

令和元年6月13日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17088

研究課題名(和文)唾液腺初期発生におけるSox9転写制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Analysis of transcription regulation of Sox9 in salivary gland development

研究代表者

田中 準一 (Tanaka, Junichi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：40710166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Sox9は発生期において様々な組織の発生に関与しているが、唾液腺発生におけるSox9の制御因子については十分解析されていない。本研究では胎生期唾液腺を用いてSox9のChIP-seqを行い、Sox9の転写制御機構について解析を行った。ChIP-seqでは760領域のSox9結合領域が検出された。結合領域にはSox dimer motifが濃縮されており、GO解析の結果からその近傍遺伝子には上皮管腔形成に関わる遺伝子が多く含まれていた。また遺伝子発現プロファイルとの比較では、これまで唾液腺形態形成に関与すると考えられていた複数の遺伝子がSox9の制御下にある可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで唾液腺発生研究については分枝形態形成メカニズムについて多くの報告がなされており、初期発生については不明な点が多かった。本研究でSox9は唾液腺においても組織特異的な結合領域を持つことで下流の遺伝子発現を制御し発生過程における細胞分化を制御している可能性が考えられた。Sox9に着目した詳細な解析を進めSox9の作動様式を解明することで唾液腺発生メカニズムの解明が可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sox9 regulates many developmental processes. To identify genes that are regulated by Sox9 in salivary gland development, we performed Sox9 ChIP-seq in embryonic salivary gland. A total of 760 regions were detected as Sox9-associated genomic regions. Gene ontology analysis using Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool showed that Sox9 peaks were significantly associated with genes related to epithelial tube formation. To confirm the integrity of Sox9 ChIP-seq analysis, we performed de novo motif analysis using whole Sox9 peaks. The consensus Sox dimer motif was identified as the top enriched motif. This motif was mapped to 45% of all Sox9 peaks. Moreover, fifty genes overlapped between those up-regulated according to RNA-seq in embryonic salivary gland. In addition, several overlapping genes were involved in these exocrine glands' development.

研究分野：発生、再生

キーワード：唾液腺 Sox9 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 唾液腺発生研究

マウス唾液腺は胎生 11.5 日に口腔粘膜の肥厚に始まり、その陥入・伸長・分枝により唾液腺が形成される。本発生過程においては、原基形成後の分枝形成に関わる因子(FGF10 等)に関する報告はあるが、初期の口腔粘膜上皮の肥厚に関わる因子についての報告はない。我々はこれまでの研究で Sox9 が唾液腺原基形成初期から原基特異的に発現し唾液腺発生に関与している可能性を明らかにしてきた。また唾液腺にきわめて類似した組織である涙腺においては、Sox9 が上皮の陥入に必須であるという報告がなされた(Development 13:2691-701. 2014)。これらのことから、唾液腺発生過程においても Sox9 の関与が想定されるが、Sox9 は軟骨分化を誘導するなどその機能は多彩であり、単独で唾液腺分化を誘導しているとは考えにくい。

(2) 発生期における Sox9

軟骨のみならず小腸、肝臓、膵臓、涙腺など外分泌腺を含む複数の組織発生で Sox9 の関与が報告されている。腸管や膵臓においては発生初期より未分化の上皮細胞に広く Sox9 の発現を認め、細胞系譜解析によると出生時にすべての腸管細胞、および内分泌細胞と外分泌細胞を含むすべての膵細胞が標識されることが報告された(Nat Genet. 43:34-41. 2011)。軟骨組織において Sox9 は転写複合体を形成することで Col2a1 のエンハンサーに結合し II 型コラーゲンの産生を誘導することが報告されている(Nat Commun.2:251. 2011)。これらの報告より Sox9 は組織発生において多くの機能を担っておりその制御因子によって臓器の特異性を規定している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

Sox9 の作動様式については胎生期軟骨組織の Sox9 のクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)が行われ、Sox9 は軟骨組織特異的な結合領域をもち軟骨組織特異的な遺伝子群の発現を誘導していることが報告された(Cell Rep 12(2):229-243. 2015)。

このことから Sox9 は唾液腺においても組織特異的な結合領域を持つことで下流の遺伝子発現を制御し発生過程における細胞分化を制御している可能性が考えられる。従って唾液腺における Sox9 の作動様式を解明することで唾液腺発生メカニズムの解明が可能となる。

3. 研究の方法

(1) Sox9 に対する ChIP-seq と RNA-seq

マウス胎生 13.5 日の唾液腺原基において Sox9 に対するクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)を行い、マウス胎生 13.5 日の①唾液腺原基上皮部分②口腔粘膜③唾液腺原基間質の RNA-seq による遺伝子発現プロファイルと比較する。Sox9 結合領域近傍遺伝子でさらに唾液腺原基上皮部分に特異的に発現する遺伝子群の絞込みを行い、「Sox9 の制御をうけ唾液腺分化を誘導する候補遺伝子」を抽出する。

(2) 候補遺伝子の発現解析

(1)で抽出された候補遺伝子について胎生期唾液腺原器での発現および局在を明らかにする。既に解析を行っている Sox9 の局在と類似する因子について解析をすすめる。

4. 研究の成果

(1) Sox9 の局在解析

唾液腺発生期における各段階について FISH および蛍光抗体法を用いて Sox9 の局在を確認した。Sox9 は胎生期においては唾液腺上皮細胞のほぼ全ての細胞に発現し、その後介在部導管および腺房細胞に発現することが示された(図1)。

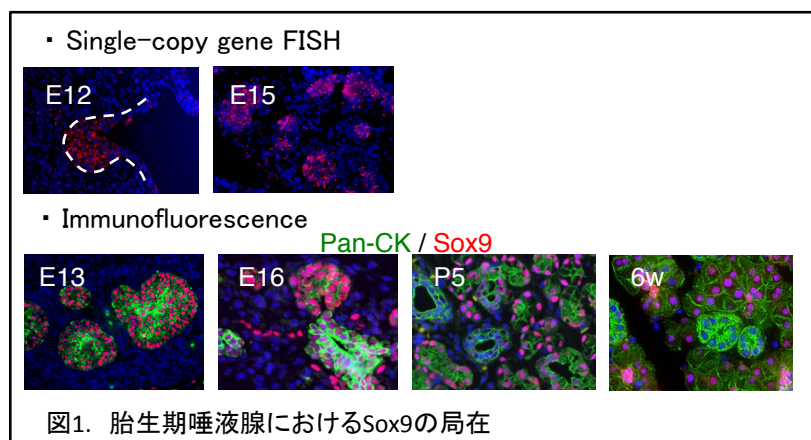


図1. 胎生期唾液腺におけるSox9の局在

(2) Sox9 結合領域の解析

胎生 13.5 日マウス唾液腺原器の Sox9 に対する ChIP-seq を行った。ChIP-seq には胎生 13.5 日マウス唾液腺原器を酵素処理により分散化し 5×10^6 個の細胞を用いた。データ解析には CisGenome での解析を行い FDR 0.01 以上の 760 領域が peak として検出した。検出された peak には Sox9 の上流に位置する SOM region と呼ばれる Sox9 結合領域の peak が含まれ Sox9 結合領域が濃縮されていることが明らかとなった。

また、Sox9 の結合領域には Sox dimer motif が有意に濃縮されており、検出した peak の約 45% に含まれ Sox9 の直接的な結合が示唆された (図 2)。

さらに peak 近傍遺伝子の GO 解析の結果からは腺組織の形態形成に関わる遺伝子群が有意に濃縮されており Sox9 が唾液腺形態形成に関わる転写因子である可能性が示唆された (図 3)。

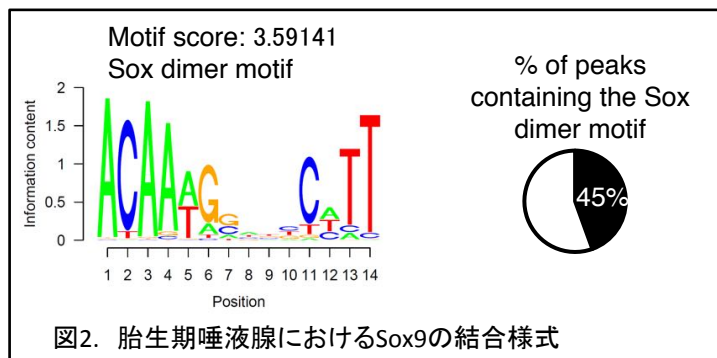


図2. 胎生期唾液腺におけるSox9の結合様式

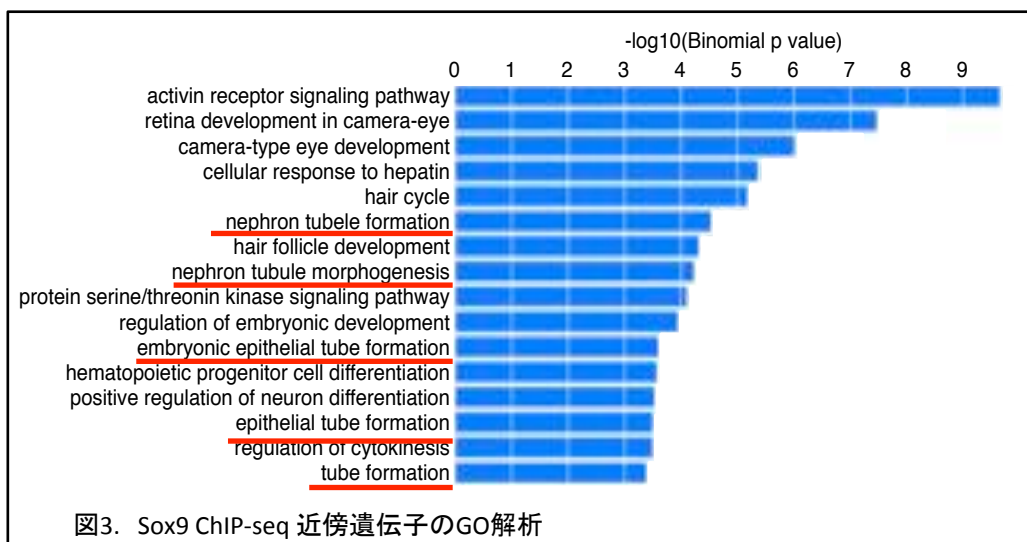


図3. Sox9 ChIP-seq 近傍遺伝子のGO解析

また、ChIP-seq の結果と、胎生 13.5 日マウス唾液腺原基上皮部分と唾液腺原基周囲間葉組織と口腔粘膜の 3 領域の RNA-seq による発現プロファイルの比較を行い Sox9 の制御遺伝子についても検討を行った。ChIP-seq で検出された peak の近傍遺伝子と、RNA-seq で唾液腺原基特異的に発現する遺伝子 (RPKM 5 以上 Fold change 3 以上) を候補遺伝子群として抽出した。抽出された遺伝子群の中には Etv5 や Spry2 などこれまで唾液腺形態形成に重要な遺伝子であることが報告されている遺伝子が含まれ、これらの遺伝子が Sox9 の制御を受けている可能性が示された。

今後の研究の展開としては、胎生期唾液腺の器官培養を用いて Sox9 の制御遺伝子を候補遺伝子から絞込み Sox9 転写ネットワークについて解析を進める。また上記の知見を活かして胎生期口腔粘膜への遺伝子導入による唾液腺分化誘導についても検討を重ねる予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kato M, Tanaka J, Aizawa R, Yajima-Himuro S, Seki T, Tanaka K, Yamada A, Ogawa M, Kamiyo R, Tsuji T, Mishima K, Yamamoto M: Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy. Sci Rep, 2019; 21;9(1):7640. (査読有り)
2. Aizawa R, Yamada A, Seki T, Tanaka J, Nagahama R, Ikehata M, Kato T, Sakashita A, Ogata H, Chikazu D, Maki K, Mishima K, Yamamoto M, Kamiyo R: Cdc42 regulates cranial suture morphogenesis and ossification. Biochem Biophys Res Commun, 2019; 30;512(2):145-149. (査読有り)
3. Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Takamatsu K, Irié T, Fukada T, Sakai T, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba Tsuji T, Mishima K: Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. Nat Commun, 2018; 11;9(1):4216. (査読有り)
4. Seki T, Aizawa R, Tanaka J, Yajima-Himuro S, Kato M, Tanaka K, Mishima K, Yamamoto M: Establishment of mouse gingival junctional epithelial cell line using a bioengineered tooth system. Biochem Biophys Res Commun, 2018; 497(1):167-72. (査読有り)
5. Hoshino M, Kaneko K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Suzuki D, Akaike T, Sawa T, Ida T, Fujii S, Ihara H, Tanaka J, Tsukuura R, Chikazu D, Mishima K, Baba K, Kamiyo R: 8-Nitro-cGMP promotes bone growth through expansion of growth plate cartilage. Free Radic Biol Med, 2017; 110:63-71. (査読有り)

〔学会発表〕（計 12 件）

1. 田中準一. オルガノイド技術を用いたマウス ES 細胞由来唾液腺組織の誘導. (第 4 回口腔医学科学フロンティア, 長野, 2019 年 3 月)
2. 田中準一, 北條宏徳, 安原理佳, 鯨岡聡子, 行森茜, 大庭伸介, 美島健二. 唾液腺発生における Sox9 の転写制御ネットワーク機構. (第 108 回日本病理学会総会, 東京, 2019 年 5 月)
3. 田中準一, 小川美帆, 北條宏徳, 馬渕洋, 安原理佳, 鯨岡聡子, 行森茜, 大庭伸介, 辻孝, 美島健二. 同所移植可能なマウス ES 細胞由来唾液腺オルガノイドの誘導. (第 18 回再生医療学会総会, 神戸, 2019 年 3 月)
4. 田中準一, 小川美帆, 安原理佳, 鯨岡聡子, 行森茜, 高松弘貴, 辻孝, 美島健二. オルガノイド技術を用いたマウス ES 細胞由来唾液腺組織の誘導. (第 2 回がん三次元培養研究会, 東京, 2018 年 11 月)
5. 田中準一, 小川美帆, 安原理佳, 高松弘貴, 辻孝, 美島健二. 転写因子を用いたマウス ES 細胞由来唾液腺組織の誘導. (第 107 回日本病理学会総会, 北海道, 2018 年 6 月)
6. Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Mabuchi Y, Yasuhara R, Takamatsu K, Ohba S, Tsuji T, Mishima K : Generation of functional salivary gland organoid from mouse embryonic stem cells. (International Society for Stem Cell Research (ISSCR) annual meeting, June 2018, Melbourne)
7. 田中準一, 小川美帆, 北條宏徳, 中村史郎, 波多賢二, 馬渕洋, 安原理佳, 西村理行, 井上富雄, 大庭伸介, 斎藤一郎, 辻孝, 美島健二. マウス ES 細胞を用いた 3 次元唾液腺組織の分化誘導. (第 17 回再生医療学会総会, 横浜, 2018 年 3 月)
8. 田中準一, 中村史郎, 安原理佳, 井上富雄, 美島健二. 自己組織化技術を用いたマウス ES 細胞由来 3 次元唾液腺組織の誘導. Self-formation of salivary gland tissue from mouse embryonic stem cells. (第 62 回日本唾液腺学会学術集会, 東京, 2017 年 12 月)
9. 田中準一, 大庭伸介, 北條宏徳, 馬渕洋, 安原理佳, 入江太朗, 美島健二. 唾液腺発生における機能的転写因子の同定. (第 28 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 埼玉, 2017 年 11 月)
10. Tanaka J, Ohba S, Hojo H, Mabuchi Y, Yasuhara R, Irie T, Mishima K : SOX9 IS A KEY TRANSCRIPTION FACTOR OF SALIVARY GLAND DEVELOPMENT. (International Society for Stem Cell Research (ISSCR) annual meeting, June 2017, Boston)
11. 田中準一, 大庭伸介, 北條宏徳, 馬渕洋, 安原理佳, 入江太朗, 福島美和子, 河野葉子, 美島健二. 唾液腺発生における転写因子の機能解析. (第 17 回抗加齢医学会総会, 東京, 2017 年 6 月)
12. 田中準一, 大庭伸介, 北條宏徳, 馬渕洋, 安原理佳, 入江太朗, 福島美和子, 河野葉子, 美島健二. 唾液腺初期発生における転写因子の機能解析. (第 106 回日本病理学会総会, 東京, 2017 年 4 月)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。