

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592266

研究課題名（和文）舌粘膜乳頭新生技術確立の為の胎生ラット・ブタ舌乳頭形態形成関連因子の探索

研究課題名（英文）Screening for mRNAs responsible for morphogenesis in various lingual papillae.

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

研究成果の概要（和文）：舌粘膜乳頭形態形成機構の解明と新生技術確立の為胎生ラット・ブタ胎仔舌粘膜組織を発生段階で組織学的に検索し、発現遺伝子約 22,000 種の推移を解析した。ブタ胎仔とラット胎仔組織では舌粘膜乳頭の形態生成の時期が異なるなど動物種による違いが示された。ラット舌組織形成で遺伝子発現が変動する時期と変動遺伝子の組織内局在も明らかとなった。これらの知見により舌粘膜乳頭形態形成遺伝子の特定と機構解明が進むものと期待される。

研究成果の概要（英文）：To clarify comprehensive morphogenesis of the lingual papillae and establishment of their bio-engineered regeneration, we observed the histology of lingual mucosa and their lingual papillae during morphogenesis in porcine and rat embryos. Moreover, we analyzed about 22,000 mRNA lingual mucosa genes during the morphogenesis of rat embryos. Histological investigations revealed that there were some differences regarding the period of morphogenesis in porcine and rat embryos. This implies that there are some differences of morphogenesis among animal species. We also found that there was one clear fluctuation stage of mRNA expression during the rat morphogenesis. Some of these genes represented specific localizations on lingual tissues. These data would contribute to the identification of the morphogenesis-related genes to clarify the mechanism of the morphogenesis of lingual papillae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 24 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：舌粘膜新生技術・マイクロアレイ・舌乳頭形態形成・ブタ・ラット

1. 研究開始当初の背景

（1）哺乳類の舌背粘膜の表面には舌乳頭が分布する。これは主として機械乳頭（Mechanical papillae）と味覚乳頭（Gustatory papillae）に大別されている。

機械乳頭は食物の咀嚼に、味覚乳頭は味覚の受容にそれぞれ関与している。舌乳頭は位置する舌体とともに、食物の摂取、咀嚼、味覚の受容などに非常に重要な消化器である。一方で、舌組織は悪性腫瘍により失われる事が

あるが、再建はしばしば困難である。

(2) 舌の形態形成に関し、多くの報告がある。遺伝子の変動推移など、さらなる検索が求められる。

(3) 近年、大量の遺伝子発現の変動推移、いわゆるビッグ・データを網羅的に解析できる手法が一般的になってきており、疾患の解明や再生医療に応用されてきている。

2. 研究の目的

(1) ブタ並びにラットの胎仔の舌粘膜乳頭に関し発生の段階で時系列的に光学顕微鏡並びに走査電子顕微鏡などによる形態学的観察を行い、形態形成に関する組織所見を得る。同時に舌粘膜乳頭の形態形成における各発生ステージなどの動向など、動物種間による差異などに関し併せて観察する。

(2) ラットにおいては発生の各段階において舌粘膜組織を採取し、総 RNA を抽出し、マイクロアレイによる発現 mRNA の遷移など解析を行い、舌粘膜乳頭の形態形成に関する mRNA 候補因子を特定する。

(3) (2) で特定された因子においては、舌粘膜組織内での遺伝子の局在を特定する為にプローブを作成し、in situ hybridization 法による染色を試行する。

3. 研究の方法

(1) 妊娠ラットからの胎仔サンプリング
8週齢以降の膈内インピーダンス 3K Ω 以上の雌個体を毎夕方に選別し、雄と 1:1 で交配させ、赤外線 web カメラと PC 画像監視システム (Zoneminder) により交尾行動を確認した。翌朝午前 9 時に膈スミアを採取し、精子確認にて E0.5 と規定し、発生の各ステージにおいて起算日に炭酸ガスにより安楽死させ胎仔を得た。その後、胎仔の頭部より舌粘膜組織を切り出した。RNA 抽出用試料として、一部はバイアルに投入後、RNA later 溶液 (Invitrogen) にて 4°C overnight にて浸漬した後、溶液を除去し -20°C にて保存した。in situ hybridization 用・光顕観察用として 4% Paraformaldehyde 溶液、走査電顕観察用として Karnovsky 溶液にてそれぞれ固定を行った。

(2) 妊娠ブタからの胎仔サンプリング
北里大学十和田農場にてブタを交配し、胎生中期から出産直前までの期間の各ステージにおいて食肉として食肉センターに出荷・屠殺し、胎児を入手した。その後、ラット胎仔と同様に胎仔頭部より舌粘膜組織を切り出した。RNA 抽出用試料として、一部はバイアルに投入後、RNA later 溶液 (Invitrogen) にて 4°C overnight にて浸漬した後、溶液を除去し -20°C にて保存した。光顕観察用として 4% Paraformaldehyde 溶液、走査電顕観察用

として Karnovsky 溶液にてそれぞれ固定を行った。比較検討用として新生仔・仔の個体を北里大学十和田農場にて入手し、併せて観察を行った。

(3) ラット RNA later 浸漬舌組織からの total RNA の抽出
凍結保存されたラット RNA later 浸漬胎仔舌組織は、液体窒素を満たした乳鉢にて凍結したまま粉末状になるまで破砕処理を行い、その後、RNeasy Mini Kit の Buffer RLT-PLUS +2-ME 溶液 (Qiagen) を加え、溶解を行った。溶解液は同梱のスピンカラムにて精製・抽出を行った。精製過程において、ゲノム由来 DNA を除去する為に、RNase-free DNase I による DNA の消化処理も行った。得られた総 RNA 抽出溶液は九州大学教育・研究支援センターに発送し、cRNA マイクロアレイ (Illunima) 解析委託した。同時に、抽出された総 RNA の一部は、Gigapack III Gold Packaging Extract (Agilent) による cDNA ライブラリーの作成も併せて行った。

(4) 抽出されたラット総 RNA の cRNA マイクロアレイ解析
上記 (3) にて得られた総 RNA 抽出溶液は cRNA マイクロアレイ解析 (Illunima) 解析を行った。すなわち、cRNA 合成キット (Illumina totalprep RNA amplification kit) を用い、Illumina 社指定のプロトコルに従ってビオチン化した cRNA を合成と精製を行った。解析に先立ち、総 RNA 溶液は分光光度計 (Thermo scientific nanodrop) による RNA 収量の測定並びに自動電気泳動ステーション (Bio-rad Experion) による RNA 品質の確認を行い、品質水準に合致したもののみ分析に供した。その後、精製された cRNA は、再度分光光度計による定量と cRNA 量の再確認を行った後、RatRef-12 V1 マイクロアレイにハイブリダイズし、非特異的結合を洗浄除去し専用のスキャナーを用い各アレイの信号強度を測定した。これら各アレイのプローブ毎の信号強度を Genespring GX (Agilent) 並びに Subio Platform (Subio) ソフトウェアにて算出し、ラット胎仔舌粘膜の発生段階での時系列各ステージにおいて特異的に発現量の変化を示す遺伝子を抽出し、発現プロファイルなど検討を行った。同時に GO analysis による遺伝子カテゴリーの検討、GSEA analysis などの検討を行った。解析の一部はナラプロ・テクノロジーズに委託した。

(5) ラット・ブタ胎仔舌粘膜試料による組織学的検索
(1) 並びに (2) で得られた胎仔舌粘膜試料においては、光顕用試料においては、エタノールシリーズにて脱水を行い、レモゾール

透徹後、パラフィン包埋した。包埋ブロックは、4um で連続切片を作成し、HE による染色を行い、胎仔舌粘膜の発生段階での時系列各ステージにおいて観察を行った。走査電顕用試料としては、粘膜上皮表面の観察のもの、上皮剥離した結合織芯の観察用のものと2種類作成した。結合織芯観察用試料は3.5N 塩酸に浸漬した後、上皮剥離を行った。それぞれの試料はタンニン酸、オスミウム酸による処理を行った後、エタノールシリーズにて脱水後、凍結乾燥機 (Eiko 他) にて凍結乾燥処理を行い、走査電顕 (Hitachi) で観察を行った。

(6) 抽出候補 mRNA の in situ hybridization 法によるラット胎仔舌粘膜における局在の確認

(4) で抽出された mRNA 候補は SYBR Green による qPCR で発現量の推移の確認ののち、in situ hybridization 法のプローブ作成を行った。すなわち、mRNA 候補の遺伝子バンクの塩基配列よりプライマーを設計・PCR を行い、増幅された産物を電気泳動・TA クローニングを行い、コンピテントセルに導入・形質転換させた。その後、コンピテントセルを培養し、クローニングされたプラスミドが含むコロニーを選別・採集し、さらに PCR で増幅・精製した後、産物の塩基配列を BigDye による反応並びにシーケンサーによる解析 (Gleiner Fasmac; 委託) を行い、目的の遺伝子が得られているか確認・選抜した。選抜された遺伝子産物は精製を行った後、in vitro 転写反応・精製を行い RNA プローブ (Sense, Anti-sense) を作成した。作成されたプローブを用い、ラット胎仔舌粘膜組織上の in situ hybridization 法による候補遺伝子の染色と局在の観察を行った。すなわち (1) の試料の切片を Protease K による消化を行った後、プローブを加え1晩ハイブリダイズを行った。その後組織は抗体にて反応を行い、発色処理の後、光学顕微鏡 (Olympus) による観察を行った。

4. 研究成果

(1) ラット cRNA マイクロアレイ解析による発現 mRNA の解析

胎仔舌粘膜試料から抽出された発現 mRNA より、Subio Platform (Subio) ソフトウェア、Gene spring GX ソフトウェアにて舌粘膜発生段階のサンプリング区間を通じ、one-way ANOVA (一元配置分散分析) $p < 0.05$ 並びに、FoldChange 2.0 以上の基準を満たす遺伝子の総数は 1806 個であった。そのうち、区間を通じ発現量の上昇を見た遺伝子 (図 1) は、1063 個、減少したものは 743 個であった。

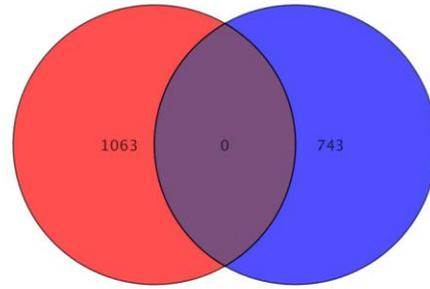


図 1. 舌粘膜発生段階を通じた遺伝子の増減のベン図。赤は区間を通じ発現量の上昇を見たもの、青は発現量の減少を見たもの

遺伝子量の上昇を見たものを GO Analysis にて解析した。内訳は次の通りであった。

(図 2)

molecular_function: 531 遺伝子 p 値: 0.6794*
 biological_process: 435 遺伝子 p 値: 0.095
 cellular_component: 498 遺伝子 p 値: 0.6657

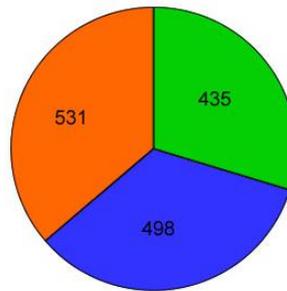


図 2. 舌粘膜発生段階を通じ、発現の上昇がみられた遺伝子のベン図と内訳。

橙色 : molecular_function、
 黄緑色 : biological_process、
 青色 : cellular_component

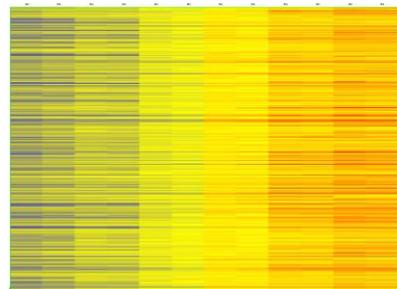


図 3. 舌粘膜発生段階を通じ、発現の上昇がみられた遺伝子群のヒートマップ

発現の上昇がみられた遺伝子群中、GO term 129 カテゴリーが p 値 < 0.1 の水準を満たすものであった。これらの中には細胞外マトリクス、器官発生に関するもの、細胞接着に関するもの、上皮、間葉に関するものなども含むものであった。

一方、遺伝子量の減少を見たものを同様に GO Analysis にて解析した。内訳は次の通りであった。(図4)

molecular_function:296 遺伝子 p 値:0.830*
biological_process:249 遺伝子 p 値:0.9953*
cellular_component:297 遺伝子 p 値:0.3976*

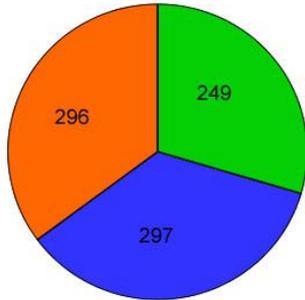


図4. 舌粘膜発生段階を通じ、発現の減少がみられた遺伝子のベン図と内訳。

橙色 : molecular_function、
黄緑色 : biological_process、
青色 : cellular_component

発現の減少がみられた遺伝子群中、GO term 195 カテゴリーが p 値<0.1 の水準を満たすものであった。これらの中には転写に関するもの、ストレス応答に関するものなども含まれていた。

これら遺伝子より変動の著しいものを選択し、NCBI データベース検索結果から候補を抽出し、in situ hybridization 法によるラット胎仔舌粘膜上における局在の確認を行った。

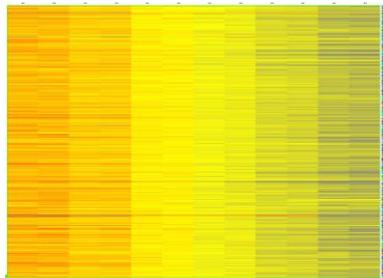


図5. 舌粘膜発生段階を通じ、発現の減少がみられた遺伝子群のヒートマップ

現在、20~30個前後の候補遺伝子を抽出する事ができた。今後、これら遺伝子候補を用い、引き続きさらなる解析を予定している。

(2) ラット胎仔舌粘膜試料による組織学的検索

光顕像・走査電顕像より、ラット胎仔舌粘膜は胎生中期より著しい形態形成が起こるが、出生を経てさらなる成熟が見られる事が分かった。現在、これらのデータに関し、論文投稿の準備を行っている所である。

(3) 抽出候補 mRNA の in situ hybridization 法によるラット胎仔舌粘膜上における局在の確認

ラット胎仔舌粘膜において著しく遺伝子の発現量の変動が見られた抽出候補 mRNA の in situ hybridization 法によるラット胎仔舌粘膜上における局在を観察した。これら遺伝子の幾つかは上皮内に局在が見られ、その局在は候補毎・発生段階のステージにより異なるものであった。現在、これらのデータに関し論文投稿の準備を行っている所である。

(4) ブタ胎仔舌粘膜試料の組織学的検索

光顕像・走査電顕像より、ブタ胎仔舌粘膜はラットと同様に、出生を経て生後に著しい成熟が観察された。生後2ヶ月齢の上皮細胞層は前面上皮層と後面上皮層の2面の層が確認され、成体期と同様の形態となる生後6ヶ月齢と似ていた。前面上皮細胞層は基底層、有棘層、顆粒層及び角質層が観察され、顆粒層にはケラトヒアリン顆粒が多数存在した。後面上皮細胞層は同様に基底層、有棘層、顆粒層、角質層が見られたが、顆粒層にケラトヒアリン顆粒は観察されなかった。固有層乳頭は上皮に向かって垂直に陥入し、後面上皮層に深く入り込んでいた。固有層乳頭は全体的に膠原線維が観察され、弾性線維は前面上皮層、後面上皮層の両端を基底膜に沿って先端まで伸びていた。これらのデータに関しても論文投稿の準備を行っている所である。

5. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

進藤順治 (SHINDO JUNJI)

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 80453512

(3) 連携研究者

梨田智子 (NASHIDA TOMOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号: 10133464

今井 あかね (IMAI AKANE)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号: 10133464

下村 浩巳 (SHIMOMURA HIROMI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号: 40139259

中村 康則 (NAKAMURA YASUNORI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号: 2095201

加藤 千穂美 (KATO CHIHOMI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号: 00147860