

令和 6 年 4 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17233

研究課題名（和文）ex vivo electroporation培養法による歯の運命決定因子の探索

研究課題名（英文）Exploration of tooth fate determination mechanisms using ex vivo electroporation culture system

研究代表者

鮎田 啓太（Funada, Keita）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80847997

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：歯は上皮 間葉相互作用により形成される器官として知られており、形態形成機構を解析する上で重要なモデルである。形態形成は3次元的な細胞の配置が重要であり、3次元的な形態を有したまま、様々な分子機能を評価するためには、3次元培養モデルと3次元の形態を有したまま遺伝子導入する技術が必要であった。本研究では、歯をモデルとしてelectroporation法を用いた遺伝子導入技術と培養モデルの構築を目的として研究を行った。その結果、上皮 間葉相互作用により形成される器官の器官全体への遺伝子導入技術を確立した。本手法は、将来の形態形成機構の解明に応用可能であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、様々な再生医療技術が進歩しており、いくつかの器官でその成功例が示されている。一方で、歯は上皮 間葉相互作用と呼ばれる細胞間相互作用により形成される器官として知られており、その形態形成機構の複雑性から再生が困難である器官である。その解明のためには、分子機能の詳細な解析が必須であるが、膨大な数の遺伝子の機能を評価するには、簡便な解析モデルが必要である。本研究の成果により、器官への遺伝子導入が簡便に行えるようになり、さらなる分子機能の解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：Teeth are known to be organs formed by epithelial-mesenchymal interactions, and are important models for analyzing morphogenesis. Three-dimensional cell arrangement is important for morphogenesis, and in order to evaluate various molecular functions, we need to use a three-dimensional culture model and develop genes transfection system. In this study, we aimed to construct a gene electroporation technology and culture model. As a result, we established a technology for gene transfection into the entire organ, which is formed by epithelial-mesenchymal interactions. This result indicates that this method can be applied to elucidate the morphogenetic mechanism in the future.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯 器官培養 遺伝子導入技術

1. 研究開始当初の背景

近年のバイオインフォマティクス解析技術の発展はめざましく、一つの遺伝子に着目した解析から、複数の因子を総合的に解析することで細胞運命決定機構の予測を行うことが可能となってきており、iPS細胞の発見を始め、幾つかの成功例が報告されている。これまで遺伝子発現の解析は、転写産物である mRNA やそのプロダクトであるタンパク質の発現解析が主体であった。しかしながら mRNA やタンパク質は、分解やスプライシングなどの転写後制御も受けるため、必ずしも転写量と発現量は一致しない。したがって、トランスクリプトームを正確に解析するには、遺伝子転写開始領域であるプロモーターやエンハンサー領域に着目する必要がある。

これまでの研究で、上皮-間葉相互作用により形成される器官に共通して発現する因子を同定するため、初期発生の上皮陥入がおこる時期に着目し、CAGE法を用いて遺伝子スクリーニング解析を行った。歯、毛、唾液腺、肺および腎臓の初期発生に関わるトランスクリプトーム解析を行い、歯に特異的に発現する microRNA である miR875 を同定した。さらに miR875 は、歯の発生において、間葉細胞の凝集および上皮の陥入に重要な役割を果たしている可能性を見出した。一方で、器官運命決定を評価するには、形態形成を評価する必要があり、遺伝子改変マウスなどを用いた研究に頼ってきた。しかしながらモデルマウスを用いた手法は、一つの遺伝子を解析するために必要な時間と費用が膨大であり、多数の遺伝子スクリーニングには不向きであった。そこで本研究では、スクリーニングシステムの開発を通して、器官の運命決定に関わる遺伝子スクリーニングに挑戦する。これまでの研究で、CAGE法を用いた大規模遺伝子スクリーニングにより、歯の発生初期に特異的に発現する遺伝子群の同定に成功した。これら遺伝子は、主に間葉細胞に発現しており、歯の運命決定は間葉細胞が担っている可能性が考えられた。本研究では、歯の発生初期に特異的に発現する転写因子に着目し、歯の形成能を評価する。

2. 研究の目的

歯の形成に関わると予測される遺伝子群から標的遺伝子を同定するためのスクリーニングシステムを開発する。同遺伝子の機能解析を通して、歯の発生における分子機能の解明を図る。

3. 研究の方法

器官培養モデルにおける遺伝子導入法の開発

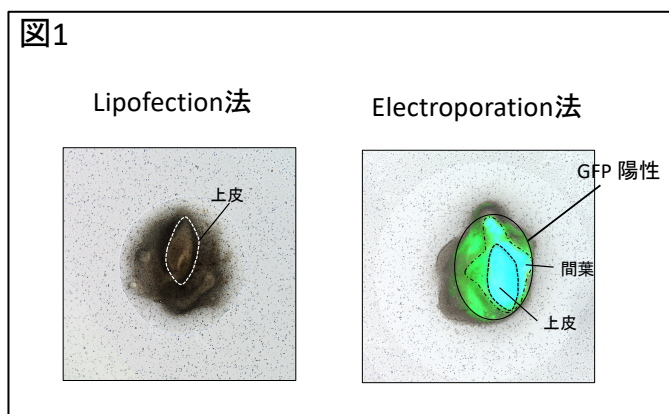
胎生 14 日齢マウス歯胚を摘出し、通法通り器官培養法にて培養を行った。培養開始時に In vivo 遺伝子導入装置 (NEPA GENE 社) を用いて、electroporation 法による遺伝子導入を行い、間葉細胞への遺伝子導入技術開発を行った。コントロールとして、従来使われていた lipofection 法を用いて比較を行った。導入効率の確認には、GFP 発現ベクターを用いることで可視化を行った。導入効率の確認後、器官培養法にて 72 時間培養を行い、形態形成能を評価した。

前象牙芽細胞特異的に発現する Lypd1 遺伝子の機能解析

これまでにスクリーニングした Lypd1 に着目し、機能解析を行った。上記にて開発した electroporation 法を用いて、Lypd1 siRNA を遺伝子導入し、象牙芽細胞分化機構の詳細を解析した。また、歯原性間葉細胞株 mDP 細胞を用いて、Lypd1 の細胞分化能およびシグナル解析を行った。

4. 研究成果

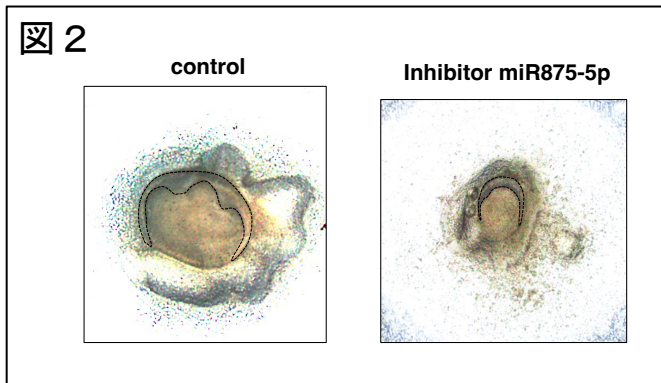
in vitro スクリーニングシステムにて、上皮-間葉相互作用に重要であると考えられる遺伝子群を抽出し、ex vivo スクリーニングシステムを用いて歯胚形成能の評価を行った。従来、歯の発生研究においては、siRNA を遺伝子導入した歯胚を、器官培養法を用いて評価する方法が用いられてきた。しかしながら、従来の lipofection 法を用いた遺伝子導入法では、3 次元的な形態を有している歯胚において導入効率が悪く、上皮由来遺伝子に対してはある程度の抑制効果が得られるが、間葉細胞由来遺伝子はほとんど抑制できないという問題点があった。そこで、In Vivo 遺伝子導入装置を用いて electroporation 法を行い、条件の最適化を試みた。遺伝子導入効率を確認するため、従来の lipofection 法および electroporation 法を用いて GFP 発



現した。図1は、Lipofection法とElectroporation法の比較を示している。Lipofection法では、上皮（上皮）のみに遺伝子が導入されるのに対し、Electroporation法では、間葉（間葉）と上皮（上皮）の両方にGFP陽性細胞が観察される。これは、Electroporation法がより広範囲の細胞に遺伝子を導入できることを示している。

現ベクターの遺伝子導入を行い、比較検討を行った。様々な条件にて検討を行ったところ、electroporation 法において、歯胚の上皮細胞だけでなく、間葉細胞において、GFP 陽性細胞を確認した(図 1)。また、従来の lipofection 法と比較して、シグナル強度が上昇しており、発現量の上昇を認めた。以上の結果から、electroporation 法による歯胚全体への遺伝子導入効率の改善に成功した。また、electroporation 法を用いて遺伝子導入した歯胚は、その後の培養により、正常に発育が可能であった。さらに、歯の間葉細胞に特異的に発現する miR875 の inhibitor を遺伝子導入したところ、歯胚の形成が阻害された(図 2)。以上の結果から、歯の ex vivo 器官培養法において、electroporation 法を用いた間葉細胞への効率的な遺伝子導入法を確立し、これまで遺伝子欠損マウスの作製が必須であった形態形成の評価が ex vivo にて可能となった。

細胞外からの情報伝達を効率よく行うための構造として脂質ラフトと呼ばれる膜マイクロドメインが存在し、コレステロール、スフィンゴ脂質、GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) および受容体が集積している。これら脂質ラフトの成分は、細胞膜に流動的に局在し、成長因子などのリガンドが接近すると、一時的にこれらの因子が集まりラフトが形成される。脂質ラフトは様々なシグナル経路の調節を介して器官形成に重要な役割を果たしていると考えられるが、歯の発生における



脂質ラフトの役割については未だ不明な点が多い。これまでの網羅的遺伝子解析により、GPI-AP として知られる lymphocyte antigen-6 (Ly6)/Plaur domain-containing 1 (Lypd1) が前象牙芽細胞に特異的に発現することを明らかにした。さらに、脂質ラフトおよび Lypd1 の前象牙芽細胞における機能を解析するため、各種ラフト阻害剤および Lypd1 siRNA を用いて解析を行った。これまでに開発した、electroporation 法を用いた ex vivo 器官培養法において、Lypd1 siRNA を遺伝子導入したところ、Lypd1 の発現の減少を認め、象牙芽細胞分化が抑制された。さらに象牙芽細胞の形態の異常を認めた。そこで、歯原性間葉細胞株 mDP を用いて Lypd1 が関与するシグナル経路のスクリーニングを行ったところ、Lypd1 の低下により BMP シグナル経路の下流因子である Smad1/5/8 のリン酸化が抑制されることを発見した。さらに、Lypd1 siRNA により、BMP2 により誘導される象牙芽細胞分化が抑制されることを確認した。GPI-AP の細胞膜および脂質ラフトへの局在には Lypd1 の C 末端に存在する omega 領域が重要と考えられる。そこで、Lypd1 の omega 領域を欠失させた発現ベクターを作製し、解析を行ったところ、Lypd1 の omega 領域は Smad1/5/8 のリン酸化を介した象牙芽細胞の分化および細胞形態制御に重要であることが判明した。

以上の結果より、GPI-AP である Lypd1 は、脂質ラフトにおいて BMP シグナル経路を調節することで、象牙芽細胞の分化に重要な役割を果たすことが示唆された。本研究成果は、Lypd1 の新規前象牙芽細胞マーカーとしての有用性を示し、脂質ラフトによるシグナル伝達経路の調節を介した細胞分化制御機構の解明の一助となるものである。

本研究により、器官培養法における、遺伝子導入法の効率化に成功した。本手法を用いることで、これまで困難であった、3次元形態形成が重要な器官の機能解析が効率化されることが期待される。

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 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yuta Tomomi, Tian Tian, Chiba Yuta, Miyazaki Kanako, Funada Keita, Mizuta Kanji, Fu Yao, Kawahara Jumpei, Iwamoto Tsutomu, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi, Yoshizaki Keigo	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of a novel ex vivo organ culture system to improve preservation methods of regenerative tissues	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29629-2	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 -

1. 著者名 Fu Yao, Miyazaki Kanako, Chiba Yuta, Funada Keita, Yuta Tomomi, Tian Tian, Mizuta Kanji, Kawahara Jumpei, Zhang Ling, Martin Daniel, Iwamoto Tsutomu, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi, Yoshizaki Keigo	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Identification of GPI-anchored protein LYPD1 as an essential factor for odontoblast differentiation in tooth development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104638 ~ 104638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104638	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 傅 堯, 宮崎 佳奈子, 吉崎 恵悟, 千葉 雄太, 鮎田 啓太, 湯田 智美, 田 甜, 水田 敢士, 川原 純平, 福本敏, 高橋 一郎.
2. 発表標題 前象牙芽細胞に特異的に発現するGPIアンカー型タンパク質Lypd1の同定および分化制御機構の解明
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯田 智美, 吉崎 恵悟, 田 甜, 宮崎 佳奈子, 鮎田 啓太, 水田 敢士, 傅 堯, 川原 純平, 福本敏, 高橋 一郎
2. 発表標題 生体外器官培養システムを用いた温度刺激による長期器官保存法の確立
3. 学会等名 第45回分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯田 智美, 吉崎 恵悟, 田 甜, 宮崎 佳奈子, 鮎田 啓太, 水田 敢士, 傅 堯, 川原 純平, 張 玲, 高橋 一郎
2. 発表標題 温度依存性器官培養法を用いた組織長期保存スクリーニングモデルの検討
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水田 敢士, 吉崎 恵悟, 湯田 智美, 宮崎 佳奈子, 鮎田 啓太, 田 甜, 傅 堯, 川原 純平, 張 玲, 高橋 一郎
2. 発表標題 基底膜分子NephronectinのRGD領域はインテグリン α V β 6と結合することでエナメル芽細胞の分化を制御する
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 湯田 智美, 吉崎 恵悟, 田 甜, 宮崎 佳奈子, 鮎田 啓太, 水田 敢士, 傅 堯, 川原 純平, 張 玲, 高橋 一郎
2. 発表標題 歯胚器官培養法を用いた温度制御による組織長期保存スクリーニングモデルの確立
3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023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

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
---------	---------