

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593096

研究課題名(和文)ミトコンドリアの形態変化と口腔顎顔面組織発生との関係解明

研究課題名(英文)mitochondria dynamics and craniofacial development

研究代表者

増田 啓次(Masuda, Keiji)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：60392122

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)：ミトコンドリアが口腔顎顔面の組織発生にどのような役割を果たすかについて、マウスの歯胚形成をモデルとして第一鰓弓器官培養系を用いて基礎的実験を行った。今回は、ミトコンドリアの形態を制御する因子のひとつであるDrp1に着目し、遺伝子ノックダウン法によりその機能を解析した。Drp1は歯胚の形成初期には重要な機能を持っていない可能性が示唆された。さらにエナメル質や象牙質の形成にどのような役割を持つかについて今後の研究課題とする予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to clarify the role of mitochondria on craniofacial development. Tooth development is one of important issues in this field. We used mouse organ culture system to investigate the role of mitochondria fission factor, Drp1, on the tooth development. The first branchial arch of mouse was cultured under the condition of Drp1 gene knock down by siRNA. The tissue section of cultured organ showed that tooth germ developed into the cap stage irrespective of Drp1 gene knock down, suggesting no essential role of Drp1 on the early stage of tooth development. For further analysis of Drp1 function in tooth development, we plan to investigate the role of Drp1 on the late stage of tooth development, such as enamel and dentin formation.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ミトコンドリアダイナミクス

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは、融合と分裂を繰り返しながらその形態と機能を保持している(ミトコンドリアダイナミクス、下図)。

ミトコンドリア形態の動的変化 (分裂と融合を常に繰り返している)



分裂には Drp1 (ダイナミン類似タンパク) が必須の因子であることが示されているものの、生物個体にとって、それがどのような意義を持つかはこれまで不明であった。それを解明する目的で、本代表研究者は Cre-loxP の系を用いて Drp1 ノックアウトマウスを作製して分子機能解析を行った(引用文献)。Drp1-null (完全欠失) マウス(胎生 10.5~12.5 日までに死亡) および神経細胞特異的 Drp1 ノックアウトマウスの解析結果から、Drp1 は、マウス個体発生の初期に必須の因子である、中枢神経細胞ではミトコンドリアの分裂を促進することにより、神経突起の伸長先端部にまでミトコンドリアの分布を可能にする、中枢神経ネットワークやシナプス構築に必須である、ことが明らかとなった。

Drp1 は脳以外にも広く発現しており、また Drp1-null マウスが胎生致死となることなどから判断して、脳以外の組織の形成にも重要であることが推測される。しかし Drp1 欠損が脳以外の組織およびそれらを支配する末梢神経の構築と機能にどのような異常をもたらすかについては未だ解明されていない。

本代表研究者はこれまで免疫学分野『B リンパ球の分化と機能』でも多数の遺伝子改変マウスを作製・活用し、研究成果を発表してきた(引用文献)。また小児歯科臨床の現場ではミトコンドリア病をはじめ、多くの有

病・障害患者の顎口腔疾患の診断・治療に従事している。

以上を踏まえて、本研究課題を申請した。

2. 研究の目的

本研究目的は、ミトコンドリアダイナミクスが顎口腔領域の組織発生と機能にどのように関与するかを基礎的研究により明らかにすることにある。また、その基礎的研究成果をミトコンドリア病患儿に特有の顎口腔機能低下に対する治療法・予防法の開拓基盤にすることにある。実験では、マウス第一鰓弓器官培養系を利用し歯胚形成過程における Drp1 の機能を解析した。

3. 研究の方法

(1) マウス第一鰓弓器官培養: マウス胎児の第一鰓弓の分離: C57/BL マウス胎児(11 日目)の第一鰓弓を実体顕微鏡下で切離した。切離した第一鰓弓を、ニトロセルロース膜に乗せ 24 well dish で培養した。培養液は BGJb medium を 200 μ L/well で使用し、第一鰓弓がぎりぎり浸る程度の量とした。培地交換は培養終了まで毎日 1 回行った。

(2) ターゲット分子のノックダウン法: 核酸分子の導入は、リポフェクション法とアンチセンスオリゴ導入法の 2 種類を行った。リポフェクション法では Lipofectamine® RNAiMAX (invitrogen 社) 付属の試薬を使用し、instruction manual に従って siRNA を導入した。アンチセンスオリゴ導入法では、GenomONE (石原産業株式会社) 付属の試薬を使用し、instruction manual に従って siRNA を導入した。リポフェクション法、アンチセンスオリゴ導入法とも、1 日 1 回の培地交換時に新しく siRNA 試薬を調整し、培地に添加した。今回の実験で使用した siRNA の塩基配列は論文に従った(引用文献)。

(3) 組織切片作成とヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色: 8 日間培養した第一鰓弓をパラホルムアルデヒド溶液で 24 時間固定した。

次に、通法に従いパラフィン包埋し 5 μm の厚さで薄切しスライドグラス上で乾燥後、H-E 染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

(4)ウエスタンブロットによるノックダウン効果の判定：8 日目間培養した第一鰓弓に RIPA buffer (+ プロテアーゼ阻害薬) を加えホモジナイザーで機械的にすりつぶして懸濁した。懸濁液を 15,000rpm で 10 分間遠心し、上清をタンパク溶出液として回収した。bradford 法でタンパク定量を行った後、通法に従ってターゲット分子に対する特異抗体によりウエスタンブロットを行った。培養細胞に対しても同様の方法でタンパクを溶出し、ウエスタンブロットを行った。

(5)マウスの歯原性上皮由来細胞株 (MDE) および歯乳頭由来細胞株 (MDP) を用いた予備実験：培養液は DMEM/10%ウシ胎児血清、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アスコルビン酸、100units/mL ストレプトマイシン・ペニシリンを含有した α -MEM を使用し、6 well dish で培養した。ターゲット分子をノックダウンし、培養 3 日目に細胞を回収しウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1)マウス第一鰓弓器官培養：第一鰓弓は、培養中に成長し歯胚、メッセル軟骨、歯槽骨、舌などの器官が形成され始める (図 1)。

図1A. マウス第一鰓弓器官培養写真



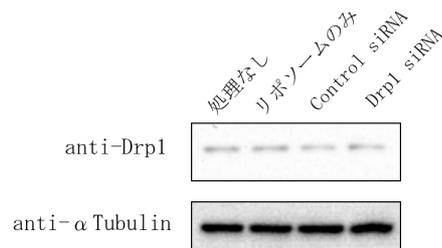
図1B. 培養8日目



(2)ターゲット分子のノックダウン効果の判定：リポフェクション法を用いて、Drp1 遺伝子ノックダウン効果をウエスタンブロットで解析した (図 2)。Drp1 タンパクの発現量は、未処理、リポソームのみ、および control siRNA の場合と比較して、明らかな低下を認

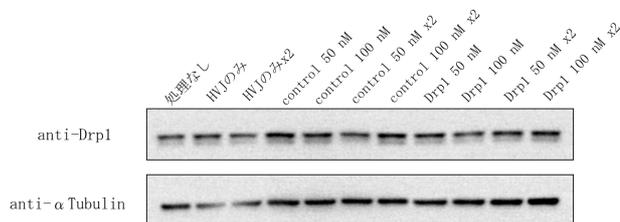
めなかった。siRNA の終濃度を変化させて同様の実験を繰り返したが、明らかなタンパク発現抑制効果を認めることはできなかった。

図2. 第一鰓弓器官培養でsiRNAノックダウン効果の検討
導入試薬：Lipofectamin RNAi MAXs、siRNA 終濃度 60 nM



また、アンチセンスオリゴ導入法においても同様に、明らかなタンパク発現抑制効果を認めることはできなかった (図 3)。

図3. 第一鰓弓器官培養でsiRNAノックダウン効果の再検討
導入試薬：GenomONE、siRNA 終濃度 50 or 100nM



ウエスタンブロットでターゲット分子のタンパク発現抑制が認められなかった詳細な理由は解明できなかった。siRNA は、本実験系において培養中に第一鰓弓組織の表面から内部に浸透し、さらに細胞内に取り込まれて効果を示すと推定される。siRNA の組織浸透率は、siRNA 濃度、核酸導入効率など様々な要因により左右されると考えられる。siRNA が全組織に均等に浸透した場合は、抽出した全タンパクのウエスタンブロット解析によりノックダウン効果を確認し得る。しかし、siRNA が一部分にのみ浸透した場合は、その他の大部位ではタンパク発現量に変動がないことから、その一部分にのみタンパク発現抑制効果が得られたとしても、それをウエスタンブロットで確認することは困難となる。

本実験結果は、第一鰓弓組織全域に siRNA が浸透せず、表面の上皮付近にのみ浸透し、

局所的にノックダウン効果を示した可能性も考えられた。RT-PCR 法による mRNA 発現レベルの解析については、培養した第一鰓弓全組織から RNA を抽出すると同様の結果となると推定されたため、今回は行っていない。

以上より、器官培養系において第一鰓弓組織の表面から siRNA が浸透し、少なくとも表層にある歯原性上皮細胞内に siRNA が取り込まれノックダウン効果を示す可能性を考え、第一鰓弓の器官培養後の組織形態学的解析を行った。

(3) 第一鰓弓器官培養組織の形態学的解析

マウスの第一鰓弓器官培養では、培養 4 日目ごろから上皮細胞増殖による上皮組織の肥厚・間葉組織への上皮陥入現象が生じる。培養 8 日目には Cap stage にまで進行する。現在のところ、この器官培養系ではそれ以降の硬組織形成までは再現することはできない。したがって、本培養系により Drp1 が歯胚形成初期の上皮の増殖・肥厚・陥入現象にどのように関与するかを調べることができる。

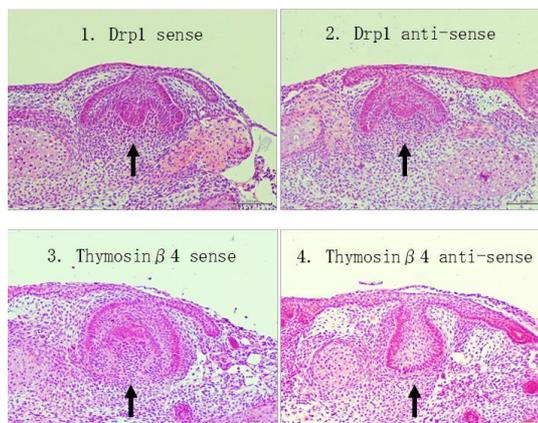
Drp1 siRNA をアンチセンスオリゴ導入法で器官培養系に添加し、上皮の肥厚から cap stage に至る過程で異常が認められるかどうかを H-E 染色により観察した。ポジティブコントロールとして、研究分担者の大隈博士（出産・退職のため平成 26 年 2 月 28 日に研究分担者から削除）により発表された論文（引用文献）をもとに、Thymosin 4 を使用した。

培養 8 日目のヘマトキシリン・エオジン染色組織切片において、Drp1 anti-sense オリゴ導入標本では、コントロールである Drp1 sense オリゴ導入標本と同程度に歯原性上皮の肥厚・陥入を認めた（図 4.1 と 2 の）。

Thymosin 4 では、コントロールである Thymosin 4 sense オリゴに比して、Thymosin 4 anti-sense オリゴ導入標本では歯胚形成が上皮の増殖・陥入までは認めたが、Cap

stage への進行を阻害する効果を再現できた（図 4.3 と 4 の）。

図4. 第一鰓弓培養8日目の組織写真（HE染色）



この結果から、Drp1 は歯胚発生初期の上皮増殖・肥厚・陥入などの現象に重要な機能を持っていない可能性が示唆される。ただし、これは第一鰓弓器官培養系の少なくとも表層に siRNA が浸透し、上皮細胞でノックダウン効果が表れていたと仮定した場合にのみ正しいといえる。現状では、siRNA による Drp1 遺伝子ノックダウン効果の有無について完全に確認できていないため、明確な結論を出すことができていない。

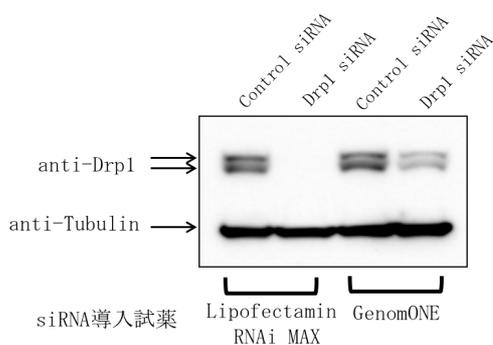
(4) マウス歯原性上皮由来細胞株およびマウス歯乳頭由来細胞株を用いた予備実験

マウス第一鰓弓の器官培養系では、siRNA による Drp1 遺伝子ノックダウン効果が不確実であることから、歯胚形成過程における Drp1 の機能について結論を出すことが困難な状況である。そこで、siRNA のノックダウン効果がより確実に認められる細胞培養系に変更し実験を継続する予定である。

歯胚形成は上皮とそれに接する間葉系組織との相互作用により進行する複雑な過程である。培養細胞を用いる場合、上皮由来細胞と間葉組織由来細胞を別々に培養し、それぞれの細胞の表現型を解析することしかできない。そのため、第一鰓弓器官培養に比べて歯胚形成過程の再現には限界がある。しかし、器官培養系より単純であるため遺伝子ノックダウンなどの操作を加えやすい。

細胞株は、大隈博士の論文にも記載されている MDE (マウス歯原性上皮由来) と MDP (マウス歯乳頭由来) を使用する予定である。予備実験として MDE を用いてリポフェクション法およびアンチセンスオリゴ導入法により Drp1 siRNA を導入しウエスタンブロットにより Drp1 タンパクの発現抑制効果を調べた(図 5)。

図5. 培養細胞で siRNA ノックダウン効率確認
(siRNA 終濃度 lipofectamin 30 nM, GenomONE 50 nM)



培養細胞系では、siRNA による Drp1 遺伝子ノックダウン効果が確認できた。特に、リポフェクション法では、Drp1 タンパクの発現がほぼ完全に抑制された。今後は、細胞培養系と siRNA による遺伝子ノックダウン法を組み合わせ、ミトコンドリアダイナミクス関連因子が歯の発生過程でどのような機能を持つかについて解析を進める予定である。また、Drp1 null マウス (胎生 8~9 日で致死、第一鰓弓形成が異常の可能性もある) の活用も計画している。

<引用文献>

Keiji Masuda, et al. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol*, 11:958-966, 2009.

Keiji Masuda, et al. A critical role for REV1 in regulating the induction of C:G transitions and A:T mutations during Ig gene hypermutation. *J Immunol*, 183:1846-1850, 2009.

Hidenori Otera, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*, 191:1141-58, 2010.
Yukiko Ookuma, et al. Multiple functional involvement of Thymosin beta-4 in tooth germ development, *Histochem Cell Biol*, 139:355-370, 2013.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

増田 啓次, 小笠原 貴子, 山座 治義 (他 4 名, __, __, __ 番目): 先天性全盲、精神遅滞および下垂体機能低下症を合併する透明中隔視神経異形成症の患児に全身麻酔下で歯科治療を行った 1 例. *障害者歯科*, 35:22-27, 2014. 査読有

増田 啓次, 小笠原 貴子, 山座 治義 (他 6 名, __, __, __ 番目): Dandy-Walker variant の患児に歯の形成不全症の合併が疑われた 1 例. *小児歯科学雑誌*, 52:440-447, 2014. 査読有

増田 啓次, 山座 治義, 小笠原 貴子 (他 4 名, __, __, __ 番目): 鼻腔内の過剰歯を本院耳鼻咽喉科と連携し内視鏡下に摘出した 1 例. *小児歯科学雑誌*, 52:551-558, 2014. 査読有

山座 治義, 増田 啓次, 小笠原 貴子 (他 4 名, __, __, __ 番目): Angelman 症候群の患児に多数歯齲蝕を認めた 1 例. *小児歯科学雑誌*, 52:559-564, 2014. 査読有
Haruyoshi Yamaza, Keiji Masuda (他 5 名, __, __ 番目): Clinical approach to a suspected case of first branchial arch syndrome. *Case Reports in Medicine*, 1-5, 2014. 査読有

増田 啓次, 山座 治義, 小笠原 貴子 (他 4 名, __, __, __ 番目): Hallermann-Streiff 症候群に歯肉腫瘍を伴う先天歯

を認めた 1 例. 小児歯科学雑誌, 51:461-466, 2013. 査読有

増田 啓次, 小笠原 貴子, 山座 治義 (他 5 名, __, __, __ 番目): Langer-Giedion 症候群に埋伏過剰歯・永久歯萌出遅延・叢生を認めた 1 例. 小児歯科学雑誌, 51:467-472, 2013. 査読有

増田 啓次, 小笠原 貴子, 山座 治義 (他 5 名, __, __, __ 番目): 6 か月齢で Lowe 症候群と診断された 1 症例の歯科的所見. 小児歯科学雑誌, 51:473-478, 2013. 査読有

Haruyoshi Yamaza, et al (他 9 名, __ 番目): Immune therapeutic potential of stem cells from human supernumerary teeth. J Dent Res. 92(7):609-615, 2013. 査読有

[学会発表](計 6 件)

小笠原 貴子, 山座 治義, 増田 啓次 (他 3 名, __, __, __ 番目): 骨髄異形成症候群を合併した Dubowitz 症候群患児に対する歯科的対応. 第 32 回日本小児歯科学会九州地方会, 2014 年 11 月 23 日, 九州歯科大学・福岡県・北九州市.

小笠原 貴子, 山座 治義, 増田 啓次 (他 3 名, __, __, __ 番目): 下顎骨吸収を伴うパーキット白血病患児で化学療法終了後に骨梁回復を認めた 1 例. 第 32 回日本小児歯科学会九州地方会, 2014 年 11 月 23 日, 第 32 回九州歯科大学・福岡県・北九州市.

山座 治義, 小笠原 貴子, 増田 啓次 (他 3 名, __, __, __ 番目): 外胚葉異形成症の歯科的管理の 1 例. 第 52 回日本小児歯科学会大会, 2014 年 5 月 16 日, 品川区立総合区民会館・東京都・品川区.

小笠原 貴子, 山座 治義, 増田 啓次 (他 4 名, __, __, __ 番目): 第一第二鰓弓症候群が疑われる硬軟口蓋裂を有する新生

児の 1 例. 第 52 回日本小児歯科学会大会, 2014 年 5 月 16 日, 品川区立総合区民会館・東京都・品川区.

小笠原 貴子, 山座 治義, 増田 啓次 (他 5 名, __, __, __ 番目): 脳肋骨下顎症候群の患児にエナメル質形成不全を認めた 1 例. 第 31 回日本小児歯科学会九州地方会, 2013 年 10 月 20 日, 福岡県歯科医師会館・福岡県・福岡市.

小笠原 貴子, 山座 治義, 増田 啓次 (他 5 名, __, __, __ 番目): 顔面脂肪腫により顎骨の変形をきたした 1 例. 第 31 回日本小児歯科学会九州地方会, 2013 年 10 月 20 日, 福岡県歯科医師会館・福岡県・福岡市.

[図書] 該当なし

[産業財産権] 該当なし

[その他] 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 啓次 (MASUDA Keiji)

九州大学病院・小児歯科・スペシャルニーズ歯科・講師

研究者番号: 60392122

(2) 研究分担者

山座 治義 (YAMAZA Haruyoshi)

九州大学・歯学研究院小児口腔医学分野・講師

研究者番号: 30336151

小笠原 貴子 (OGASAWARA Takako)

九州大学病院・小児歯科・スペシャルニーズ歯科・助教

研究者番号: 70596387

(3) 連携研究者: 該当なし

(4) 研究協力者: 該当なし