

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2008～2009
課題番号：20890023
研究課題名（和文）miRNA による歯特異的遺伝子発現制御メカニズムの解析とその制御法の開発
研究課題名（英文）Identify microRNAs involved in tooth development and elucidate the mechanism of post-transcriptional regulation of tooth specific genes.
研究代表者
田中 康二郎（TANAKA KOJIRO）
東北大学・病院・医員
研究者番号：90451608

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、歯の発生における microRNA (miRNA) の発現やその役割についての解析である。今回、胎生 16 日、出生後 1、3 日のマウス歯胚での miRNA の発現パターンを明らかにした。このうち miR-1 の発現について、real-time miRNA PCR 法を用いて各ステージ間の有意な差を確認し、マウス歯胚での組織内発現を in situ hybridization 法にて確認した。これらの結果は miR-1 が歯の形成において重要な役割を担う可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Diverse functions of microRNA have been clarified in organogenesis and pathogenic mechanism of diseases. We analyzed the expression profiles of microRNAs using microRNA chip during tooth development at embryonic 16 days (E16), postnatal 1 (P1) and 3 days (P3). To confirm miRNA chip data, we performed real-time PCR. We found that the expression level of miR-1 was relatively high, while significantly reduced in P3 tooth germ. To understand role of miR-1 in tooth development, we performed in situ hybridization. The expression of miR-1 was strongly detected in inner enamel epithelium of developing E16, while no signal was detected at P1 or P3. These results suggested that post-transcriptional control of miR-1 plays an important role in tooth development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	1,430,000	429,000	1,859,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,630,000	789,000	3,419,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：microRNA、歯の発生、Gjal、miR-1

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞を応用した組織再生研究が注目を浴びている。特に、受精後の胚細胞を応用した ES 細胞にかわり、皮膚の線維芽細胞に 4 種類の遺伝子 (Oct-4、KLF4、Sox2、c-myc) を導入して作製された iPS 細胞は、個体発生

も可能となる多分化能を有しており、今まで問題であった倫理面も解決しうる新しい手技として注目されている。

歯の再生に関しては、主にその再生に必要な幹細胞の供給源として、第 3 大臼歯や乳歯

の歯髄を用いた方法が試みられている。実際、これら歯髄由来細胞は、神経細胞、脂肪細胞、骨芽細胞、象牙芽細胞などの様々な細胞へ分化することが証明されており、今後の歯科再生医療の中心的な役割を演じていると考えられている。その一方で、歯髄細胞中にこれらの幹細胞は 0.5-1%程度しか含まれておらず、実験的な再生研究は可能であるが、臨床に応用するためには不十分な量である。我々の研究グループでは、少量の歯髄由来幹細胞を濃縮し、多分化能を有したまま大量調整する方法を確立した（平成 19 年歯科基礎医学会総会サテライトシンポジウムにて発表）。

歯の発生段階における分化制御は、主に組織特異的な遺伝子発現の制御によって行なわれていると言っても過言でない。実際、iPS 細胞の樹立には、分化した細胞と ES 細胞との遺伝子発現の差に着目し、両者間で発現パターンの異なる遺伝子 20 個から、iPS 樹立に必要な 4 遺伝子を同定している。我々の研究グループは、歯の発生過程における遺伝子発現につき、ディファレンシャルディスプレイ、マウクロアレー、デジタルスクリーニング法を用いては特異的遺伝子の同定と、その解析をおこなってきた（Fukumoto E et al. *J Dent Res* 2003; Fukumoto S et al. *J Cell Biol* 2004; Nakamura T et al. *J Biol Chem* 2004、2008; Fukumoto S et al. *J Biol Chem* 2006; Yoshizaki et al. *J Biol Chem* 2008）。これらの成果により、エナメル質形成に関わる新規分子の、歯の形づくりにかかわる分子群の同定と歯の発生における分子メカニズムの解明に成功した。つまり、歯特異的遺伝子の同定とその機能解析は歯の発生の理解に極めて重要といえる。

遺伝子発現の制御には、各遺伝子のプロモーターやエンハンサーを介した mRNA の発現制御とともに、最近新しく発見された

microRNA (miRNA) による負の制御が報告されている。miRNA は、細胞内に存在する 19-29 塩基ほどの一本鎖 RNA であり、mRNA の 3' 末端の非翻訳領域に結合し、mRNA の分解や、リボソームでの蛋白への翻訳阻害を行なっていることが分かってきた。現在まで 500 程度の miRNA が同定され、生体内では 2000-3000 種類の miRNA が存在することが予測されている。今まで報告されていた組織特異的な遺伝子の発現においても、mRNA の発現レベルの調節のみならず、miRNA による mRNA の分解により制御されていることが、神経組織や癌細胞において明らかとなってきた。しかしながら、歯の発生過程における miRNA の発現や機能解析に関する報告は皆無である。また miRNA による遺伝子発現制御は、一過性であり細胞障害も少ないことから、再生医療や癌細胞抑制などの薬剤としての応用も期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、歯の発生過程における miRNA の発現パターンの同定と、データベース作成、さらには我々の所有する歯の遺伝子発現プロファイルと比較することで、歯特異的遺伝子の miRNA による発現制御メカニズムと、その制御法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

歯の形態形成における miRNA の役割を理解するために、まず miRNA が歯胚において、どの発生段階に、どの部位に発現しているかを明らかにすることを目的とした。

まず解析の手始めとして他組織の miRNA の発現様式と比較して、歯特異的な miRNA の同定を行った。

(1)他の組織（脳、肺、腎臓、肝臓、皮膚、骨、筋肉、精巣等）と歯胚での miRNA 発現プロファイルを比較し、歯特異的な

miRNA 候補の同定

各組織において発現する miRNA には、特異性が認められる。当然のことながら、歯胚にも特異的に発現している miRNA が存在すると考えられる。そこで胎生 16 日、生後 1 日、生後 3 日というエナメル芽細胞分泌期前後に関して、歯特異的に発現している miRNA を、ジェノパール miRNA アレーを用いて解析し、その発現パターンの検討を行った。

(2) 歯特異的な遺伝子の遺伝子発現制御に

関わる miRNA の同定

エナメル基質は大きく分けて、アメロジェニンと非アメロジェニンに分類される。アメロジェニンは、エナメル質に存在するエナメル基質蛋白の 90%以上を占め、それ以外が非アメロジェニンということになるが、このなかにアメロブラスチンが含まれる。アメロジェニン欠損マウスでは、ヒトのエナメル質形成不全症に類似し、エナメル質の形成異常を呈する。一方、アメロブラスチンの欠損マウスではアメロジェニン欠損マウスと同様のエナメル質形成不全症を示すが、その程度はアメロジェニンのそれより重度であり、またアメロジェニンの発現を著しく低下する。また象牙質シアロリントタンパク (DSPP) は、象牙質特異的な遺伝子である。これらの歯特異的な遺伝子の発現の制御に関与している miRNA の同定を、オーラルゲノムプロジェクトとの比較によるコンピュータベースの遺伝子スクリーニングにより行った。この解析による結果を参考にして、以降の研究対象とする miRNA を選択した。

(3) 胎生 16 日、生後 1、3 日の歯胚におけ

る特異的な miR-1 の発現パターンの解析

歯の発生は、口腔上皮の肥厚から始まり、上皮と間葉 2 つの組織の相互作用により起こる。歯胚上皮は肥厚した後、発生の進行に伴って、蕾状から帽子状へと形態を変え、さ

らには鐘状 (胎生 16 日) を呈してくる。このような歯胚の形態変化とともに、エナメル上皮幹細胞からは、内エナメル上皮細胞、星状網細胞、中間層細胞、外エナメル上皮細胞などのさまざまな上皮細胞が発生する。これらの中で、内エナメル上皮は、エナメル芽細胞に分化した後に、エナメル質形成に働くようになる。エナメル芽細胞はエナメル基質を分泌し、成熟した後はエナメル基質の脱却とカルシウムの輸送に働くようになる。

本研究では、Gjal ならびに KCNJ2 をターゲットとすることが報告されている miR-1 (Yang, B. et al. *Nat Med* 13, 2007) に関して調査を行うこととした。Gjal は Oculodentodigital dysplasia (ODDD) の原因遺伝子で細胞間チャネルの主な構成タンパクで歯に特異的な発現をしており、エナメル芽細胞の分化に関与している。KCNJ2 は Andersen-Tawil syndrome (ATS) の原因遺伝子であり、ODDD および ATS 患者において重篤なエナメル質形成不全が認められることが報告されている。こういったエナメル質形成の一連の流れにおいて重要な働きを担うと考えられる、歯胚における特異的な miRNA の発現パターンを in situ hybridization 法を用いて組織切片上にて解析した。

(4) 歯由来細胞における miR-1 の定量化解析

定量 PCR のひとつである Real-time PCR 法は、ポリメラーゼ連鎖反応による増幅を経時的に測定することで、増幅率に基づいて鋳型となる DNA の定量を行なう方法であるが、しばしば Real-time PCR 法は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) と組み合わせて少量の mRNA の定量へ使われ、これにより特定の時間、細胞、組織での遺伝子の発現をみることができる。この組み合わせによる技法が定量 RT-PCR (quantitative RT-PCR) 法である。

この方法はmiRNA発現パターンの解析に用いる上で、高感度で正確な解析ツールとされている。本研究では Taqman® hsa-miR-1 を用い歯由来細胞の各分化過程における mmu-miR-1 の発現パターンを解析した。

4. 研究成果

我々の研究グループでは、これまでに胎生 16 日、出生後 1 日、3 日のマウスの歯胚より miRNA を抽出し、ジェノパール miRNA アレーを用いて、miRNA の発現パターンを明らかにし、歯胚での miRNA 発現プロファイルと、他の組織（脳、肺、腎臓、肝臓、皮膚、骨、筋肉、精巣等）の miRNA の発現様式と比較した。ここから歯胚に特異的な miRNA 候補の同定を行なった（下図）。歯胚形成において極めて

歯胚特異的な遺伝子	gene symbol	miRNA候補
Amelogenin X	AMEL	mmu-miR-155
Ameloblastin	AMBN	mmu-miR-291a-3p mmu-miR-210
tuftelin	Trip11	mmu-miR-106b mmu-miR-20b mmu-miR-19a mmu-miR-299 mmu-miR-133a mmu-miR-133b mmu-miR-324-5p
enamelysin	MMP20	mmu-miR-155
Dentin sialophospho protein	DSPP	mmu-miR-127
folliculin	Fst	mmu-miR-376b mmu-miR-379 mmu-miR-19a mmu-miR-434-5p mmu-miR-184
fibroblast growth factor receptor	Fgfr3	mmu-miR-101a mmu-miR-128a
LIM homeobox protein 6	Lhx6	mmu-miR-207 mmu-miR-207
LIM homeobox protein 8	Lhx8	mmu-miR-431 mmu-miR-20b mmu-miR-93 mmu-miR-19a mmu-miR-291a-3p mmu-miR-7d* mmu-miR-106b mmu-miR-379
RNA and export factor binding protein 2	Ref	mmu-miR-152 mmu-miR-145 mmu-miR-101a
retinoid x receptor gamma	Rxrg	mmu-miR-298 mmu-miR-136 mmu-miR-377 mmu-miR-19a mmu-miR-434-3p
fibroblast growth factor 9	Fgf9	mmu-miR-140
inhibin beta A (activin beta A)	Inhba	mmu-miR-136 mmu-miR-10b
gap junction membrane channel protein alpha 1	Gja1	mmu-miR-1 mmu-miR-434-3p mmu-miR-101a mmu-miR-376a

重要な役割を担う Gja1 に特異的な miRNA である mmu-miR-1 について各ステージのマウス歯胚における組織内発現を in situ

hybridization 法にて確認した。その結果、上皮組織に特徴的に発現を認めた。さらに各ステージの歯胚から抽出した total RNA から、分化過程における miRNA の発現について real-time miRNA PCR 法を用いて解析を行ない、胎生 16 日齢と生後 3 日齢の各ステージ間における有意な差を確認した。

miRNA の発現制御は小さい分子であるという性格から、他の完全長 cDNA 遺伝子導入および発現制御と比較して、その制御が安価で容易に行なえる。このことは、分化に関わる特定の miRNA が同定されれば、その発現による分化誘導法の確立が容易であり、臨床応用しやすい手技といえる。歯胚特異的な miRNA の発現と、制御遺伝子の同定は、歯の発生・再生研究を革新的に進歩させうる研究テーマであり、本研究の結果は miRNA が歯の形成において重要な役割を担うことを示唆しており、歯の発生研究において極めて重要な知見が得られた。

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）

〔学会発表〕（計 2 件）

①Expression of microRNA in tooth germ development

Kojiro Tanaka, Aya Yamada, Hiroharu Suzuki, Makiko Arakaki, Satoshi Fukumoto

第 3 回インターフェイス口腔健康科学国際シンポジウム、仙台市、2009、1 月 16 日

②Expression profile of miRNA during tooth germ development.

Tanaka K, Suzuki H, Kimura Y, Aizawa S, Iwamoto T, Yamada A, Arakaki M, Fukumoto E, Fukumoto S

86th General Session and Exhibition of the IADR 2008. トロント、カナダ、7 月 3 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 康二郎 ((TANAKA KOJIRO))

東北大学・病院・医員

研究者番号：90451608

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：