

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20373

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた歯根及び頭蓋の疾患モデルの作成と解析

研究課題名(英文) Analyses of a mouse model for craniofacial disease generated by genome editing

研究代表者

吉本 由紀 (Yohimoto, Yuki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・特任助教

研究者番号：40735304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題を通して、頭蓋骨及び歯根や歯周靭帯の形成が異常となる疾患モデルマウスを作成した。さらに交配により疾患モデルマウスにおける縫合部や歯根部の形成異常をレポーター発現によって可視化できる解析系を立ち上げることができた。また、Scxを発現する頭蓋の縫合部及び歯根部の細胞に分化するとGFPを発現するScxGFP iPS細胞を樹立し、縫合や歯根部を形成する細胞の分化経路を探索する手段を樹立した。これらの解析系は、今後、顎顔面の形成過程における解析や、病態発症のメカニズムの探索を行うために必須であり、治療や再生医療に役立つ基礎的知見の集積につながる。

研究成果の概要(英文)：During this research, I generated model mouse lines for craniofacial disease. By crossing these mice with reporter ScxGFP mouse, I also established an analysis model in which abnormal formation of suture and tooth are visualized by reporter expression. Moreover, I established reporter iPS cell lines, ScxGFP iPSCs, that express GFP when they differentiate into Scx expressing cells such as suture cells, periodontal ligaments, and odontoblasts. ScxGFP iPSCs are tools for exploring the differentiation pathway from undifferentiated mesenchymal cells to differentiated suture and tooth root cells. These tools are necessary to analyse craniofacial development and to investigate molecular mechanisms for pathophysiology of diseases. These analyses must be consequence to accumulation of basic knowledge for clinical treatment and regeneration medicine.

研究分野：分子生物学

キーワード：TALEN Scleraxis Msx2 歯周靭帯 歯根 iPS

1. 研究開始当初の背景

硬組織の連結部は、線維性連結、軟骨性連結、滑膜関節に分類される。顎顔面領域には、歯周靭帯や、頭蓋の縫合などの線維性連結が集中している。歯周靭帯は歯根のセメント質と歯槽骨を物理的に連結するだけでなく、正常な歯根の発達に欠かせない役割を果たしていると考えられている。齧歯類の歯やヒトの乳歯の歯冠部の形成は胎生期に始まり、誕生時にはほぼ完了する。生後、歯冠形成が完了した後、歯根形成が開始し、萌出後も継続する。同様に、頭蓋縫合部も誕生後に成熟し閉鎖する。これらの組織は生後も構築が大きく変化するため、成長に伴って、機能性、審美性が大きく損なわれることから、治療法に対する研究が活発である。さらに歯根は、歯周病、外傷、腫瘍などが原因で損傷されることも多く、再生医療の重要な標的となっている。しかしながら、胎生期に解析可能な歯冠部とは異なり、硬組織が存在する領域で行う生後の顎顔面領域の解析には、非脱灰で硬組織を薄切する技術の導入が必要で、容易ではなかった。

2. 研究の目的

ゲノム編集ツールである TALEN、CRISPER/Cas9 を用いて、マウス ES または iPS 細胞に、歯根や頭蓋縫合部形成に異常をもたらす遺伝子変異を導入し、変異アレルを有する細胞株やマウスを樹立する。樹立した細胞株や変異マウスの表現系を解析することで、疾患の原因や治療につながる分子メカニズムを探索する。

3. 研究の方法

①iPS細胞の作成

マウスの 12~14 日胚の胎児由来線維芽細胞 (MEF) を分離し初期化に用いた。Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Myc を組み込んだ、エピソーマルベクターとセンダイウイルスベクターの両方を用いて、初期化の条件を検討した。エピソーマルベクターを用いた方法では、ベクターの導入にエレクトロポレーション法を用いた。センダイウイルスベクターを用いた方法では、ウイルス液の濃度を MEF 1x10⁶ 個に対して MOI が 2.5~5 となるように MEF に感染させた。

②iPS細胞のアルカリフォスファターゼ染色と免疫染色

iPS細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色及び、マウス ES 細胞が発現するマーカー分子である SEAA-1、Oct4、Nanog、Sox2 に対する抗体を用いた免疫染色を行った。ALP 染色は、発色基質として NBT-BCIP を用いた。免疫染色は、2%スキムミルクを用いてブロッキングを行ったのち、一次抗体との反応を 4℃で 16 時間行い、PBS で洗浄後、Alexa Fluor 488 あるいは 594 を結合させた二次抗体を反応させ、

核をミジノフェニルインドールによって染色し可視化した。

③RT-PCR

マウス ES 細胞、MEF 及び iPS 細胞からトリゾール試薬を用いて RNA を抽出し、逆転写により cDNA ライブラリ作成後、センダイウイルス、KLF4、OCT3/4、SOX2、L-MYC に対するプライマーセットを用いて PCR を行い、初期化因子を組み込んだセンダイウイルスの残留を確認した。

③リアルタイム PCR

播種後二日後のコロニー形成した ES 細胞及び iPS 細胞、またコンフルエントになった MEF 細胞からトリゾール試薬にて RNA を抽出し、逆転写後、ES マーカー及び初期化因子である Myc、Klf4、Sox2、Oct3/4、Nanog、Fgf4、Gdf3、Ecat1、Esg1、E-Ras、Slc2a3、Cripto、Dax1、Rex1、Zfp296 に対するプライマーセットを用いて各細胞間の発現パターンを比較した。

④胚葉体の形成と in vitro での分化検出

ScxGFP iPS 細胞を非接着性のプレートに播種し形成した胚様体を 6 日目に接着性のプレートに移し、腱・靭帯や軟骨の形成に関与するトランスフォーミング成長因子 (TGF)- β 、Bone morphogenetic protein (BMP) 4、Growth differentiation factor (GDF) 8 をそれぞれ 10 ng/ml、100 ng/ml、100 ng/ml の終濃度で添加し、2 週間培養した。蛍光顕微鏡下で GFP の発現の有無と、アルシアンブルー染色にて軟骨基質の有無を検討した。

⑤遺伝子改変マウスの作成

TALEN を用いた欠失マウスの作成では、高活性型の Platinum TALEN mRNA を in vitro での逆転写により作成し、polyA を付加して精製したのちに、受精卵の細胞質に注入した。偽妊娠マウスの卵管内に受精卵を移植し、発生・出産させた。

⑥Msx2 欠失マウスの骨格標本の作成

新生仔マウスを回収し、99.5%エタノールで固定及び脱水後、皮膚を除去し、0.15%アルシアンブルー/20%酢酸/80%エタノール溶液で 1 日軟骨組織を染色した。20%酢酸/80%エタノール溶液で洗浄し、1%水酸化カリウム水溶液に浸漬した後、0.005%アリザリンレッド/1%水酸化カリウム水溶液で 24 時間処理することにより、骨組織を染色した。染色した試料は、1%水酸化カリウム水溶液で脱色処理をした後、20%グリセロール水溶液中で保管した。

⑦マウスの頭頸部のマイクロ CT 撮影

6 ヶ月齢のマウスを安楽死後、頭部の皮膚を除去し、SHIMADZU MICRO FOCUS 90CTS の装置を使用して CT 撮影を行った。撮影した画像を ImageJ にて再構成し、歯根部や頭蓋骨の

縫合部の断層解析を行った。

4. 研究成果

①*ScxGFP* Tg マウス由来の線維芽細胞からのレポーターiPS細胞の樹立

Scx の発現領域において特異的に GFP を発現するレポータートランスジェニックマウス、*ScxGFP*マウスのMEFの初期化を検討した結果、エピソーマルベクターを用いた方法では安定してiPS細胞のコロニーが得られなかった。センダイウイルスベクターを用いた方法では、27ラインのiPS細胞が得られた。このうち3ラインのiPS細胞株を継代し、系統として樹立した(図、上段)。これらの細胞株は継代が10回目に達した時点で、RT-PCRを行ってセンダイウイルスの脱落を確認した。

②*ScxGFP* iPS細胞の未分化性の確認

得られたiPS細胞株は3ライン全て、形態はマウスES細胞と同様ナープ型のコロニーを形成し、増殖性も良好であった。ALP染色及び、マウスES細胞が発現するマーカー分子であるSEAA-1、Oct4、Nanog、Sox2の抗体を用いた免疫染色に対しても全て陽性を示し、これらのiPS細胞株が未分化性を保持していることが示唆される。

③ES細胞マーカーの発現の確認

樹立した*ScxGFP* iPS細胞3系統における初期化因子とES細胞マーカーの発現をリアルタイムPCRを行って調べた。初期化因子のうち、*Myc*の発現はMEFと比較すると低下していた。他のESマーカーの発現は、ESの発現と類似したパターンを示していた。

④iPS細胞から腱・靭帯細胞系譜への分化誘導系の探索

非接着性のプレートに*ScxGFP* iPSCを播種すると、いずれの系統も約2日後には球状の胚様体を形成した(図、下段)。胚様体を6日目に接着性のプレートに移し、*in vitro*での分化能を調べると、液性因子であるTGF- β 、BMP4、GDF8が存在する場合もそうでない場合も、心筋や軟骨細胞等の間葉系細胞への分化を確認しているが、蛍光顕微鏡下で確認出来る強度のレポーター発現を確認できていない。マウス生体内では確認できる、*ScxGFP*陽性細胞の分化誘導は、*in vitro*においては容易ではないことが判明した。

⑤ゲノム編集技術を用いた*Msx2*欠失マウスの樹立

ポリAを付加した高活性型のPlatinum TALEN mRNAを受精卵の細胞質に顕微注入して得られた新生マウス52個体のうち、19個体のゲノムにおいて非相同末端結合による修復過程で欠失が導入されていた。フレームシフトが観察された10個体の中で、32及び31塩基が欠失し、*Msx2*の機能に必要であるホメオドメインを含む大部分が翻訳されない個体を

野生型マウスと交配し2系統の*Msx2* KOマウスとして樹立した。いずれの系統においても、ホモマウスでは若齢期に全身の被毛が欠失する表現型や、歯の低形成を確認しており、モデルマウスの作成が達成された。

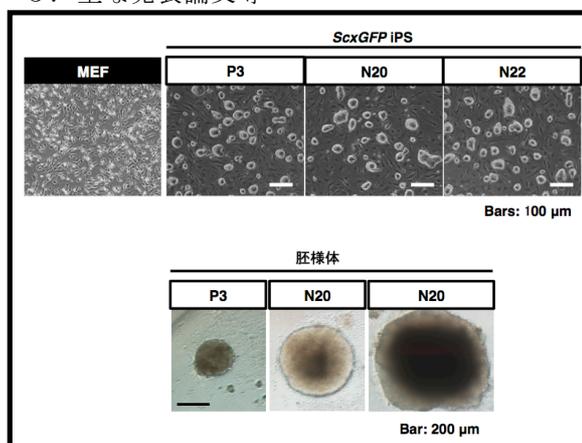
⑥*Msx2*欠失マウスの骨格の解析

新生仔マウスの骨格標本を、アルシアンブルーとアリザリンを用いた染色によって作成し、同復の野生型及びヘテロマウスと比較して検討した。ホモマウスにおいては、頭蓋骨の形成不全が観察された。

⑦マイクロCTを用いた顎顔面領域の解析

6ヶ月齢の顎顔面領域の表現系に関しては、頭頸部のマイクロCT撮影を行って解析した。単純X線撮影では解析不可能である、ホモマウスにおける頭蓋骨の形成不全や、歯冠部及び歯根部の形成不全を確認した。

5. 主な発表論文等



(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(欧文)

1. Shukunami C*, Yoshimoto Y, Takimoto A, Yamashita H, Hiraki Y. Molecular characterization and function of tenomodulin, a marker of tendons and ligaments that ingerate musculoskeletal components. *Jap Dent Sci Rev (invited review)*. 52: 84-92, 2016. doi:10.1016/j.jdsr.2016.04.003.
2. Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C*. Scleraxis and osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. *Development* 142:787-96, 2015.

(和文)

1. 吉本由紀、滝本 晶、宿南知佐. 靱帯の形成と再 . Keynote RA. Vol.48:20-25, 2016.

授
研究者番号 : 60303905

[学会発表] (計 2 件)

1. Yuki Sugimoto, Aki Takimoto, Yuji Hiraki, Chisa Shukunami: Establishment of an in vivo model for analysis of periodontal ligament formation. フェニックスリーダー育成プログラム 第5回リトリート 2015.7.4. アステールプラザ. 広島県広島市.
2. 吉本 由紀、滝本 晶、開 祐司、宿南知佐: Establishment of a ScxGFP mouse line for analysis of periodontal ligament formation. 広島平和セミナー 2015.10.26. アステールプラザ. 広島県広島市.

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等
研究代表者の研究室のホームページ
http://www.hiroshima-u.ac.jp/dent/kenkyusitu/p_npehnp.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 由紀 (YOSHIMOTO YUKI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任助教
研究者番号 : 40735304

(2) 研究協力者

宿南 知佐 (SHUKUNAMI CHISA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教