

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11767

研究課題名(和文)舌乳頭新生技術の開発を目指す特殊粘膜への組織転換機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of tissue conversion to specialized mucosa during the lingual papillae development

研究代表者

吉村 建 (Yoshimura, Ken)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：90297953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々が選定した舌乳頭形態形成の関連が示唆される転写因子候補のin vivoのRNA干渉による影響を解析する目的で、siRNAと蛍光タンパク質を同時に発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを作製した。3つの候補を過去のマウス胎仔舌粘膜組織マイクロアレイ解析より選定した。作成されたAAVベクターをマグネットビーズと混合し、島根大の大谷先生の方法でE16の胎仔舌粘膜組織に注入し、in vivoのRNA干渉を試みた。注入2日後に胎仔試料を採取し4%PFA固定の後、凍結切片の作製とRNAプローブによるISH・HE染色を行い、組織を観察した。若干の組織変化様所見は見られたが、さらなる精査を継続する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

舌は消化器の導入器官として摂食嚥下に欠かせない一方、しばしば悪性腫瘍により失われる。QOL(生活の質)の向上には舌の再建が不可欠であるが、現状は他の皮膚を移植するケースが多い。口腔粘膜の中で舌背粘膜は摂食嚥下に寄与する機械乳頭と、味覚の受容に寄与する味覚乳頭を具備するという他にない特徴を具備することから特殊粘膜と呼ばれている。他の口腔粘膜である被覆粘膜・咀嚼粘膜とは異なる性質を持つことより再生に向けた基礎的情報をもたらす本研究は、学術的のみならず臨床応用を目指すことから社会的にも意義があるものと思われる。今回の結果はまだ精査途中であり、今後も確認・追実験を行いさらなる所見を求めていく。

研究成果の概要(英文)：To analyze the effects of in vivo RNA interference on tissue changes for three transcription factors, we designed adeno-associated viral (AAV) vectors simultaneously expressing their respective siRNAs and fluorescent proteins. We selected three candidates in lingual mucosal papillae morphogenesis from our previous microarray analysis of mouse fetal lingual tissues. The AAV vectors were microinjected into late fetal tongue mucosal tissues (E16) using technique by Professor Otani at Shimane University for in-vivo RNA interference of the candidate genes. The AAV vector was mixed with a fine magnetic beads to form a complex. Two days following the injection, fetal samples were collected and fixed with 4% PFA. Frozen sections were made and tissues were observed by HE and ISH with RNA probes. Some significant tissue changes followed after injection of the AAV vector. Further detailed searches may be informative.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：舌粘膜 特殊粘膜 AAVベクター 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 舌は消化器の導入器官として摂食嚥下に欠かせない一方、しばしば悪性腫瘍により失われる。QOL の向上には舌の再建が不可欠である。舌筋の再生は再生医学によるアプローチが始まったが、舌粘膜の再生には至る報告は見られなかった。

(2) 舌背粘膜は口腔粘膜の中で舌乳頭を持つという他にない特徴を具備することから特殊粘膜と呼ばれ、摂食嚥下に寄与する機械乳頭と、味覚の受容に寄与する味覚乳頭が舌背の舌粘膜にそれぞれ分布する。

(3) こうした舌粘膜、特に舌乳頭の形態形成機構において支配神経の進展や、毛細血管形成に関するものなども示唆されているが、舌乳頭形態形成機構の核心はいまだ不明であった。

(4) 研究代表者らは本研究課題申請当初、遺伝子導入の手段として先の科学研究費研究課題により手技が確立したエレクトロポレーション法を使用し、胎仔器官培養舌組織を遺伝子導入のターゲットとして想定していた。

2. 研究の目的

本研究は胎生舌粘膜組織内へ乳頭形態形成関連遺伝子に対応した RNA 干渉を惹起させる siRNA を発現する蛍光タンパクをレポーターとする AAV (アデノ随伴ウイルス) ベクターによるトランスフェクションで導入された細胞を組織細胞学的に評価し舌乳頭新生技術確立に向け基礎データの取得を目指すのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 舌乳頭形態形成の関連が示唆される転写因子候補の siRNA 発現ベクターの作製

①先に行われたマウス総 RNA からの cDNA マイクロアレイ解析における発現遺伝子セットより、本学現有の Genespring GX 解析ソフトにより今回新たに 3 種類の遺伝子候補を抽出した。

②同時に、上記 3 種類の遺伝子の舌粘膜上の局在を確認するため、海外の in situ hybridization (ISH) 法におけるマウス胎仔 (E14.5) の転写因子に関する mRNA の組織内発現画像データベース (<http://www.eurexpress.org/ee/>) を検索し、そのうち舌粘膜組織上におけるこれらの遺伝子の発現部位の確認を行った。

③上記の転写因子候補の siRNA 発現ベクターを設計した。ベクターには蛍光レポーターを挿入し、導入後の組織内局在が可視化できるようにした。

(2) AAV ベクターの作製と力価確認

前回の研究課題における実験動物胎仔舌粘膜組織へのエレクトロポレーション法による蛍光レポーター導入に関するその後の確認と検証の過程において、舌組織内の遺伝子導入領域が限定され、セルソーティングなどに向けた大量の細胞採取が難しいことが判明したことから、エレクトロポレーション法に代わる遺伝子導入手法として AAV による方法を試行した。siRNA 発現 AAV ベクター作製および qPCR による力価確認 (タカラバイオ社 AAV pro Titration kit 使用) は研究協力者である本学学生化学講座の森田貴雄先生に委託した。

(3) 器官培養組織に代わる in vivo 胎仔組織への AAV ベクター導入の試行

前回の研究課題における実験動物胎仔器官培養舌粘膜組織への遺伝子導入に関するその後の確認ならびに検証の過程において、器官培養舌組織は本来の胎内における形態発生と異なる、などの問題点が出てきた。

そこで器官培養された舌粘膜組織ではなく、実験動物の胎内において遺伝子導入を行う方法を試行することとした。この方法に関し、実験動物胎内の胎仔組織への Ex-ovo マイクロインジェクション法に関しエキスパートである島根大学解剖学教室の大谷 浩先生より技術指導を受けた。この Ex-ovo マイクロインジェクション法を応用し、AAV ベクターを胎内の胎仔にマイクロインジェクションすることで導入を行った。この手法は母体の子宮筋を剥離することで、マイクロインジェクションの後も胎仔は出生することなく、そのまま母体内で発生・器官形成が継続する。なお、本実験は動物実験ならびに遺伝子組み換え実験 (P1A) に相当するため、実験遂行に当たっては本学動物倫理委員会と組み換え DNA 実験委員会の承認を得た。

(4) RNA 干渉 (RNAi) 施行後の胎仔組織の評価

今回、胎生 16 日齢 (E16) のマウス (ICR:slc) 胎仔にトランスフェクションを行ってから 2 日後に Sacrifice し、胎生 18 日齢 (E18) の胎仔の頭部を含めた舌粘膜組織を得た。得られた舌粘膜組織は 4%PFA にて固定を行い HE 染色による組織学的評価ならびに蛍光タンパクレポーター (抗 ZsGreen 抗体) に対する免疫染色 (ABC 法) と K4, Lam3, CD34 による in situ hybridization 法 (ACD Diagnostic 社 RNAScope) の染色も行い、観察を行った。

4. 研究成果

(1) 舌乳頭形態形成の関連が示唆される転写因子候補の siRNA 発現ベクターの作製

①マウス胎仔舌組織抽出総 mRNA から変換された cDNA マイクロアレイ解析における発現遺伝子セットより、Genespring GX 解析ソフトによる総発現 mRNA の推移を図 1 に、抽出した 3 種類の転写因子候補の胎生期の推移を図 2-4 に示す。

候補 1 に関しては出生に向かうにつれ発現量の減少が見られ、候補 2、3 に関しては発現量の上昇 (候補 3 は E18 齢にピークとなる) が見られた。

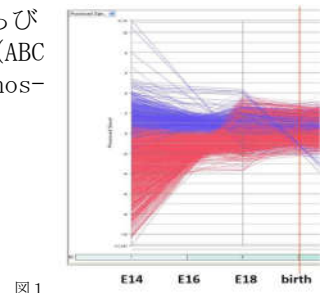


図 1 総 mRNA の推移 (Genespring GX)

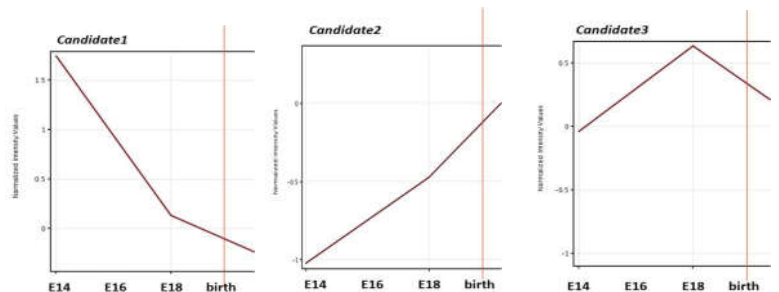


図2 マウス胎仔舌組織に発現する候補遺伝子1 mRNAの推移 (Genespring GX)
 図3 マウス胎仔舌組織に発現する候補遺伝子2 mRNAの推移 (Genespring GX)
 図4 マウス胎仔舌組織に発現する候補遺伝子2 mRNAの推移 (Genespring GX)



図5 作製された AAV ベクター

②同時に ISH 法における胎仔の mRNA の組織内発現画像データベース

(<http://www.eurexpress.org/ee/>) 上においてこれらの転写因子の舌粘膜・舌筋組織上の発現局在を確認した。

(2) AAV ベクターの作製と力価確認

エレクトロポレーション法に代わり AAV ベクターによる導入方法を試行した。それぞれの siRNA と蛍光タンパク質を同時に発現する AAV ベクター (pAAV-U6-ZsGreen1、AAVpro Helper system) を作製した。

(作製されたベクターの力価確認の過程で緑色蛍光 (図5) が観察された。力価は $1-4 \times 10^{10}/\text{ml}$ 程度であった。)

(3) 器官培養組織に代わる in vivo 胎仔組織への AAV ベクター導入の試行

この方法に関し、実験動物胎内の胎仔組織への Ex-ovo マイクロインジェクション法に関し島根大学解剖学教室の大谷 浩先生より技術指導を、ガラスニードル作製に関して榊ナリシゲの講習を受けた。ニードルプラー (Narishige 社 PC-10)、フォージ (同 MF-9) などの機器は本学現有のものを用い、ガラスニードル (図6b) を作製した。胎仔舌組織への注入は空圧式マイクロインジェクター (同 IM-11-2: 図6a) で羊膜外より胎仔の下顎ないし上顎部から舌組織に向かい数回刺入と注入を行った。AAV ベクターは微少マグネットビーズ試薬 (OZ Bioscience 社 in vivo ViroMag) と混合し、注入後に羊膜外より胎仔に向かいネオジウム磁石による磁力で試薬の移動と浸透拡散を試みた。なお術中の注入範囲視認のため色素 (緑色) も添加したが、胎内循環により色素は拡散し2日後、頭頸部に殆ど肉眼で識別できなくなった。例外的に眼部に色素が残留する例 (図7) が見られた。

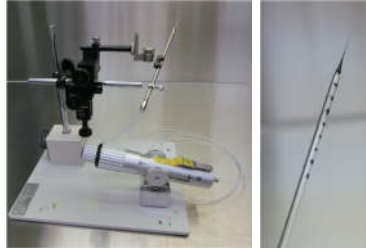


図6ab (a) マウス胎仔舌組織インジェクションシステム (Narishige) 全景
 (b) 注入用ガラスニードル先端の拡大図

(4) RNA 干渉 (RNAi) 施行後の胎仔組織の評価

候補1-3の胎仔舌粘膜組織を4%PFAで固定後、凍結切片を作製し、HE、抗 ZsGreen 抗体による免疫染色 (ABC 法)、K4、Lam3、CD34 による ISH 法の染色を行った。残念ながら Lam3、CD34 (ISH) の安定した染色像が今回得られなかった。候補1-3において注入部位に相当すると思われる抗 ZsGreen 抗体陽性像が舌粘膜や舌体組織に見られ (図8-11)、一部の上皮・上皮に変性を思わせる所見が認められたものの、対応する K4 発現所見などを得る事ができなかった。引き続き胎仔舌粘膜組織に今回の候補遺伝子による AAV ベクターによるトランスフェクションの試行を継続し、注意深く舌組織の精査を行いたい。

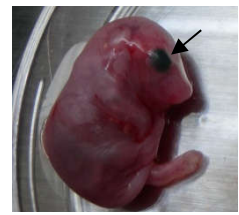


図7 上下顎部注入後、眼部に色素が残留 (矢印) した例

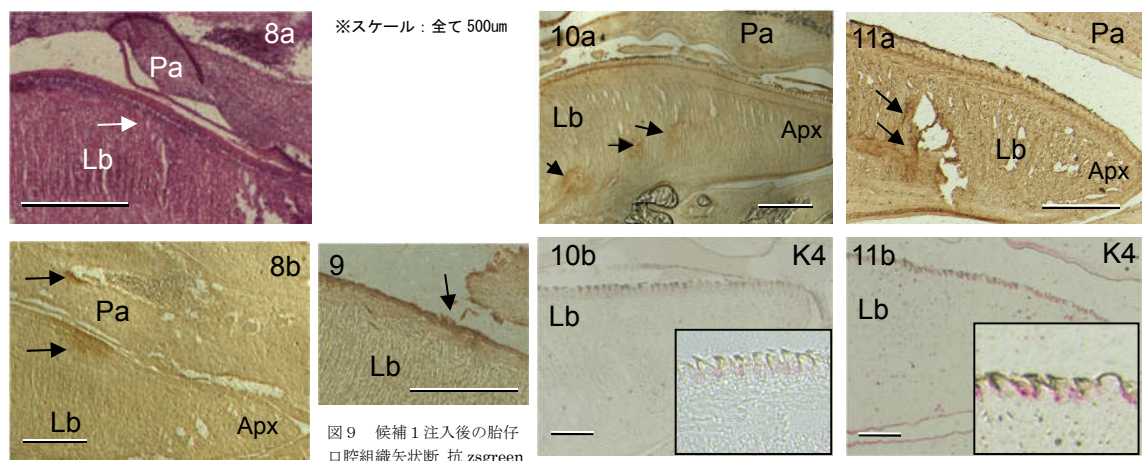


図8a,b 候補1注入2日後の胎仔口腔組織矢状断(a)HE染色、(b)抗 zsgreen 抗体免疫染色像。矢印: 刺入に相当する部位、Lb:舌体、Pa:口蓋(上顎)、Apx:舌尖
 図9 候補1注入後の胎仔口腔組織矢状断 抗 zsgreen 抗体免疫染色像。矢印の部の上皮・上皮に変性様の所見が認められる。Lb:舌体
 図10a,b 候補2注入後の胎仔口腔組織矢状断(a)抗 zsgreen 抗体免疫染色像。(b)K4ISH像。矢印: 刺入に相当する部位 Lb:舌体、Pa:口蓋(上顎)、Apx:舌尖
 図11a,b 候補3注入後の胎仔口腔組織矢状断(a)抗 zsgreen 抗体免疫染色像。(b)K4によるISH像。矢印: 刺入に相当する部位 Lb:舌体、Pa:口蓋(上顎)、Apx:舌尖

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

<p>1. 著者名 Yoshimura K, Nashida T, Mikami M, Kageyama I</p>	<p>4. 発行年 2017年</p>
<p>2. 出版社 Formatex Research Center</p>	<p>5. 総ページ数 734(11-17)</p>
<p>3. 書名 A simple electroporation method of green fluorescent protein-transfection and in vitro imaging of organ-cultured embryonic lingual tissue: In A. Mendez-Vilas Ed. Microscopy and imaging science: practical approaches to applied research and education</p>	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森田 貴雄 (Morita Takao) (20326549)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	