

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463153

研究課題名(和文) 舌乳頭新生技術確立の為の胎仔培養舌粘膜組織siRNA導入による形態形成干渉の検証

研究課題名(英文) Preliminary study of siRNA transfection into embryonic lingual tissue to establish the technique for lingual papillae regeneration

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：舌粘膜乳頭の形態形成には特定のタンパク質が関与する。我々は舌粘膜乳頭形態形成遺伝子候補を抽出した後siRNAを作成し、蛍光タンパク質発現ベクターとともに予備的導入を行った。ラット胎仔舌粘膜組織にエレクトロポレーション法でトランスフェクションした後に器官培養を行い、24、48、72時間後の蛍光の観察を行った。遺伝子導入後24時間でトランスフェクションによる蛍光が見られ、72時間でも継続して蛍光が観察された。しかしながら条件により蛍光は不安定となった。バイアビリティにも関与する導入パルスのパラメータの検討や効率性の高い導入方略の検討なども含めたさらなる改善が必要とされた。

研究成果の概要(英文)：Essential proteins for lingual papillae morphogenesis are likely present during embryonic development. We searched for the responsible genes and selected candidates involved in lingual papillae morphogenesis. Then to establish regeneration techniques, preliminary transfection of siRNA was performed. Transfection of the synthesized siRNA together with vectors for fluorescent proteins expression into rat embryonic lingual tissues was performed using the electroporation method. After the transfection, the lingual tissues were organ-cultured and observed. Twenty-four hours after the transfection, fluorescence markers started illuminating inside of the lingual tissues and were continuing to glow up to the 72 hour intervals. However, the quality of fluorescence was being occasionally unstable. Optimization of electric pulse parameters was required in order to maintain cell viability and more efficacious transfection methods also would be required.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：遺伝子導入 siRNA 舌乳頭形態形成

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一方、悪性腫瘍などで失われる。再建に際し、舌乳頭の再建は困難である。

(2) 研究代表者らは先の 2010 年度科研費課題にて胎生ラット胎仔舌粘膜組織の発生後期段階で発現遺伝子 22,000 種の推移を cDNA マイクロアレイにて解析し、変動の大きく異なるものの推移を調べ、*in situ* hybridization 法により組織内での発現及び局在の観察を行った。

(3) 以上の結果により、胎生ラット胎仔舌粘膜組織の発生後期段階における発現遺伝子のうち、形態形成が示唆される遺伝子のノックダウンを行い、その影響を検証する必要が出てきた。

(4) 研究代表者らは本研究課題申請当初、遺伝子導入の手段として化学的に遺伝子を導入するリポフェクション法の使用を想定していた。しかしながら実験開始の過程で、化学的導入法であるゆえにターゲット組織・細胞に対するリポフェクション法の毒性が著しく、組織内の遺伝子動態へ影響する可能性がある(他研究者からの私信による)こと、また培養細胞の遺伝子導入の報告例は数多くありながらも、培養組織への導入報告例が当時極めて少なかった事を問題視した。そこで代替の方法として、(もう一つの物理的導入法である)エレクトロポレーション法を採用する事とした。この方法はニワトリ胎仔脳組織に導入を成功させた先人の報告例があるなど、生物種は異なりながらも実績があった。

2. 研究の目的

(1) 舌乳頭新生技術確立の為、2010 年度科研費課題で解析されたラット総 RNA からの発現遺伝子セットより特定された舌乳頭形態形成関連因子候補から、さらなる選択を行う。

(2) 候補遺伝子に対応した干渉 RNA (siRNA) を設計し、合成する。

(3) 実験動物胎仔培養舌粘膜組織内にエレクトロポレーション法による siRNA の導入を行う。その予備実験として蛍光タンパク質発現ベクターの導入と行った後、器官培養を行い、時系列に沿って培養下における形態学的観察を行い、遺伝子導入に関する基礎データを取る。

3. 研究の方法

(1) 舌乳頭形態形成因子候補の絞り込み

2010 年に施行されたラット総 RNA からの cDNA マイクロアレイ解析における発現遺伝子セットより、今回は主に転写因子に焦点を当て、新たな解析手法より舌乳頭形態形成因子候補の絞り込みを行った。今回の解析である、遺伝子発現カスケード解析(サイトライソソリューションズ社 委託)は大きく分けて次の 2 段階の解析よりなる。

まず、最初の解析として発現変動の大きい遺伝子群の転写開始点上流に多く含まれる転写因子結合サイトを、転写因子結合サイトデータベースである BIOBASE と TRANSFAC (キアゲン社)を用いて解析した。(転写因子結合サイト探索解析)

次の段階として発現変動の大きい遺伝子群の転写因子結合サイト探索解析の結果と発現変動が小さかった遺伝子群の転写因子結合サイトの検索結果とを比較して、結合転写因子の遺伝子群で多く見つかった転写因子結合サイトを上位段の転写因子群として第 1 段から第 6 段の階層で各階層の転写因子群を導き出した(キーノード解析)。

これらの 6 段の階層の転写因子群より遺伝子発現カスケードのパスウェイマップを作成し、前回の抽出候補因子と比較検討を行い、最終的な候補遺伝子(候補 A ならびに B)を抽出した。

(2)(1)により導き出された候補遺伝子に対応した干渉 RNA (siRNA) の設計と合成

(1) で導き出された遺伝子候補の siRNA の設計並びに合成を委託により行った。同時にネガティブコントロール用の siRNA も併せて設計と合成を行った。

(3)エレクトロポレーション法による遺伝子導入

妊娠後期ラットより胎仔を取り出し、舌及び周囲口腔組織を実体顕微鏡下で摘出した。

摘出組織を洗浄した後、培地を満たしたバスタブ電極に組織を静置し、遺伝子導入装置(ネッパジーン社 NEPA21 図 1)によりプログラムされた電気パルスを与え、タンパク質ベクター・siRNA の遺伝子導入を行った。



図 1. 本研究で用いられた遺伝子導入システム。NEPA21 エレクトロポレーター並びにバスタブ電極、実体顕微鏡より構成される。

遺伝子導入の後、低血清培地による胎仔舌粘膜組織の器官培養を行い、導入後 24 時間、48 時間、72 時間の各時系列に沿って形態学的観察を行った。観察は蛍光タンパク質に対応した単波長パワー LED によるイルミネータの照明下で行った(図 2)。ロングパスフィルターを装着した実体顕微鏡により観察とデジタルカメラによる撮影を行った。

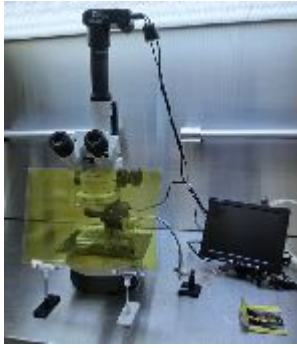


図2.本研究の器官培養組織観察システム。蛍光タンパク質に対応した単波長パワーLEDによるイルミネータ、ロングパスフィルターを装着した実体顕微鏡及びデジタルカメラより構成される。

遺伝子導入より 72 時間の器官培養の後、舌粘膜組織を 4%PFA で固定後、OCT コンパウンドで包埋した。60-100um の厚さでクライオセクションを行った。切片は PBS 中に浮遊させ洗浄した後、スライドガラスに貼付し、本学先端研のレーザー共焦点顕微鏡 (LSM710; ツアイス社) を用い、蛍光像の観察並びにオプティカルセクション像を得た。

4. 研究成果

(1) 舌乳頭形態形成因子候補の絞り込み

遺伝子発現カスケード解析を行った。転写因子結合サイト探索解析では、変化のあった遺伝子群 (Fold Change の絶対値 > 3.5 だった 169 個を Yes-set、Fold Change の絶対値 < 1.018 だった 874 個を No-set と定義した) を採用し、この遺伝子群における転写因子結合サイトを探索した。発現変動の大きい遺伝子群の転写開始点上流に多く含まれる転写因子結合サイトは 52 個導き出された。また、BIOBASE と TRANSFAC を用い、これらのサイトに結合する転写因子とコードする遺伝子は 10 個導き出された。

一方、この結果を利用したキーノード解析結果においては、40 個の鍵になる遺伝子 (キー遺伝子) が導き出され、各々のキー遺伝子を頂点とした 6 段階層のパスウェイ図が Cytoscape (ネットワーク可視化ソフトウェア) により描記された。前回の抽出候補因子と今回の解析結果を比較検討し、今回は 2 種類の転写因子を候補遺伝子 (候補 A 及び B) として選択した。

(2) 候補遺伝子に対応した干渉 RNA (siRNA) の設計と合成

今回抽出された 2 種類の転写因子候補の遺伝子より siRNA を設計し、合成 (MISSION siRNA カスタム品・HPLC 精製・滅菌・エンドキシンプリー) を行った。同時にネガティブコントロール用の siRNA も設計し、合成 (MISSION siRNA Negative Control カスタム品) を行った。

(3) 胎仔舌粘膜組織への蛍光タンパク質発現ベクターおよび siRNA のトランスフェクションと時系列的観察

今回、エレクトロポレーション法による遺伝子導入を行うにあたり、蛍光タンパク質を用い、至適条件の探索を行った。本導入装置は、他の装置と異なり、正負逆極性の穿孔パルスと導入パルスを組織に付与でき、またパルス幅や回数など、詳細なプログラムが可能である。

一定の設定条件下において舌粘膜組織にトランスフェクションされることを確認した。

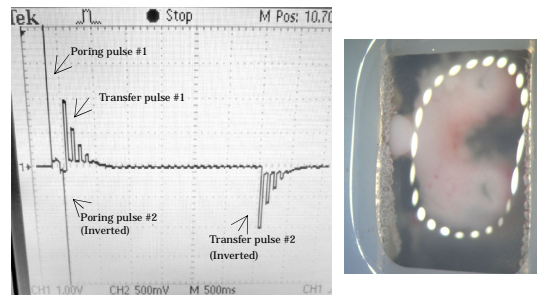


図3. ネットパジーン社製 NEPA 2 1 エレクトロポレーターによる導入波形 (左) 及び導入途中の舌粘膜組織 (右)。設定プログラムにより細胞膜に穿孔する 2 回の正負穿孔パルスと減衰する正負導入パルスを設定できる。(減衰プローブを用いているため、実際の電圧よりも低い波形表示となっている)

蛍光タンパク質ベクターによる遺伝子導入の後、舌粘膜組織の器官培養を行い、24、48、72 時間後の蛍光の経時的観察を実体顕微鏡下で行った。遺伝子導入後 24 時間で舌粘膜組織にやや弱いながらも蛍光が見られ始め (図 4)、48 時間において蛍光強度が増強した (図 5)、72 時間においてもやや蛍光は減弱しながらも継続した蛍光が観察された (図 6)。概ね 48 時間から 72 時間後の間で最大蛍光強度が観察された。

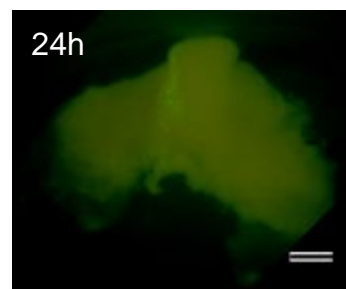


図4. 蛍光タンパク質ベクターによる遺伝子導入後 24 時間後の蛍光タンパク質マーカー (GFP) の実体顕微鏡像。スケール: 1000um

エレクトロポレーション法による遺伝子導入における導入効率は培地の種類が大きく影響していた。一般に血清添加培地はエレクトロポレーション法による遺伝子導入には導入効率が著しく低下するため不向きと

されている。今回、低血清培地を用いたが、全ての低血清培地製品が高い導入効率を示すものではない事も判明した。同時に、胎仔舌組織に種類の異なるベクターの蛍光タンパク質ベクター（GFP, RFP, DsRed）の共導入を行った後、共焦点顕微鏡による導入部位の局在の観察を行ったが、ほぼ同一の細胞に導入される事も併せて確認した。

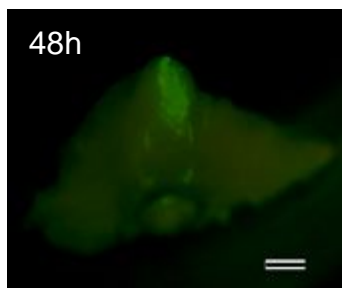


図5. 蛍光タンパク質ベクターによる遺伝子導入後48時間後の蛍光タンパク質マーカー（GFP）の実体顕微鏡像。導入による強い蛍光が観察される。スケール：1000um

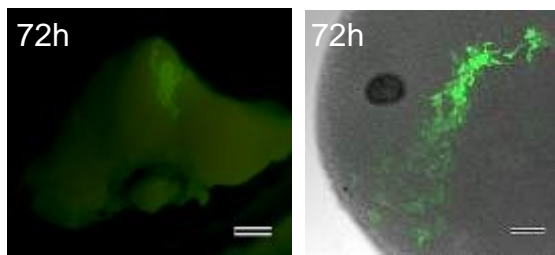


図6. 蛍光タンパク質ベクターによる遺伝子導入後72時間後の蛍光タンパク質マーカー（GFP）の実体顕微鏡像(左)。若干の蛍光減弱がみられる。(右)共焦点顕微鏡の矢状断観察像及び微分干渉像との合成画像(厚さ100um: オプティカルセクション再構築像)スケール: 左1000um 右: 100um

また、共焦点顕微鏡による培養舌組織内の蛍光タンパク質遺伝子導入細胞の観察では、上皮層のみならず舌粘膜下組織への導入細胞の分布も確認できた。

一方、siRNAと蛍光タンパク質ベクターの共導入に関しては、蛍光は若干不安定となり、粘膜下組織の深部まで遺伝子の導入がされないケース(図7)が見られた。

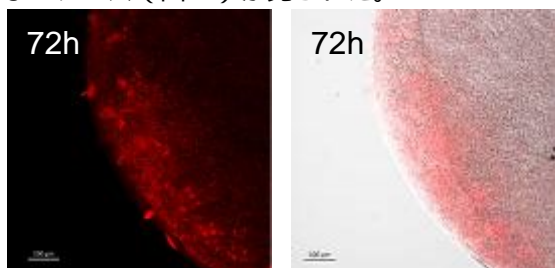


図7. 蛍光タンパク質ベクター並びに siRNA 形態形成候補 (B) による遺伝子共導入後72時間後の蛍光タンパク質マーカー (RFP) の共焦点顕微鏡による矢状断観察例(左)と、

微分干渉像との合成画像(右)。導入された細胞は組織浅部に限局した分布を示していた。スケール: 100um

候補 A の組織内共導入は候補 B と同様、安定していなかった。

これに併せ、今回合成した siRNA に化学修飾 (6-FAM) を施し、組織内での局在の確認も試みたが、組織内の蛍光局在の確認はできなかった。

なお、舌粘膜、特に上皮部の細胞においては、今回のエレクトロポレーション法による遺伝子導入の過程で舌組織の構成細胞のバイアビリティが著しく低下し、器官培養途上で層状に脱離する事があった。特に穿孔パルス(図3左)の設定によってその影響が著しい。

また、蛍光タンパク質ベクター導入後72時間において蛍光減弱が見られ、培養組織のバイアビリティの低下とダメージが見られた。これはLEDイルミネータに起因する可能性が示唆される。

今回得られたラット胎仔舌粘膜組織へのエレクトロポレーション法による siRNA 及び蛍光タンパク質に関する導入と動態・形態学的観察に関するデータに関しては現在、論文投稿の準備を行っている所であるが、エレクトロポレーション法のパラメータ、あるいは効率性の高い導入方略の検討なども含め、さらなる改善が必要とされる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2件)

Yoshimura K, Nashida T, Mikami M, Kageyama I. Morphological evaluation of transfection in rat embryonic organ-cultured lingual tissue by the *in vitro* electroporation method.

2015年6月6日 日本歯科大学歯学会大会

Yoshimura K, Nashida T, Mikami M, Kageyama I. An evaluation of transfection in rat embryonic organ-cultured lingual tissue by the *in vitro* electroporation method

2014年9月25~27日 歯科基礎医学会総会

6. 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

(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

三上 正人 (MIKAMI MASATO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号: 90173997