチンのように高度に凝集していないため、遺伝子発現に関わる各種の制御因子がゲノム DNA にアクセスしやすいと考えられています。まとめると、5-mc は主にヘテロクロマチン、5-hmc は主にユークロマチンに検出されました。

初期発生における唾液腺の染色パターン

次に、唾液腺の染色結果を以下の表に示しました。

	唾液腺							
	上皮				間葉			
	E13	E14	E15	E16	E13	E14	E15	E16
5-mc	+	+	+	+	+	+	+	+
5-hmc	-	-	+	+	+	+	+	+

まず、間葉では E13-E16 の胎生期を通じてメチル化、脱メチル化の染色パターンに大きな変化は見られませんでした。

上皮の 5-mc については、胎生期を通じて染色パターンに大きな変化は見られませんでした。しかし興味深いことに、5-hmc は E15 を境に劇的に強く検出されるようになりま

した。このことは、唾液腺上皮のエピジェネティクスが E15 の前後に大きく変化することを意味しています。実は、唾液腺において唾液の分泌に関わる機能的な分化は、E15 頃に始まるということが以前から知られていません (Patel *et al.*, Differentiation, 2006)。つまり、E15 の唾液腺上皮において、核内のユークロマチン領域のゲノム DNA が広範囲に脱メチル化されており、このエピジェネティックな変化を通じて遺伝子発現が促進し、唾液分泌などの機能的な分化が始まる、ということが示唆されました。

考察

なぜ E15 に上皮の脱メチル化が進行するのか？なぜそれ以前のステージでは分化が抑制されているのか？これらの疑問に対して、研究代表者はマイクロ RNA シグナルによる上皮間葉相互作用が関係していると考えています。

間葉から上皮へと輸送されるマイクロ RNA が上皮のエピジェネティクスを調節している可能性があります。実際に研究代表者は、エピジェネティクスの制御因子を標的とするマイクロ RNA が、間葉から上皮へと輸送されていることを示してきました (Hayashi *et al.*, Developmental Cell, 2017)。この制御因子の機能は未解明であるものの、唾液腺上皮の前駆細胞(幹細胞よりは制限されるが、様々な細胞に分化しうる細胞)において、この制御因子とメチル化された DNA (5-mc) が相互作用していると考えられています。

このように、唾液腺間葉からのマイクロ RNA シグナルは上皮のエピジェネティクスを調節しうることから、このような働きが、乳腺上皮を唾液腺様へと変化させる一因と考えています。

(3) 乳腺の重要な転写因子を標的とするマイクロ RNA

発生初期の未成熟な上皮が、誤って他の器官にならないよう、間葉からのマイクロ RNA シグナルが「必要のない遺伝子の発現」を抑制する働きもあるのでは、と仮説を立てています。

例えば、唾液腺上皮と乳腺上皮は共に外胚葉由来と考えられていますし、唾液腺様の形態を示す乳腺腫瘍、逆に乳腺様の形態を示す唾液腺腫瘍も知られています。したがって、外胚葉由来の組織がきちんと唾液腺上皮になるよう、乳腺上皮などで必要となるような遺伝子発現を抑える必要があるはずで

研究代表者は間葉から分泌されるマイクロ RNA 81 種類のうち、乳腺の発生において重要な転写因子を標的とするマイクロ RNA が含まれていないかを検討しました。その際には標的遺伝子と相補的に結合する塩基配列

領域(シード配列) およびそれらの生物種間の保存性などを考慮した、標的遺伝子予測プログラム TargetScan を利用しました。その結果、間葉から分泌されるマイクロ RNA 81 種類のうち、miR-128a、miR-130、miR-152、miR-301、miR-425 の 5 種類が、ある転写因子を標的としうるということが分かりました。

(4) 研究成果の今後の展望

本研究計画において、以下の 2 点を明らかにしました。

発生初期の唾液腺上皮は、機能的な分化が始まる E15 を境に、劇的に脱メチル化が進行する。

間葉から分泌されるマイクロ RNA 5 種類が乳腺の発生に重要な転写因子を抑制しうる。

本研究計画の目的の達成には道半ばと言わざるを得ません。しかし、今まで知られていなかった唾液腺のエピジェネティクスに関して大きな進展がありました。を合わせて考えると、唾液腺間葉からのマイクロ RNA シグナルは、発生初期(E13-E14)における唾液腺上皮の機能的な分化を抑えつつ、未成熟な上皮を唾液腺のそれへと規定していく意義があるのかもしれませんが。本研究計画で得られた知見を、引き続き追及および発展させて、上皮間葉相互作用を介した器官形成機構の知られざる一面を今後も明らかにしていきます。

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 2 件)

Toru Hayashi, Isabelle M.A. Lombaert, Belinda R. Hauser, Vaishali N. Patel, Matthew P. Hoffman. Exosomal MicroRNA Transport from Salivary Mesenchyme Regulates Epithelial Progenitor Expansion during Organogenesis. *Developmental Cell*. 40, 95-103, 2017. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.12.001. 査読有

Kenji Mizukoshi, Noriko Koyama, Toru Hayashi, Liguang Zheng, Sachiko Matsuura, Masanori Kashimata. Shh/ Ptch and EGF/ ErbB cooperatively regulate branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands. *Developmental Biology*. 412, 278-287, 2016. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.02.018. 査読有

[学会発表](計 6 件)

林徹、柏俣正典、Matthew P. Hoffman. 胎

仔マウス器官の組織間におけるマイクロ RNA 輸送. 第 122 回日本解剖学会総会・学術集会. 2017 年 3 月 30 日. 長崎大学坂本キャンパス (長崎県・長崎市).

林徹. 臓器の組織間における RNA コミュニケーション. 第 10 回 北里大学医療衛生学部附属「再生医療・細胞デザイン研究施設シンポジウム」. 2017 年 3 月 8 日. 北里大学医療衛生学部 A3 号館 (神奈川県・相模原市).

Toru Hayashi and Masanori Kashimata. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in Fetal Submandibular Gland Development. Gordon Research Conference, Salivary Glands & Exocrine Biology, Understanding Development, Function and Regeneration of Secretory Tissues: Novel Signaling Pathways and Approaches to Treat Exocrine Disorders. Feb. 19, 2017. Galveston, TX(USA).

Toru Hayashi and Masanori Kashimata. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in Fetal Submandibular Gland Development. The 4th International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen. Nov. 30, 2016. Okazaki Conference Center of National Institutes of Natural Sciences (Okazaki, Aichi).

林徹、柏俣正典、Matthew P. Hoffman. RNA interactions between tissues in fetal mouse salivary glands. 第 58 回歯科基礎医学学会学術大会, The 30th Salivary Research Colloquium "Salivary glands: an unique and valuable experimental system". 2016 年 8 月 24 日. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市). 招待講演.

林徹、柏俣正典. 胎仔マウス顎下腺における 5-メチル化シトシンと 5-ヒドロキシメチル化シトシンのダイナミクス. 第 57 回歯科基礎医学学会学術大会. 2015 年 09 月 13 日. 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市).

[その他]

ホームページ等

研究代表者の Research Map

<http://researchmap.jp/payasi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 徹 (HAYASHI, Toru)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号: 10454266