

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K17359

研究課題名(和文) 歯胚再生技術を用いたGFP陽性接合上皮細胞における機能的転写因子の同定

研究課題名(英文) Identification of functional transcription factor in mouse gingival junctional epithelial cell using a bioengineered tooth system

研究代表者

氷室 沙羅 (Himuro, Sara)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90736513

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)：マウス再構成歯胚技術を用いて、GFP陽性の接合上皮を作製した。再構成歯周囲の接合上皮細胞をフローサイトメトリーにて回収、RNAシーケンスを用いて遺伝子解析を行った。GFP陽性接合上皮細胞の遺伝子発現は天然の接合上皮のものと同様であった。回収したGFP陽性接合上皮細胞にレンチウイルスを用いてSV40 large T抗原を導入し、GFP陽性接合上皮不死化細胞株を樹立した。樹立した細胞株は、20継代を経ても増殖し、ガラクトシダーゼ活性を用いた分析でも細胞老化を起こさなかった。また、遺伝子発現も天然の接合上皮と同様であった。以上のことより、不死化GFP陽性接合上皮細胞株の樹立に成功したと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

接合上皮は歯周病の起始点となる重要な組織でありながら、今まで、接合上皮細胞株が樹立されていなかった。今回、天然の接合上皮株と遺伝子発現パターンが酷似した不死化GFP陽性接合上皮株を樹立したことにより、in vitroの接合上皮細胞の研究が進むことが予想され、歯周病発症の機序の解明に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in isolating JE cells expressing green fluorescent protein (GFP) by using a bioengineered tooth technique in mice. The gene expressions of GFP-positive JE cells, isolated from around the erupted bioengineered teeth using flow cytometry, were analyzed by RNA sequencing. GFP-positive cells derived from the bioengineered tooth germs showed similar gene expression patterns to primary JE cells. The isolated GFP-positive JE cells were immortalized by transducing the simian virus 40 large T antigen using lentiviral vectors. The established GFP-positive JE cells maintained proliferative activity for more than 20 passages, and did not show cellular senescence as demonstrated by β -galactosidase assay. These cells also expressed similar gene expression patterns to primary JE cells. The established cell lines may prove useful for future investigation of JE characteristics in vitro.

研究分野：歯周病学

キーワード：接合上皮

1. 研究開始当初の背景

歯周病の起始点に位置する接合上皮細胞は、エナメル質近傍の極めて狭い空間に位置する上、非常に細胞数が少ないため、生体から接合上皮のみを取り出して培養することは困難で、研究は主として形態学的・組織学的研究に委ねられているのが現状であった。我々が過去に行った研究から、再構成歯胚技術を用いて歯源性上皮由来である接合上皮を GFP で標識出来るようになり、これまでその単離が困難とされてきた接合上皮を GFP の発現を指標に正確に単離することが可能となった。さらに我々は、GFP で標識した接合上皮を分離回収し、その網羅的遺伝子解析を行い、その発現パターンが、天然の接合上皮と極めて酷似することを突き止めた。

2. 研究の目的

GFP 陽性接合上皮細胞株の樹立を遂行し、その機能的転写因子を同定する。

3. 研究の方法

マウス接合上皮細胞における機能的転写因子の同定のため、下記の項目を行うことを計画した。

- (1) GFP で標識された接合上皮の作製とその単離を行う。
- (2) 酵素処理を用いた接合上皮細胞の分散化を行う。
- (3) フローサイトメトリーを用い、GFP 陽性接合上皮細胞の採取する。
- (4) SV40T 抗原を導入し、不死化細胞株を樹立する。Limiting dilution を用いて single cell clone を作製する。
- (5) RNA シークエンスを用いて、遺伝子発現を比較検討する。さらに in vivo の接合上皮細胞、口腔上皮細胞と樹立した接合上皮細胞、口腔上皮細胞の発現プロファイルを用いてクラスタリング解析を行い、character が保持されているか確認する。
- (6) 接合上皮細胞の機能解析として、3D 再構成培養法を用いた組織再構築能の解析と Endothelium を用いた物質透過性の解析を行う。

4. 研究成果

GFP 陽性不死化接合上皮細胞株の樹立を、下記の手順で行った。

- (1) GFP で標識された接合上皮の作製とその単離を行った
- (2) 酵素処理を用いた接合上皮細胞の分散化を行った
- (3) フローサイトメトリーを用い、GFP 陽性接合上皮細胞の採取した。

(4)SV40T 抗原を導入し、不死化細胞株を樹立する。Limiting dilution を用いて single cell clone を作製した。

(5)RNA シーケンスを用いて、遺伝子発現を比較検討する。さらに in vivo の接合上皮細胞、口腔上皮細胞と樹立した接合上皮細胞、口腔上皮細胞の発現プロファイルを用いてクラスタリング解析を行い、character が保持されているか確認した。

(6)接合上皮細胞の機能解析は、残念ながら実施に至らなかった。今後、研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Seki T, Aizawa R, Tanaka J, Yajima-Himuro S, Kato M, Tanaka K, Mishima K, Yamamoto M	4. 巻 497(1)
2. 論文標題 Establishment of mouse gingival junctional epithelial cell line using a bioengineered tooth system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.02.047.	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------