

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19634

研究課題名(和文)自己組織化アンカーおよびトリガー分子の同定と人工的器官形態制御法の開発

研究課題名(英文)Controlling of organ morphology by anchor proteins in regenerative organogenesis

研究代表者

中村 卓史(Nakamura, Takashi)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90585324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、発生中マウス歯胚からsingle-cell RNAシーケン斯拉イブラリーを構築し、得られたデータをコンピューター上で器官マッピング再構築し、歯原性細胞の遺伝子発現プロファイリングを行った。その結果、歯原性上皮細胞のカテゴリ化に成功し、その中でギャップジャンクション蛋白であるコネキシン43(Cx43)の発現に注目した。そしてCx43蛋白発現はマイクロRNA-1(miR-1)の制御下にあり、miR-1が歯の発生過程においてCx43の翻訳を阻害し、歯原性上皮細胞の増殖を負に制御していることを見出した。さらにその負の制御はヘミチャネル型Cx43によるATP放出によることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、自己組織化する細胞集団からsingle-cell RNAシーケン斯拉イブラリーを構築し、得られたデータをコンピューター上で器官マッピング構築後、マッピング構築されたSingle-cell RNAシーケンズデータを解析し、細胞外基質蛋白とそれらのインテグリンなどの受容体、細胞接着因子、細胞間結合蛋白、細胞増殖や分化誘導に関わる分泌系増殖因子とそれらの受容体に注目し、構造的アンカー分子と組織分化のトリガー分子の同定を目指す。再生した器官が機能するに十分な大きさ、形態を兼ね備えさらには組織構成細胞のマッピングが適切に管理する技術があれば、より高度な器官再生医療が可能となる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we constructed a single-cell RNA sequence library from developing mouse tooth germ. We performed the rebuild the data on computer-based organ mapping, and performed individual gene expression profiling of dental epithelial cells. As a result, we succeeded in categorizing a variety of dental epithelial cells, and focus on the expression of gap junction protein connexin 43 (Cx43). We found that microRNA-1 (miR-1) is involved in Cx43 protein expression, and miR-1 inhibits Cx43 translation during tooth development and negatively regulates the proliferation of dental epithelial cells. Furthermore, the negative regulation in cell proliferation was associated to ATP release by the formation of hemi-channel Cx43 in differentiating dental epithelial cells with the modification of the cellular localization of Cx43.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：エナメル芽細胞 ギャップジャンクション エピプロフィン Single cell RNA-seq 器官形成 マイクロRNA 歯の発生

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚、毛包、腸管上皮などは組織内に存在する幹細胞が、幹細胞の自己複製と組織構成細胞となる娘細胞の産生を行いながら組織機能を維持している。組織内に存在している幹細胞を応用した再生研究が、歯科医学研究の中で注目を集めている。組織障害や損傷部に幹細胞を用いた治療を考えた場合、患部に応用した幹細胞が必要な細胞集団に分化し、元の組織へ再構築し改めて機能的な組織を再構成していくのが現在の再生療法である。この手法で歯胚や涙腺などの再構成器官が機能的に再生させることに成功している。しかしながら、再生させる器官の形態、構造や大きさなどを制御する方法は確立されていない。

### 2. 研究の目的

再生した器官が機能するに十分な大きさ、形態を兼ね備えさらには組織構成細胞のマッピングが適切に管理する技術があれば、より高度な器官再生医療が可能となる。本研究では、器官形成のモデルとして歯胚および唾液腺を用い、上皮細胞を酵素処理にて個々の細胞に分離し、培養すると自己組織化する培養系を利用する。

自己組織化する細胞集団から single-cell RNA シークエンスライブラリーを構築し、得られたデータをこれまでに報告されている器官形成過程での組織の分化 マーカー遺伝子の発現パターンをベースとして、コンピューター上で器官マッピング構築し完成させる。本研究の目的は、マッピング構築された Single-cell RNA シークエンスデータを解析し、細胞外基質蛋白とそれらのインテグリンなどの受容体、細胞接着因子、細胞間結合蛋白、細胞増殖や分化誘導に関わる分泌系増殖因子とそれらの受容体に注目し、構造的アンカー分子と組織分化のトリガー分子の同定を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 出生後 1 日齢の ICR マウス発生歯胚を DispaseI で酵素処理をした後、上皮細胞にコラーゲン分解酵素およびトリプシン酵素処理を行い 0.04%BSA を含んだ PBS で洗浄し 70 マイクロのセルストレーナーに通しシングルセルに分離した。その後各細胞をシングルセルから DNA を増幅して再現性の高いライブラリーを作製し解析を行った。シングルセル RNA-Seq 解析を行い組織内でのアンカー蛋白や細胞分化を制御する転写因子等の局在と発現強度解析を行った。

(2) 歯原性上皮細胞の細胞株としてラット由来の SF2 細胞を用いた。細胞増殖は、WST アッセイ (Dojindo) および 5-ブromo-2'-デオキシウリジン (BrdU) の取り込みを指標に評価した。

(3) 胎生 16.5 日 (E16.5)、出生後 1 日 (P1)、および出生後 3 日 (P3) に ICR マウス臼歯から mirVana miRNA isolation kitTM システム (Ambion) を使用して、micro RNA を精製した。歯胚を Micro SmashTM (TOMY) を用いてホモジナイズし、miRVanaTM miRNA 分離キット (Ambion) を使用して、micro RNA を精製した。miRNA cDNA は、Mmu-miR-1 とともに TaqManTM miRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を使用して合成した。Applied Biosystems StepOneTM リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) で TaqManTM PCR プロトコルを使用して、リアルタイム PCR を実行した。RT-PCR 解析のため Total RNA は、ISOGEN II 試薬 (ニッポンジーン) を使用し調整後、SuperScript®VILO™ Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用した逆転写に 1 µg のトータル RNA を使用して cDNA を合成し、これを遺伝子特異的プライマーによる PCR 反応のテンプレートとして使用した。

(4) 発生歯胚の免疫染色には出生後 1 日齢 ICR マウスから組織切片を調整し Connexin 43 特異的ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、E-カドヘリン特異的ウサギ抗体 (BD Pharmingen)、抗エピプロフィン特異的ウサギ抗体を用いて免疫染色を行った。1 次抗体は、Alexa 488 または Alexa 594 結合二次抗体 (Thermo Fisher Scientific) によって可視化され、核染色は、Hoechst 色素 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

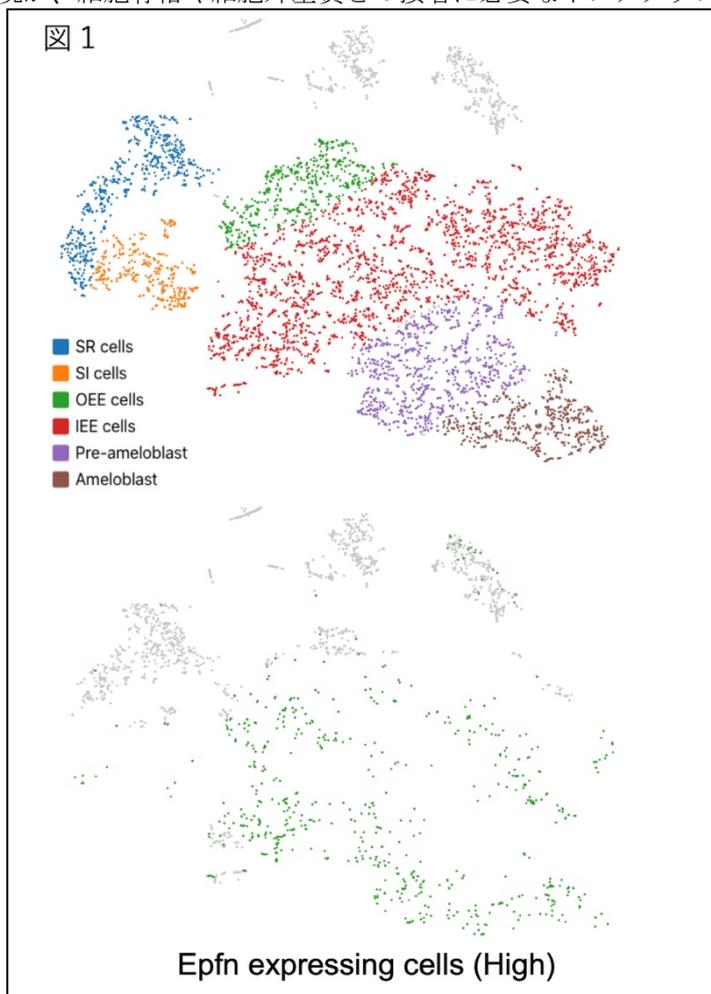
(5) SF2 を用いて細胞からの ATP 放出量を測定した。ATP の検出は、ATP 検出キット (Promega) およびルミノメーターによって測定した。具体的には miR-1 のノックダウンまたは scramble プローブのいずれかをトランスフェクトした SF 細胞を、96 ウェルプレートに  $1 \times 10^3$  細胞/ウェルで播種した。24 時間後に上清を収集し、ルシフェラーゼ/ルシフェリンで反応後 GloMax® 20/20 ルミノメーター (Turner BioSystems) で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) Single cell RNA-Seq データ解析

本出生後 1 日齢発生途中の歯胚の細胞を個々の細胞に分離し、single cell RNA-seq 解析を行った。Single cell RNA-seq の結果から、上皮のマーカーであるサイトケラチン 5, サイトケラチン 14 を発現している細胞をコンピューター上で抽出し、それらの細胞が発現している遺伝子発現解析を行った。その結果、これまで報告されているようなアメロブラスチン、アメロゲニン、エピプロフィン (Epf) などのエナメル芽細胞マーカー遺伝子が発現しており、発生歯胚から得られた single-cell RNA-seq の結果が信頼できるデータであると判断した。図 1 の上図は得られた RNA-Seq データから、歯原性上皮細胞の各分化細胞の複数の遺伝子マーカー発現を指標として、外エナメル芽細胞、中間層細胞、エナメル芽細胞、星状網細胞などに *in silico* で分離した物である。この結果から、エナメル芽細胞や前エナメル芽細胞に分化した歯原性細胞群に強く発現しているアンカー分子をスクリーニングした。下図はエピプロフィン (Epf) を強く発現している細胞

胞群を示し、Epfm はエナメル芽細胞や前エナメル芽細胞に発現していた。この結果を解析し細胞間結合蛋白であるコネクシン43 (Cx43) が歯原性上皮に強く発現していることが明らかとなり、コネクシン43をコードする Gap junction protein alpha 1(Gja1)の発現が、細胞骨格や細胞外基質との接着に必要なインテグリン発現と共発現していた。



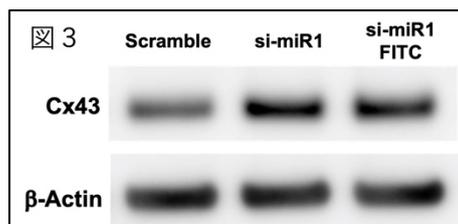
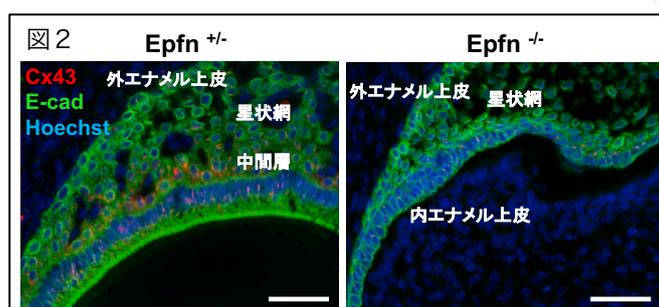
### (2) Epiprofin 遺伝子欠損 (Epfm -/-) マウス歯胚での Cx43 発現

Epiprofin は歯原性上皮細胞のエナメル芽細胞への分化決定を行う転写因子で、Epfm -/-マウスではエナメル欠失、歯数異常など歯の発生に障害を有する。そこで Epfm -/-マウス歯胚での Gja-1 遺伝子発現を RT-PCR で、Cx43 蛋白の発現を免疫染色法を用いて検討した。その結果 Epfm -/-マウス歯胚において Gja-1 遺伝子発現が減弱し、Cx43 蛋白の発現も低下していた (図2、引用文献から改編)。Epfm -/-マウスにおける Gja-1 およびその翻訳蛋白である Cx43 の発現低下機構を解析し、TaqMan 解析からマイクロ RNA-1 (miR-1) が歯の発生過程でダイナミックに発現が変化していることを発見した。さらには miR-1 が Gja-1 の転写後に作用し Cx43 発現を減弱させていることが明らかとなった。

### (3) miR-1 による Cx43 発現制御

miR-1 のターゲットの1つは、Cx43 ギャップ結合タンパク質をコードする Gja-1 であり、miR-1 は、いくつかの異なる細胞タイプで Gja-1 の Cx43 への翻訳を妨げる。歯原性上皮細胞株 SF2 を用いて、Cx43 蛋白産生に対する miR-1 機能を miR-1 ノックダウンシステムを使用し分析した。Small interfering miR-1 (si-miR-1) と scramble (コントロール) の取り込みの効率は、総細胞の約 70%であった。コントロール (図3 : scramble) での Cx43 蛋白発現は、si-miR1 または si-miR1-FITC コンジュゲートプロープによる miR-1 ノックダウン細胞において発現増強が観察された (図3、引用文献から改編)。Gja-1 が心筋細胞で報告されている結果同様、歯原性上皮細胞においても miR-1 の標的遺伝子であることを示唆している。

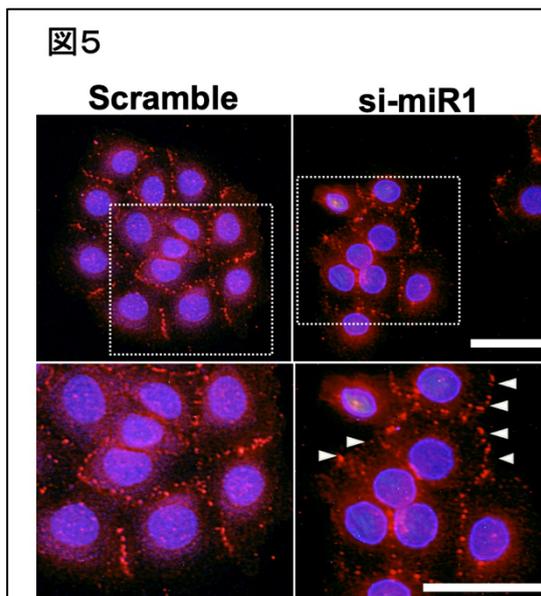
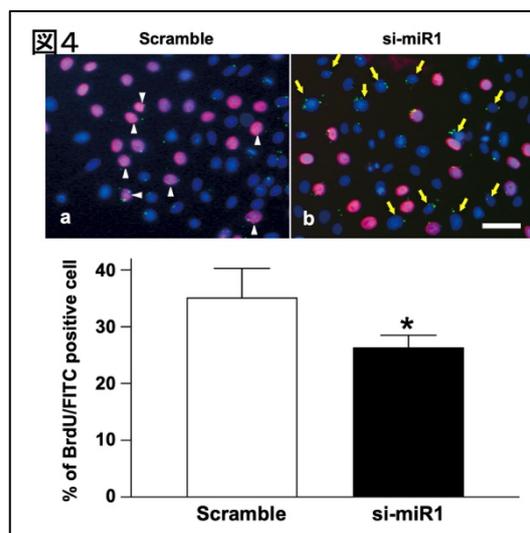
Cx43 ギャップ結合タンパク質をコードする Gja-1 であり、miR-1 は、いくつかの異なる細胞タイプで Gja-1 の Cx43 への翻訳を妨げる。歯原性上皮細胞株 SF2 を用いて、Cx43 蛋白産生に対する miR-1 機能を miR-1 ノックダウンシステムを使用し分析した。Small interfering miR-1 (si-miR-1) と scramble (コントロール) の取り込みの効率は、総細胞の約 70%であった。



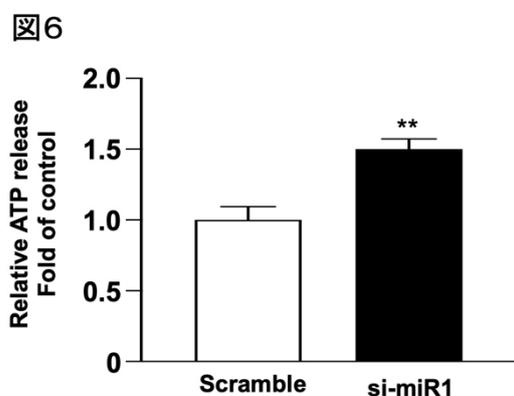
### (4) 歯原性上皮細胞増殖における miR-1 の機能

miR-1 の細胞機能を調べるために、si-miR1 による miR-1 発現をブロックすることにより、細胞増殖をチェックした。si-miR1 は、scramble コントロールオリゴをトランスフェクトした細胞と比較して、SF2 細胞増殖活性が著しく低下していた。しかし、トランスフェクションした細胞のみが miR1 のノックダウンが起こり、結果として Cx43 を発現する。そのため、si-miR1 を取り込んだ細胞のみを FITC で検出し、その細胞の増殖能を BrdU の取り込みを指標として解析を行った。BrdU / FITC 二重陽性細胞とプロープを組み込んだ FITC 陽性細胞の数をカウントしたところ、Scramble-FITC 陽性細胞の約 35%が BrdU (赤) 陽性であった (図4、矢頭、引用文献から改編)。一方、miR-1 ノックダウン FITC プロープを備えた細胞のほぼ 25%に BrdU (赤色) が組み込まれて

おり、miR-1 のノックダウンにより BrdU / FITC 二重陽性細胞の比率が約 10%減少していた (図4、矢印、引用文献から改編)。これらの結果から、miR-1 の発現が細胞増殖を制御することに必要であり、miR-1 が細胞増殖と正の相関があることを示唆している。



(5) 歯原性上皮細胞における miR-1 による Cx43 細胞局在の調節  
miR-1 のノックダウンは Cx43 の発現を誘導し、歯原性上皮細胞株である SF2 で誘導された Cx43 の細胞局在を検討した。scramble (コントロール) 細胞では、Cx43 は細胞間接合部の細胞膜に発現しており、Cx43 がギャップ接合部を形成していることを示している (図5、引用文献から改編)。一方、miR-1 ノックダウン SF2 細胞では、Cx43 の局在化は、細胞膜接合部だけでなく、他の細胞に隣接していない側の細胞膜でも確認され、miR-1 のノックダウンにより誘導された Cx43 がギャップ接合部だけでなくヘミチャネルも形成したことを示唆している (図5、引用文献から改編)。



(6) Cx43 のヘミチャネル形成と ATP 放出機構

培養アストロサイトは、ギャップジャンクションヘミチャネルを介して二価カチオンフリー培地でグルタミン酸と ATP を放出する報告があることから si-miR1 または scramble コントロールプローブをトランスフェクトした歯原性上皮細胞からの ATP 放出を測定した。miR-1 ノックダウン歯上皮細胞からの ATP の細胞外放出は、scramble プローブをトランスフェクトしたコントロール細胞と比較して劇的に増加した (図6、引用文献から改編)。miR-1 のノックダウンによるヘミチャネル Cx43 誘導と一緒に撮影すると、これらの結果は、miR-

1 が Cx43 の生成と Cx43 ヘミチャネルの形成を制御することにより細胞増殖を調節することを示唆している。

<引用文献>

① Nakamura, T., Iwamoto, T., Nakamura, H.M., Shindo, Y., Saito, K., Yamada, A., Yamada, Y., Fukumoto, S., and Nakamura, T. Regulation of miR-1-Mediated Connexin 43 Expression and Cell Proliferation in Dental Epithelial Cells, *Front Cell Dev Biol.* 8(156), 2020 doi: 10.3389/fcell.2020.00156

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chiba Yuta, He Bing, Yoshizaki Keigo, Rhodes Craig, Ishijima Muneaki, Bleck Christopher K. E., Stempinski Erin, Chu Emily Y., Nakamura Takashi, Iwamoto Tsutomu, de Vega Susana, Saito Kan, Fukumoto Satoshi, Yamada Yoshihiko	4. 巻 294
2. 論文標題 The transcription factor AmeloD stimulates epithelial cell motility essential for tooth morphology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3406 ~ 3418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Tomoaki, Iwamoto Tsutomu, Nakamura Hannah M., Shindo Yuki, Saito Kan, Yamada Aya, Yamada Yoshihiko, Fukumoto Satoshi, Nakamura Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Regulation of miR-1-Mediated Connexin 43 Expression and Cell Proliferation in Dental Epithelial Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00156	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuta Chiba, Keigo Yoshizaki, Tomoko Ikeuchi, Kan Saito, Craig Rhodes, Tsutomu Iwamoto, Takashi Nakamura, Yoshihiko Yamada and Satoshi Fukumoto
2. 発表標題 The G-protein coupled receptor Gpr115 is essential for enamel mineralization via regulation of pH homeostasis
3. 学会等名 NIH-Japan-JSPS symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Nakamura, Satoshi Fukumoto, Minoru Wakamori, and Yoshihiko Yamada
2. 発表標題 Roles of Epiprofin in dental epithelial cell differentiation
3. 学会等名 International Symposium for Interface Oral Health Science 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuta Chiba, Keigo Yoshizaki, Tomoko Ikeuchi, Kan Saito, Craig Rhodes, Tsutomu Iwamoto, Takashi Nakamura, Yoshihiko Yamada and Satoshi Fukumoto
2. 発表標題 The G-protein coupled receptor Gpr115 is essential for enamel mineralization via regulation of pH homeostasis
3. 学会等名 NIH-Japan-JSPS symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	中村 はな  (Nakamura Hannah)  (30385827)	東北医科薬科大学・医学部・助教    (31305)	