

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01601

研究課題名(和文) 分化機構解明による幹細胞の意図的誘導法の開発

研究課題名(英文) Study for elucidating induction mechanism of stem cells by manipulation molecule

研究代表者

大峽 淳 (Ohazama, Atsushi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40266169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,100,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞を利用した器官の再生にとって、幹細胞の標的細胞への人為的誘導は必須であるが、そのためには、幹細胞を予定細胞に分化させる制御メカニズムの解明が必要である。発生時における器官形成は、幹細胞の分化によって成し遂げられる。本研究では、舌、口蓋などの発生時における細胞の分化制御メカニズムを解明した。さらに、間葉組織における一次線毛分子であるOdf1が、舌の形成に関わる細胞の分化の制御を担っていることを見出し、幹細胞の分化に一次線毛が間接的に関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生療法には、幹細胞の制御メカニズムの解明が必須である。体が作られる発生時における知見が、その解明の鍵となる。本研究での成果は、器官発生時における制御メカニズムであり、再生療法確立に大きく貢献できると考えられる。さらに、一次線毛の機能不全は、繊毛病という疾患を引き起こす。本研究の成果は、繊毛病に対しての治療法開発などにも結びつく。

研究成果の概要(英文)：Regenerative therapy requires induction of stem cells to target cells. However, regulatory mechanism inducing target tissue-forming cells from stem cells should be elucidated for that purpose. Organ development is achieved by the differentiation of stem cells. We identified molecular mechanism of regulating stem cells in the tongue and palate development. Moreover, we found that Odf1 (primary cilia protein) in mesenchymal cells control differentiation of tongue-forming cells during tongue development, suggesting the possibility that the primary cilia indirectly regulate stem cell differentiation.

研究分野：発生生物学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞を利用した器官の再生にとって、「幹細胞の標的細胞への人為的誘導」は必須であるが、未だ、歯科領域の器官では達成されておらず、再生療法確立の見通しは立っていない。各器官は、決められた部位に確実に形成される。これは胎生期の幹細胞が正確に予定細胞に分化していることを意味し、その制御メカニズムが解明できれば、幹細胞を意図的に希望の器官へと分化させる事ができる。

2. 研究の目的

様々な角度から、幹細胞を意図的に希望の器官へと分化させるための幹細胞制御メカニズムを、器官発生における幹細胞の分化の解明からアプローチする。

3. 研究の方法

ターゲット器官を様々に設定し、その器官の発生過程における発現分子解析、遺伝子改変マウスによる解析、など様々な分子生物学的手法を用いた。

4. 研究成果

胎児期の細胞は、未分化な細胞が徐々に分化方向を決定し、ターゲットの組織を構築していく。組織として、舌と目蓋の類似性に着目した。両器官とも可動性を有し、筋肉を主たる構成組織として持つ器官である一方、その形成過程初期では、神経堤由来細胞と外胚葉由来細胞のみが原器に認められ、その後、それらと中胚葉由来細胞との相互作用で形成されると考えられている。舌と目蓋の形成過程における幹細胞の関連分子である Sox2 の発現を比較したところ、形成過程の舌原器上皮に Sox2 の発現を認める一方、形成中の目蓋原器に Sox2 の発現は認められなかった。

Oral facial digital type I (OFD1) 症候群は、舌、口蓋、歯、鼻、顎などの口腔/顔面領域の器官が、欠損、過剰、過誤腫などの多岐にわたる先天異常を示す疾患であり、Ofd1 が器官形成に不可欠である事を示唆している。近年、OFD1 症候群の原因遺伝子として OFD1 が発見された。口腔/顔面の器官の多くは、上皮と間葉の2つの組織の相互作用により形成されるため、申請者らは Ofd1 の機能解析として、まず上皮組織からのみ Ofd1 を欠損させたマウス (Ofd1^{fl/fl};K14Cre) を作成したが、顔面の器官にわずかな欠損が認められるに過ぎなかった。これは、Ofd1 の器官形成に関わる機能が上皮組織にないことを意味している。そこで、次に、間葉組織からのみ Ofd1 を欠損させたマウス (Ofd1^{fl/fl};Wnt1Cre) を作成した。Ofd1 は性染色体上にあるため、hemizygous マウスと heterozygous マウスの両方を検索した。その結果、heterozygous マウスの舌内に疎性組織 (矢尻; 図1) と異所性の骨 (矢印; 図1) という表現形を認めた。Hemizygous マウスには舌が存在しなかった (矢印; 図2)。舌内に認められた疎性組織と異所性の骨の解析のために、heterozygous マウスを精査した。

成体の舌のほとんどは、筋肉で構成され、その間にわずかな結合組織が存在する。舌の発生では、中胚葉由来細胞は、筋肉細胞へと分化する前に神経堤由来細胞と接触し、神経堤由来細胞から筋肉細胞への分化の誘導を受けることが報告されている (Han et al., Development. 2012;139:1640-1650)。残存



したわずかな神経堤由来細胞が、その後の結合組織へと分化していくと考えられている。heterozygous マウスの舌に認められる疎性組織が、神経堤由来組織であるのか、中胚葉由来組織であるのか知るために、*Ofd1^{fl/fl};Wnt1Cre* に R26R-GFP マウスを交配させ、*Ofd1^{fl/fl};Wnt1Cre;R26R-GFP* マウスを作成して確認したところ、疎性組織は中胚葉由来細胞で構成された組織であった(矢印; 図3)。一方で、*Ofd1* を中胚葉由来細胞から欠損させたマウスを *Mesp1Cre* を利用して作成したが、舌に異常は観察されず、中胚葉における *Ofd1* には、舌での機能がなくなることが示唆された。

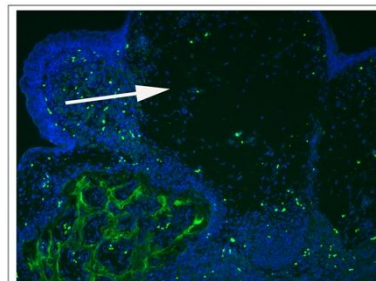


図3; *Ofd1* heterozygous マウスにおける神経堤由来細胞
Gfp:神経堤由来細胞

疎性組織は、組織学的

には脂肪に酷似している。しかし、脂肪マーカーである Adiponectin、Agt、Retn、Gpr64、Nnmt、Trim14 の発現は、ほとんど認められなかった。脂肪には、白色脂肪と褐色脂肪があり、前述の分子は白色脂肪で多く発現する分子である。褐色脂肪組織は、胎児や乳幼児に認められ、成長と共に消失していく。そこで、*Ofd1* の疎性組織が褐色脂肪組織であるか、褐色脂肪細胞の初期の分化マーカーである *Prdm16*、最終分化マーカーである *UCP1* の発現を確認したところ、いずれの分子の発現も認められた(図4、図5)。

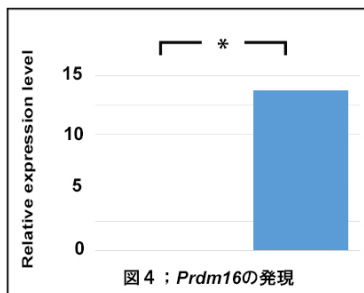


図4; *Prdm16* の発現

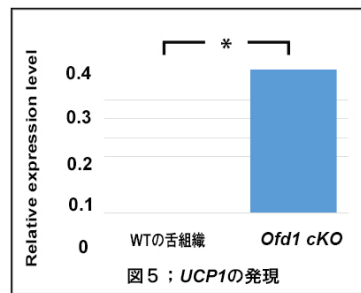


図5; *UCP1* の発現

褐色脂肪細胞も白色脂肪細胞と同様に、筋肉細胞と同一の細胞を由来とする。このことは、*Ofd1* 欠損マウスで認められた疎性組織は、本来筋肉へと分化する中胚葉細胞が、*Ofd1* を欠損した神経堤由来細胞と接することで、筋肉へと分化するための正しいシグナルを得ることができず、褐色脂肪細胞へと分化したことを示している。中胚葉由来細胞が、いつ、どこで神経堤由来細胞と接触し、分化のシグナルを受けるかは、複数のタイミングで段階的になされていると考えられている。我々は、中胚葉由来細胞が、下顎付近に到達した時点で、形態的な変化を有していることから、中胚葉由来細胞は、下顎付近への到着前に神経堤由来細胞からシグナルを得ていると考えた。中胚葉由来細胞がシグナルを受けるとされる部位の一つに、同時期に、中胚葉由来細胞と神経堤由来細胞が存在する hypoglossal cord がある。我々は、この hypoglossal cord の一部と *Osr2* の発現が重なることに注目し(図6)、*Osr2Cre* を使用して、*Ofd1* の欠損マウスを作成した。その結果、同様の疎性組織を認めた(図7)。hypoglossal cord には中胚葉由来細胞と神経堤由来細胞が存在するが、中胚葉由来細胞からの *Ofd1* 欠損で舌に異常は出ないことから、hypoglossal cord における神経堤由来細胞からの *Ofd1* 欠損により、疎性組織の形成が引き起こったことになる。このように、hypoglossal cord で中胚葉由来細胞は神経堤由来細胞からシグナルを受け、筋肉細胞へと分化することが示された。神経堤由来細胞で *Ofd1* が欠損した神経堤由来細胞は、筋肉細胞へと分化する予定であった中胚葉由来細胞への正しいシグナルを有していない。しかし、*Ofd1* は細胞質内にある一次線毛の基底小体に局在するため、他の細胞の誘導には何らかのシグナルを介在させる必要がある。そこで、*Ofd1* の下流にある分子の解析が必要となる。そこで、様々なシグナルの解析を行った。WT マウスの hypoglossal cord では、Hh シグナルの活性を共なった神経堤由来細胞が集積する。そこで、*Ofd1* homozygous マウスを確認したところ、hypoglossal cord での Hh シグナルのマーカーである *Ptch1* の発現が欠損していた。Heterozygous *Ofd1* では、この *Ptch1* の発現は、X-inactivation

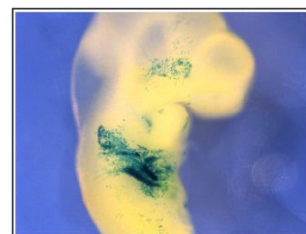
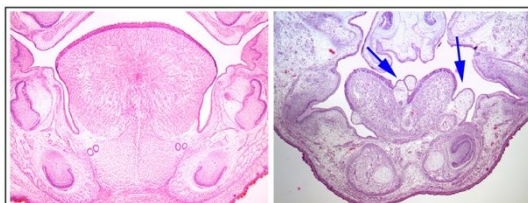


図6; *Osr2* の発現



正常マウス

Osr2Creによる
Ofd1 欠損マウス

図7; Hypoglossal cord におけるシグナル伝達

cord における神経堤由来細胞からの *Ofd1* 欠損により、疎性組織の形成が引き起こったことになる。このように、hypoglossal cord で中胚葉由来細胞は神経堤由来細胞からシグナルを受け、筋肉細胞へと分化することが示された。神経堤由来細胞で *Ofd1* が欠損した神経堤由来細胞は、筋肉細胞へと分化する予定であった中胚葉由来細胞への正しいシグナルを有していない。しかし、*Ofd1* は細胞質内にある一次線毛の基底小体に局在するため、他の細胞の誘導には何らかのシグナルを介在させる必要がある。そこで、*Ofd1* の下流にある分子の解析が必要となる。そこで、様々なシグナルの解析を行った。WT マウスの hypoglossal cord では、Hh シグナルの活性を共なった神経堤由来細胞が集積する。そこで、*Ofd1* homozygous マウスを確認したところ、hypoglossal cord での Hh シグナルのマーカーである *Ptch1* の発現が欠損していた。Heterozygous *Ofd1* では、この *Ptch1* の発現は、X-inactivation

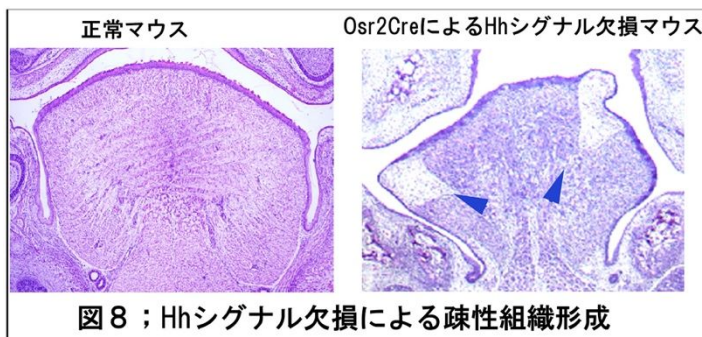


図8; Hhシグナル欠損による疎性組織形成

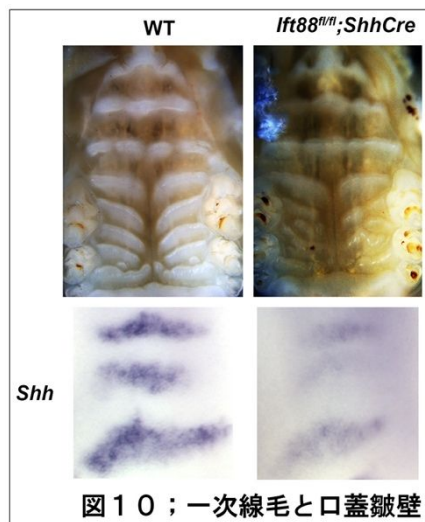
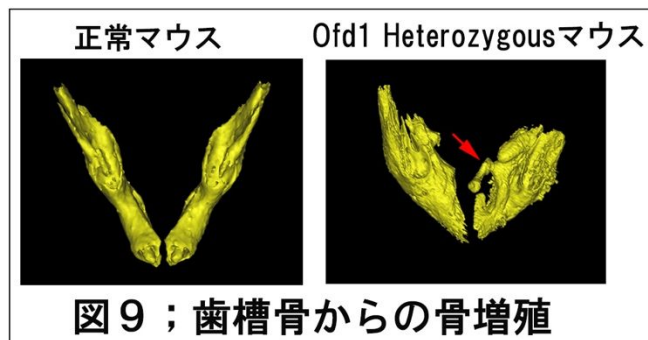
のために、モザイク 状を呈していた。神経堤由来細胞が中胚葉由来細胞に筋肉細胞への分化を促すのに、Hh シグナルが使用されているか検索するために、Osr2 発現細胞での Hh シグナルが欠損するマウスを作成し (Smo^{fl/fl};Osr2Cre) 検索したところ、Ofd1^{fl/fl};Wnt1Cre マウスに酷似した脂肪様組織が認められた (図 8)。この様に、神経堤由来細胞の Ofd1 は、Hh シグナルを通して、中胚葉由来細胞を筋肉細胞へと分化誘導している

ことが示された。一方、Ofd1 Heterozygous マウスの舌には、正常な筋肉組織も認められる。Ptch1 がモザイクな発現を示したように、Ofd1 Heterozygous マウスの hypoglossal cord に存在する神経堤由来細胞には、Ofd1 が欠損し Hh シグナルが欠落した神経堤由来細胞と、Ofd1 が存在し Hh シグナルを有した神経堤由来細胞が混在し、Ofd1 が欠損し神経堤由来細胞と接した中胚葉由来細胞は褐色脂肪細胞へ、Ofd1 が存在する神経堤由来細胞と接した中胚葉由来細胞は筋肉細胞へと分化することが示唆された。

Ofd1 欠損マウスの舌に認められた異所性の骨は、下顎骨の形成の際に Ofd1 の欠損によって極性を失った骨芽細胞の異常な方向への増殖によるもので (図 9) 神経堤由来細胞などの分化の異常によるものではなかった。

一方、口蓋皺壁にも幹細胞が存在することが知られている。一次線毛と口蓋皺壁との関連性を検索するために、Ofd1 とは違い常染色体上に存在する別の一次線毛タンパクである Ift88 の欠損マウスを作成した。マウス口蓋皺壁は、規則正しい配列を示すが、If88 欠損マウスでは、配列に大きな乱れが生じ、Hh シグナルの低下も確認された (図 10)。

このように、一次線毛の解析から、細胞分化誘導のメカニズムの解明が可能であることが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Supaluk Trakanant, Jun Nihara, Maiko Kawasaki, Fumiya Meguro, Akane Yamada, Katsushige Kawasaki, Isao Saito, Maeda Takeyasu, Atsushi Ohazama	4. 巻 62
2. 論文標題 Molecular Mechanisms in Palatal Rugae Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Bioscience	6. 最初と最後の頁 30-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2019.12.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Ryuichi, Kawasaki Maiko, Kawasaki Katsushige, Yamada Akane, Trakanant Supaluk, Meguro Fumiya, Kitamura Atsushi, Kudo Takehisa, Maeda Takeyasu, Ohazama Atsushi	4. 巻 2018
2. 論文標題 Sox Genes Show Spatiotemporal Expression during Murine Tongue and Eyelid Development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Dentistry	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2018/1601363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mayuko Nakaniwa, Maiko Kawasaki, Katsushige Kawasaki, Akane Yamada, Fumiya Meguro, Maeda Takeyasu, Atsushi Ohazama	4. 巻 34
2. 論文標題 Primary Cilia in Murine Palatal Rugae Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene Expression Patterns	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gep.2019.119062.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kawasaki M, Kawasaki K, Ohazama A
2. 発表標題 The Role of Primary Cilia in Mandibular Development
3. 学会等名 International Niigata-Taiwan Universities collaborative dental research symposium（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	佐伯 万騎男 (Saeki Makio) (30273692)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	前田 健康 (Maeda Takeyasu) (40183941)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	川崎 真依子 (Kawasaki Maiko) (40584587)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	
研究分担者	泉 健次 (Izumi Kenji) (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	齊藤 一誠 (Saito Issei) (90404540)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	