

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08520

研究課題名(和文) 発生初期の唾液腺上皮を未分化状態に維持する間葉からのマイクロRNAシグナル

研究課題名(英文) MicroRNA transport from salivary mesenchyme regulates epithelial cytodifferentiation 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多くの器官発生において、器官特有の形態と機能の確立に上皮間葉相互作用が必須です。我々は顎下腺の間葉から上皮へとマイクロRNAが輸送されていることを見出し、この「マイクロRNAシグナル」が顎下腺の機能的分化のタイミングを調整していると仮説を立てました。その結果、分化に影響を与える因子の発現が、間葉から上皮に輸送されるマイクロRNAによって調節されることが示唆されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

器官発生メカニズムの全貌は未だ明らかになっていません。異なる組織間での相互作用は、従来タンパク質にだけ着目されてきました。そのような中、私たちは短い核酸(マイクロRNA)が組織間相互作用を仲介することを明らかにしてきました。その研究結果を踏まえ、未熟な器官が機能的に成熟していく過程(分化と言います)に着目したところ、組織間マイクロRNA輸送が分化のタイミングを調節していることが示唆されました。器官再生などの研究分野に新たなアプローチを提供するものです。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal interactions are required for normal development in organs. We reported that gene expression in epithelium was regulated by microRNAs that are enriched in exosomes from mesenchyme in fetal mouse submandibular gland (SMG). Thus, we hypothesized in this study that "the microRNA signals between tissues" regulate cytodifferentiation during SMG development. Analyses of gene and protein expression using both immunostainings and qPCR suggested that spatio-temporal patterns of enzymes required for cytodifferentiation were regulated in part by the microRNAs imported from the SMG mesenchyme.

研究分野：解剖学

キーワード：顎下腺 マイクロRNA 分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な器官の発生では、上皮と間葉が互いに働きかけあい器官特有の機能が確立されます。胎生期のマウス唾液腺（顎下腺）は上皮と間葉の分離が可能のため（図1）、それら組織の相互作用を研究する際のモデル器官として知られています。

マウス唾液腺の上皮は、胎生13日齢（E13）以降、枝分かれを繰り返し形態形成が進行します。一方、上皮の分化が始まるのはE15であり、この時期を境に唾液産生能に関連した遺伝子群が劇的に発現します。

なぜE15を境に分化が始まるのでしょうか？研究代表者はゲノムDNAの塩基配列の修飾によって遺伝子発現を調節する仕組み（いわゆるエピジェネティクス）に着目しました。

一般にシトシン塩基のメチル化は遺伝子発現の抑制に、脱メチル化は促進に関与し、「遺伝子発現スイッチのOFFとON」とも言えます。予備実験を実施し、胎仔マウス唾液腺上皮のメチル化と脱メチル化のパターンを調べたところ、予想通りE15において脱メチル化の著しい亢進を見出しました。このことは脱メチル化により発現する遺伝子が劇的に変化、つまり「分化のスイッチがOFFからON」へと切り替わったことを示唆しています。

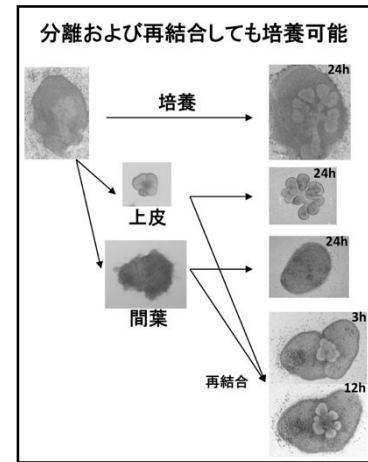


図1. 胎生13日齢の胎仔マウス唾液腺

E15に脱メチル化が生じる（分化が始まる）ということは、E13-14では脱メチル化が抑制され未分化状態が維持されているとも言えます。そこで、発生初期に誤って分化しないよう、間葉から上皮への何らかのシグナルが脱メチル化を妨げているのではないかと仮説を立てました。

近年、様々な細胞が分泌する細胞外小胞に、マイクロRNAが内包されていることが分かっています。マイクロRNAとは蛋白質をコードしないRNAの一種で、複数のメッセンジャー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るとも言われています。研究代表者は、胎仔マウス唾液腺の間葉から上皮へマイクロRNAが輸送されることを突き止め、「マイクロRNAは組織間のmobile signal」であることを報告しました（Hayashi et al., Dev. Cell, 2017）。胎仔マウス唾液腺の間葉で作られたマイクロRNAが、「マイクロRNAシグナル」として、隣接する上皮へと輸送されることから、発生初期（E13-E14）において、上皮の分化（脱メチル化）を抑制している可能性があります。

### 2. 研究の目的

胎仔マウス唾液腺上皮は、なぜ発生初期に分化しないのでしょうか？上皮の分化はゲノムDNAの劇的な脱メチル化を伴うという予備実験の結果を踏まえ、発生初期の上皮が未分化状態を維持するための「間葉からのマイクロRNAシグナル」を特定します。そのために本研究計画では以下の点を明らかにすることを目的としました。

- (1) 上皮において脱メチル化を担う酵素の同定と、発現パターンの解明
- (2) 脱メチル化酵素を標的とするマイクロRNAの特定と、その輸送パターンの解明

### 3. 研究の方法

#### (1) 上皮において脱メチル化を担う酵素の同定と、発現パターンの解明

胎生15日齢（E15）で脱メチル化を担う酵素を特定します。シトシン塩基を脱メチル化する酵素は、ten-eleven-translocation (TET) ファミリー（3種類の遺伝子 *Tet1*, *Tet2*, *Tet3*）が知られています。

##### 方法1: 定量PCRによるTET遺伝子の検出と発現パターンの解明

E13-E16の胎仔マウス唾液腺からTotal RNAを抽出してリアルタイム定量PCRを実施しました。PCRプライマーは各TET遺伝子に特異的なものを用いました。

##### 方法2: 免疫染色によるTET蛋白質の検出と発現パターンの解明

胎仔マウス唾液腺を用い免疫染色法を実施します。各TET蛋白質に特異的な抗体を使用しました。作成した試料は共焦点レーザー顕微鏡にて観察しました。

#### (2) 脱メチル化酵素を標的とするマイクロRNAの特定と、その輸送パターンの解明

予備研究により、間葉から上皮へと輸送されるマイクロRNAは81種類です。この中から脱メ

チル化酵素の遺伝子 TET1-3 を標的とする種類をバイオインフォマティクスなどで絞り込みました。また、絞り込んだマイクロ RNA の阻害剤を用いることで、TET 遺伝子の発現レベルが誘導されるかどうかを調べました。また、間葉から上皮へ輸送されたマイクロ RNA が、上皮のどの領域に存在しているのかを *in situ* hybridization で調べました。

#### 方法 1: マイクロ RNA の標的予測プログラム

マイクロ RNA はメッセンジャー RNA (遺伝子) に相補的に結合します。従って、各 TET 遺伝子を標的としうるマイクロ RNA を塩基配列に基づいて予測しました(プログラムは「TargetScan」)。

#### 方法 2: マイクロ RNA の阻害下で上皮の分化誘導

TET 遺伝子を標的としうるマイクロ RNA は、E13 の唾液腺上皮にすでに輸送されていると考えられます。従って、この唾液腺上皮をマイクロ RNA 阻害下で培養すれば、脱メチル化が進行し分化が誘導されると考えられます。TET 遺伝子を標的とするマイクロ RNA に対して、相補配列を有する阻害 RNA を、RNA 干渉法にて唾液腺上皮に導入しました。培養後に定量 PCR を実施し、TET 遺伝子発現レベルの変動などを調べました。

#### 方法 3: マイクロ RNA の *in situ* hybridization

上皮に輸送されたマイクロ RNA の局在を調べました。顎下腺の凍結切片を用意し、特異性と安定性を高めた probe を用いて *in situ* hybridization を実施しました。マイクロ RNA は短鎖 (20 塩基程度) なので、検出シグナルを増大させる tyramide 増感法も組み合わせ併用しました。

## 4. 研究成果

### (1) 上皮において脱メチル化を担う酵素の同定と、発現パターンの解明

胎仔マウス顎下腺に発現している TET の種類、発現パターン、局在などは現在までに報告がありません。したがって、*Tet1/2/3* に対して、定量 PCR と免疫染色を実施しました。定量 PCR の結果、*Tet1* は E12 から以降の発生期にかけて次第に発現レベルが低下していく傾向がありました。*Tet2* は発生期を通じて発現レベルに大きな変化はないことが示唆されました。*Tet3* は E12-E16 までの発現レベルは変動が少ないものの、E17 以降に発現レベルが低下することが示唆されました。

免疫染色の結果、TET1 は上皮組織に一樣に局在するのではなく上皮の部位によって発現レベルに差が見られました。TET2 は上皮全体に一樣に発現しているものの、E15 前後に発現レベルが変動することが示唆されました。TET3 は E12-E16 にかけては発現レベルに大きな違いはないものの、E17 になると発現レベルが低下していることが示唆されました。

胎仔マウス顎下腺の上皮には *Tet1/2/3* 遺伝子がすべて発現しており、それらの発現レベルや局在は発生が進むにつれて変動する場合があることが示唆されました。TET2 に関しては定量 PCR と免疫染色の結果に相違があることが示唆され、TET2 遺伝子が転写後に何らかの調節機構によってタンパク質発現が制御されている可能性があります。また、間葉から輸送されるマイクロ RNA によって上皮の TET 発現が抑制されていると仮定した場合、上皮に一樣には局在していなかった TET1 がマイクロ RNA の標的となっている可能性が考えられました。

### (2) 脱メチル化酵素を標的とするマイクロ RNA の特定と、その輸送パターンの解明

間葉から上皮に輸送されるマイクロ RNA 81 種類のうち、どのマイクロ RNA が TET を標的遺伝子としうるのか? まず、細胞外小胞から検出された際のデータから、含有量の多いマイクロ RNA を 10 種類リストアップしました。その後、TargetScan で標的遺伝子を予測したところ、10 種類のマイクロ RNA のうち 5 種類が TET を標的としうるということが明らかになりました。以降の実験では、そのうち特に小胞内に多く含まれていることが示唆された 3 種類 (マイクロ RNA-I, マイクロ RNA-II, マイクロ RNA-III とする) について着目することにしました。

マイクロ RNA-I, II の働きを阻害する人工核酸を用意し、顎下腺上皮を単独培養する際に培養液へ添加しました。培養後、TET 遺伝子の発現レベルの変動を定量 PCR によって対称群と比較しました。その結果、マイクロ RNA の働きを阻害した系では TET 遺伝子の発現レベルが上昇していることが示唆されました(図 2)。この結果から、顎下腺上皮の TET 発現は間葉からのマイクロ RNA によって抑制されていることが示唆されました。

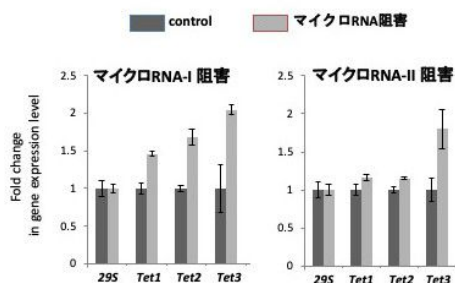


図 2. 顎下腺上皮のマイクロ RNA 阻害時の定量 PCR 結果. TET 遺伝子について示した.

これらのマイクロ RNA は上皮に輸送されたのち、上皮のどの部位に局在しているのでしょうか？例としてマイクロ RNA-III について *in situ* hybridization を実施しました。その結果、間葉と接している上皮組織の辺縁で、より強い検出シグナルが観察されました。このことは、間葉から上皮にマイクロ RNA が輸送されているというこれまでの知見を補強するデータであるとともに、上皮組織辺縁での上皮細胞のふるまいを調節していることを示唆しています。今回はマイクロ RNA-III の一種類だけの局在を明らかにしましたが、マイクロ RNA-I, II のほか他のマイクロ RNA についても *in situ* hybridization を実施し、それらの局在の違いを明らかにする予定です。

### (3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望など

従来、唾液腺の発生において研究されてきたシグナル分子はタンパク質でした（例：細胞成長因子とその受容体）。そのような中、唾液腺の間葉や上皮のマイクロ RNA に着目してきた経験を活かし（Hayashi et al. *Dev. Biol.*, 2011, Rebustini, Hayashi et al., *Development*, 2012）、タンパク質以外、つまり核酸のマイクロ RNA による上皮と間葉の相互作用に着目しています。

上皮と間葉との相互作用で発生が進行する器官は多くあります。顎下腺をモデルとし、機能的分化のタイミングを制御する上皮間葉相互作用をマイクロ RNA の観点から明らかにしていきます。また、最終年度において口腔上皮に高発現している遺伝子がマイクロ RNA によって抑制されている可能性も見出しました。つまり間葉から上皮へと輸送されるマイクロ RNA は、顎下腺上皮には必要のない口腔上皮の遺伝子群を抑制している可能性があり、この点についても今後調べていく予定です。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Toru Hayashi and Matthew P. Hoffman	4. 巻 14
2. 論文標題 Exosomal microRNA communication between tissues during organogenesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 RNA Biology	6. 最初と最後の頁 1683-1689
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15476286.2017.1361098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Masanori Kashimata and Toru Hayashi	4. 巻 54
2. 論文標題 Regulatory mechanisms of branching morphogenesis in mouse submandibular gland rudiments	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 2-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2017.06.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林徹、門谷裕一
2. 発表標題 胎仔マウス顎下腺の脱メチル化シトシンと脱メチル化酵素の発現解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林徹
2. 発表標題 胎仔マウス顎下腺の発生における脱メチル化制御機構
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林徹
2. 発表標題 胎仔マウス顎下腺の発生における脱メチル化制御機構
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----