

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24074

研究課題名(和文) 間葉細胞凝集に関わるmicroRNAを用いた歯の運命決定制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of cell fate-determining factors using microRNAs involved in mesenchymal cell aggregation

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) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮-間葉相互作用は、歯などの器官の発生に重要な役割を持つ。我々は、上皮-間葉相互作用における分子メカニズムを明らかにするため、歯に特異的な転写開始点をCAGE法を用いて検索し、歯に特異的に発現するmicroRNA-875(miR875)を発見した。本研究では、miR875は歯の発生初期の間葉細胞に特異的に発現し、miR875を遺伝子導入した歯原性間葉細胞が、PDGFシグナル経路下で上皮への凝集を示すことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

将来の器官再生技術の確立のため、器官発生における分子メカニズムを明らかにすることは重要である。本研究では、上皮-間葉相互作用に着目し、歯をモデルとした機能解明を図った。CAGE法を用いた網羅的解析により、歯に特異的な転写開始点を発見し、non-coding RNAである、miR875を同定した。本因子は上皮-間葉相互作用における間葉細胞の凝集に重要な役割を果たし、歯の形成に関わっている可能性を発見した。本発見は、将来の器官再生技術に寄与できる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Epithelial-mesenchymal interaction has critical roles for organ development including tooth. To identify the molecular mechanism of this interaction, we explored the specific transcriptional start sites (TSSs) of tooth organs using cap analysis of gene expression (CAGE). We identified a tooth specific TSS, which codes microRNA-875 (miR875). MiR875 is specifically expressed in dental mesenchyme during the early stage of tooth development. In this study, we found that mDP cells transfected with miR875 showed that cell migration toward dental epithelial cells was significantly induced by miR875 via the PDGF signaling pathway.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯 上皮-間葉相互作用 microRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯は肺、唾液腺、腎臓および毛などの器官と同様に、上皮-間葉相互作用によって形成されることが知られており、様々なシグナル伝達が重要であることが報告されているが、器官再生の厳密な制御は未だ困難な状況にある。

2. 研究の目的

歯は、上皮-間葉相互作用により形成される器官であり、毛、腎、肺および唾液腺と同様に、上皮と間葉が相互にシグナルの受け渡しを行うことで形態形成が行われることが知られている。歯における上皮の肥厚とそれに引き続く間葉の凝集は、PDGF 受容体を発現した神経堤由来間葉細胞が陥入した上皮へと凝集することが重要であるとされているがその詳細なメカニズムは明らかではない。我々はこれまでの研究で、これら器官は発生初期には同様のシグナルカスケードを介して行われている可能性を着想し、発生初期のそれぞれの器官の遺伝子発現網羅的解析を、トランスクリプトーム解析である Cap Analysis of Gene Expression (CAGE)法を用いて行った。その結果、歯の発生初期に特異的に発現する遺伝子からクロモソーム 15qD1 領域に位置する microRNA 875 (miR875)を同定した。そこで、miR875 の機能解析を目的として、歯をモデルとした形態形成機構の解明を行った。

3. 研究の方法

CAGE 解析

すべての動物実験プロトコールは九州大学動物実験倫理審査のもと実験を遂行した。胎生 14 日齢マウス (E14)歯胚および胎仔から total RNA を抽出し、Bioanalyzer (Agilent)を用いて RNA quality を確認し、RIN number 8.5 以上のサンプルを用いて解析を行った。CAGE 解析は DNAFORM 社 (横浜、日本)に依頼し、解析を行い、遺伝子発現解析は Subio Platform, version1.18 を用いて行った。

In situ hybridization

E14 マウスから取り出した歯胚は 4%PFA にて固定後、Cryostat (CM1800, Leica)にて凍結切片を作成した。作成した切片を、miRCURY LNA を用いて hybridization を行い、DIG にてラベリングした後、anti-DIG 抗体を用いて可視化を図った。

発現ベクター作成

Prrx1 および Prrx2 発現ベクターを Gateway cloning system (Life Technologies)を用いて行った。ストップコドンを除いた Prrx1 および Prrx2 の cDNA を用いて pENTR/D-TOPO ベクターにクローニングを行い、LR recombination を用いて V5-His Tag 標識した発現ベクターを作製した。

細胞培養および遺伝子導入

マウス歯胚の間葉細胞より樹立した mDP (mouse Dental Papilla)細胞を、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F-12、10% fetal bovine serum (Gibco/Life Technologies)、1% penicillin/streptomycin (Gibco/life Technologies)を用いて 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。10 ng/ml の mouse recombinant protein PDGF-AA および PDGF-BB (#315-17-2UG, #315-18-2UG, PeproTech)を添加し、Scratch assay を行った。Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific)を用いて、既存のプロトコールに従って遺伝子導入を行なった。

Luciferase assay

目的の配列を pGL4.15 vector (Promega)に挿入し Luciferase レポーターを作成した。配列に変異を加えたレポーターについては QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies)を用いて作成した。内因性のコントロールとして pRL-TK vector を用い、ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて Berthold Technologies の光測定装置にて測定した。

細胞凝集実験および免疫組織化学染色

中央にゴム製ストッパーを配置した培養皿に mDP 細胞を播種後、mimic-miR875-5p (MSY0004937, Qiagen)およびコントロール miRNA (YM00479902, Qiagen)の遺伝子導入を行った。1 日後にゴム製のストッパーを除去し、E14 マウス歯胚から分離した上皮を中央部に置き、mDP 細胞の上皮への凝集能を評価した。また、コラーゲンビーズ(Koken)に PDGF-AA (1 ng/μl)を添加し 4°C で 24 時間放置した後に PBS で 5 回洗浄し PDGF-AA をコラーゲンビーズに吸着させた。同ビーズを培養皿中央に配置し、細胞凝集実験を行った。6,12,24 時間後に keratin 14 (SC-17104, 1:500; Santa Cruz)および vimentin (SC-7557-R1, 1:500, Santa Cruz)の一次抗体を添加後、Alexa 488/Alexa 594 fluorescent dye (Life Technologies)を複合させた二次抗体と室温で 1

時間反応させた。免疫組織化学染色については PRRX1 に対する一次抗体 (NBP1-06067, 1:500, Novus Biologicals) を用い、C2 confocal microscope (Nikon) and analyzed with NIS-Elements AR software, version 4.00 (Nikon) を用いて撮影を行った。

4. 研究成果

① 歯における mir875 の発現パターン解析

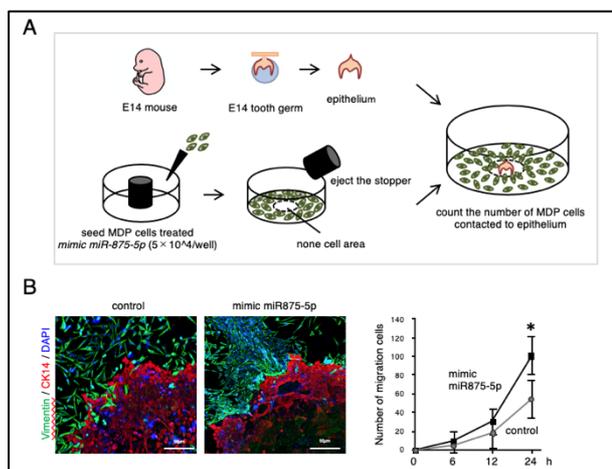
CAGE 法を用いて歯に特異的な transcription start sites (TSSs) を網羅的に解析し、歯に特異的に発現する遺伝子群の同定を図った。その結果、歯に特異的な TSS の一つとして、クロモソーム 15qD1 領域にピークを認めた。同領域は mir599 および mir875 をコードしている可能性があり、どちらが発現しているか確認する必要があった。そこで、器官発生初期の臓器ごとの qPCR を行ったところ miR875 が歯に特異的に発現していることが確かめられた。以上の結果から、CAGE 法にて認めた TSS は miR875 のピークである可能性が考えられた。さらに、歯胚の発生段階ごとの qPCR を行ったところ歯胚発生初期の E14 で発現が最も高く、その後、発生が進むに従って減少していた。そこで E14 歯胚の上皮および間葉組織ごとの qPCR を行ったところ miR875 は間葉に強く発現しており、in situ hybridization においても歯乳頭の間葉細胞に局在を認めた。

② Prrx1/2 による miR875 の転写制御

CAGE 解析により予測した miR875 のプロモーター領域に結合しうる転写因子を、JASPAR データベースを用いて検索したところ、Prrx1/2 が結合する可能性が考えられた。Prrx1/2 は歯の発生初期に発現するホメオボックス転写因子であり、歯の形成に重要であることが報告されている。Prrx1 の免疫組織化学染色を行ったところ、miR875 と同じく E14 歯胚の間葉に発現を認め、発生段階後ごとの qPCR において発生初期で発現が最も高く、その後は発現が減少していた。Prrx1/2 が miR875 の転写に与える影響を確認するため、miR875 のプロモーター領域の配列を含むルシフェラーゼレポーターを作成し、Prrx1/2 と共に遺伝子導入したところ、両者ともにコントロールと比較してルシフェラーゼ活性の上昇を認めた。さらに、Prrx1/2 を遺伝子導入したところ、miR875 の mRNA レベルでの上昇を認めた。また、Prrx1/2 が結合すると予想されるプロモーター領域の配列 (TAATTA) に変異を挿入したルシフェラーゼレポーターを作成し、Prrx1/2 と共に遺伝子導入したところ、変異導入群では、ルシフェラーゼ活性の上昇を認めなかった。これらの結果から Prrx1/2 は miR875 のプロモーター領域に直接結合し転写を制御している可能性が示唆された。これらの知見から、miR875 は Prrx1/2 転写因子の下流で歯の形態形成に重要な役割を及ぼす可能性が考えられる。

③ 間葉細胞凝集における miR875 の役割

In situ hybridization 法において miR875 は上皮に近接した歯乳頭の間葉細胞に局在していたことから、上皮-間葉相互作用に影響を及ぼす可能性が考えられたため、細胞遊走能の評価を行った (図 A)。歯の発生初期の上皮細胞を培養皿の中央に置き、上皮への遊走能を確認したところ、mimic miR875 を遺伝子導入した mDP 細胞では上皮細胞への凝集が認められた (図 B)。歯の上皮-間葉相互作用における間葉細胞の凝集には PDGF シグナリングの関与が知られている。そこで、PDGF シグナル下での細胞遊走を確認するため、培養皿中央部に PDGF-AA および PDGF-BB を添加したアガロースビーズを置いて、実験を行ったところ、miR875 遺伝子導入軍では、PDGF-AA への細胞遊走を認めた。これらの結果から、miR875 は、PDGF シグナリングの影響下で、間葉細胞の上皮への凝集を促進することで、歯の上皮-間葉相互作用において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。



以上の結果から、歯に特異的に発現する miR875 は、上皮-間葉相互作用において間葉細胞の凝集に関与し、歯の形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Funada Keita, Yoshizaki Keigo, Miyazaki Kanako, Han Xue, Yuta Tomomi, Tian Tian, Mizuta Kanji, Fu Yao, Iwamoto Tsutomu, Yamada Aya, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 microRNA-875-5p plays critical role for mesenchymal condensation in epithelial-mesenchymal interaction during tooth development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4918
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61693-w	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宮崎佳奈子、吉崎恵悟、傅堯、韓雪、鮎田啓太、田甜、湯田智美、水田敢士、高橋一郎
2. 発表標題 PKP 1 の歯原性上皮細胞における密着結合因子ZO-1の局在制御機構
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎田啓太、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、韓雪、田甜、湯田智美、水田敢士、傅堯、高橋一郎
2. 発表標題 microRNA-875-5pはPDGFシグナル経路を介して歯の上皮-間葉相互作用を制御する
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鮎田啓太、吉崎恵悟、宮崎佳奈子、韓雪、湯田智美、田甜、水田敢士、傅堯、福本敏、高橋一郎
2. 発表標題 microRNA875-5pは歯の発生においてPDGFシグナルを介して上皮-間葉相互作用を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田甜、吉崎恵悟、韓雪、宮崎佳奈子、鮎田啓太、湯田智美、水田敢士、傅堯、福本敏、高橋一郎
2. 発表標題 Nkx2-3は歯の発生においてEDA/EDARシグナル伝達経路を介してp21の転写制御を行い歯の咬頭形成を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 傅堯、宮崎佳奈子、吉崎恵悟、湯田智美、韓雪、鮎田啓太、田甜、水田敢士、福本敏、高橋一郎
2. 発表標題 デスモゾーム構成因子PKP 1は歯原性上皮細胞の密着結合においてZO-1の局在を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tian Tian, Keigo Yosizaki, Kanako Miyazaki, Keita Funada, Tomomi Yuta, Kanji Mizuta, Yao Fu, Ichiro Takahashi.
2. 発表標題 Cyclophosphamide, an anti-cancer drug, disrupts tooth germ development by inhibiting epithelial cell proliferation and differentiation.
3. 学会等名 第9回国際矯正歯科会議世界大会 (web開催) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanji Mizuta, Keigo Yoshizaki, Kanako Miyazaki, Keita Funada, Tomomi Yuta, Tian Tian, Yao Fu, Ichiro Takahashi.
2. 発表標題 Nephronectin regulates ameloblast differentiation through its RGD domain.
3. 学会等名 第9回国際矯正歯科会議世界大会(web開催) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yao Fu, Kanako Miyazaki, Keigo Yoshizaki, Keita Funada, Tomomi Yuta, Tian Tian, Kanji Mizuta, Ichiro Takahashi.
2. 発表標題 A tooth specific Lypd1 expressed in dental mesenchyme regulates odontoblast differentiation in tooth development.
3. 学会等名 第9回国際矯正歯科会議世界大会(web開催) (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究協力者	吉崎 恵悟 (Yoshizaki Keigo) (10507982)		

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