

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21678

研究課題名（和文）空間的トランスクリプトーム解析を応用した歯胚発生キーファクターの解明

研究課題名（英文）Identification of key factors for tooth development using spatial transcriptomics

研究代表者

大野 充昭（Ono, Mitsuaki）

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：60613156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：歯の発生メカニズムは未だ不明であり、歯の初期発生を理解することは、歯科領域において重要な課題である。そこで我々は、1細胞レベルで遺伝子発現の網羅的解析が可能であるsingle cell RNA-seq解析および、位置情報を有した遺伝子発現の網羅的解析が可能であるSpatial RNA-seq解析を用いて、歯の発生過程を詳細に解析した。その結果、歯の初期発生において特異的に発現している遺伝子を抽出することに成功した。今後、歯の初期発生におけるこれらの遺伝子に関して、詳細に解析する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯胚発生における運命決定メカニズムの解明は、歯科領域の基礎研究者、臨床家の夢であり、多くの研究者が挑戦してきたが、未だ達成されていない研究課題の一つであり、本研究でその一部が明らかになった。また、本研究手法は、上皮間葉相互作用にて生じる様々な臓器の発生に関わるマスター遺伝子同定法のモデルになりうると考える。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of tooth development is still unknown, and understanding the early development of teeth is an important issue in the field of dentistry. We analyzed tooth development in detail using single cell RNA-seq analysis, which enables comprehensive analysis of gene expression at the single cell level, and spatial RNA-seq analysis, which enables comprehensive analysis of gene expression with spatial information. As a result, we succeeded in finding genes that are specifically expressed in the early development of teeth. We plan to analyze these genes in detail during early tooth development.

研究分野：組織再生

キーワード：歯 再生 scRNA-seq

## 1. 研究開始当初の背景

歯胚発生における運命決定メカニズムの解明は、歯科領域の基礎研究者、臨床家の夢であり、多くの研究者が挑戦してきたが、未だ達成されていない研究課題の一つである。

一般的に、歯を含む上皮間葉相互作用により発生する臓器は、特定部位の上皮組織が肥厚し、間葉組織に陥入することで生じる。そして、上皮細胞が様々なサイトカインを分泌し、間葉細胞の遺伝子発現を制御することで発生が開始する。これらの過程において、歯胚を構成するすべての細胞は、同じ挙動を示すわけではなく、細胞同士が上皮間葉相互作用を含む様々なコミュニケーションを取りながらダイナミックに変化するため、従来の細胞集団の平均値的解析では、発生メカニズムを詳細に捉えることは困難である。

一方、バイオインフォマティクスの飛躍的進歩により、1細胞レベルでのRNA発現解析 (Single Cell RNA-Seq: scRNA-Seq) が可能となり、組織から単離した数万単位の細胞を網羅的に解析し、既知のマーカー遺伝子などをガイドに機能特異的な転写因子をスクリーニング可能となった。しかし、scRNA-Seqでは、細胞を単一化する必要があるため、隣接細胞情報や空間的位置情報が失われる。それに対し、近年、特殊なスライドガラス上に組織切片を貼り付け、光学顕微鏡にて組織学的位置情報を取得後、1~10細胞単位の組織切片からmRNAを単離し、位置情報となるインデックス配列が付与されたcDNAを合成することで、位置情報をもつ遺伝子発現解析 (Spatial-Seq) が可能となった。つまり、このデータをscRNA-Seq解析のデータと統合することで、位置情報を有した1細胞レベルでの解析、すなわち歯胚発生初期にまさに上皮間葉相互作用を引き起こしている細胞の1細胞レベルでの解析が可能となった。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では、まず歯胚発生初期のマウス歯胚および非歯原性口腔粘膜組織を単離し、scRNA-Seqにて1細胞解析を行う。次に、同様の組織を用い、位置情報を有したSpatial-Seqにて解析し、間葉細胞と相互作用を起こしている上皮細胞群が特異的に発現している転写因子を抽出し、scRNA-Seqの結果と照らし合わせて関連因子を絞り込む。そして、遺伝子欠損マウス等を用いて、抽出された因子の機能解析を行い、歯の初期発生に関わる因子を同定することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) scRNA-Seqによる1細胞レベルでの遺伝子発現解析

マウスE11.5、E12.5の歯胚および非歯原性口腔粘膜組織を摘出し、酵素処理にて単一細胞を得る。そして、約10,000個の細胞 x 4群 (2タイムコース x 2組織) をBD Rhapsody シングルセル解析システムにてscRNA-Seq解析し、「どの細胞」が、どの遺伝子を、どの程度発現しているか解析した。

### (2) Spatial-Seqによる空間的遺伝子発現解析

位置情報となるインデックス配列が付加されたスライドガラスに、マウスE11.5およびE12.5の歯胚の凍結切片を貼り付け、組織学的位置情報を取得した。次に、スライド上でmRNAを単離、インデックス配列が付加されたcDNAを合成し、ライブラリ作製後にシーケンスを行った。インデックス情報から、二次元空間での遺伝子発現情報を構築することで、「どこ」で、どの遺伝子が、どの程度発現しているか明らかにし、E12.5には発現せず、E11.5の上皮肥厚部に特異的に発現する転写因子を抽出した。

(3) Spatial-Seqで得られた遺伝子発現情報は、1~10細胞の平均値のため、上皮間葉相互作用部位では、間葉細胞のコンタミネーションが排除できない。そこで、Spatial-Seqで得られた上皮肥厚部における遺伝子発現プロファイルと類似した遺伝子発現プロファイルを持つクラスター、つまり上皮肥厚部の上皮細胞に相当する亜集団を、scRNA-Seqの解析結果から同定し、上皮肥厚部の上皮細胞特異的に発現が上昇している転写因子を抽出した。

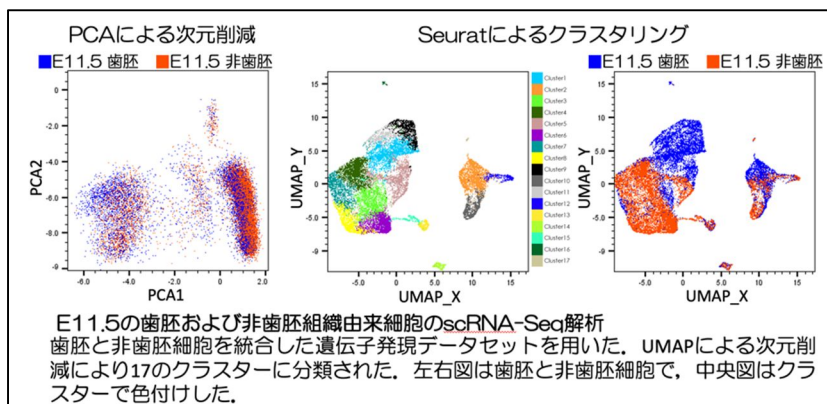
(4) 上記の解析で抽出された遺伝子が歯の発生に関わっているか、遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

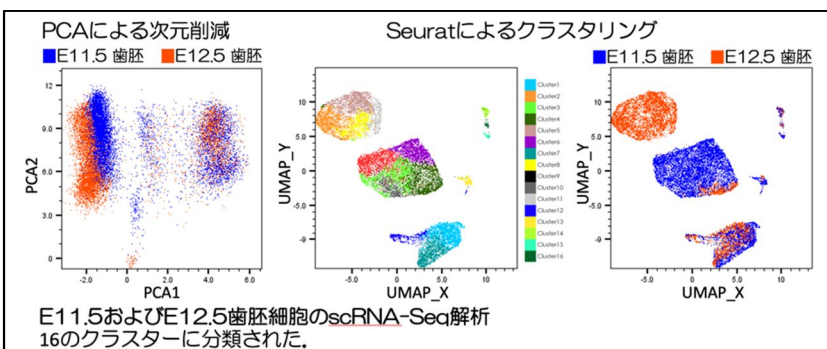
### (1) scRNA-Seqによる1細胞レベルでの遺伝子発現解析

E11.5の歯胚および非歯胚組織から単離した細胞から得られた遺伝子発現データについて、Seuratを用いてUMAPによる次元削減を行ったところ17のクラスターに分類された。各クラスターを構成する細胞種を推定するために、マーカー遺伝子および歯の発生

に關与が報告されている既知の遺伝子の発現を検討した。その結果、上皮細胞様および間葉細胞様の細胞集団が見つかり、その中にもそれぞれ亜集団が存在することが示唆された。上皮細胞様集団と間葉細胞様集団から、E11.5 歯胚細胞でのみ高発現する複数の遺伝子を抽出した。

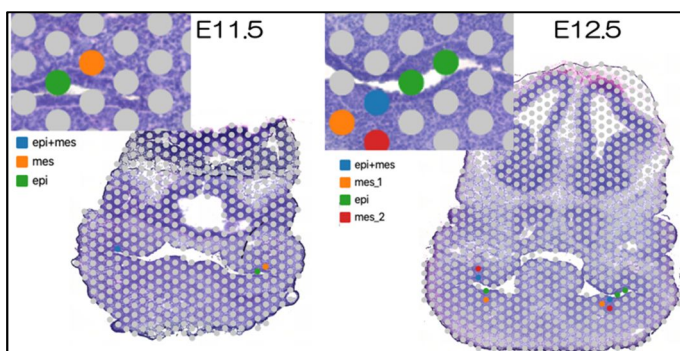


次に、E11.5とE12.5の歯胚由来細胞についてSeuratを用いてクラスタリング解析を行った。各クラスターの細胞集団をマーカー遺伝子から推定し、上皮細胞様および間葉細胞様の集団を分類した。そして、発生初期であるE11.5の歯胚細胞にのみ特異的に発現する遺伝子の抽出を行った。



- (2) Spatial-Seqによる空間的遺伝子発現解析  
 Spatial-Seqを行い、マウスE11.5およびE12.5の歯胚の特異的に発現している遺伝子の抽出を行った。

そして、scRNA-Seqの結果と照らし合わせて歯の初期発生に関わっている因子の絞り込みを行った。その結果、いくつかの候補遺伝子が抽出された。中でも、上皮肥厚部の上皮細胞特異的に発現が上昇している転写因子を抽出した。



- (3) 上記の解析で抽出された遺伝子が歯の発生に関わっているか、遺伝子欠損マウスを入手し、マイクロCTを用いた解析を行った。その結果、8週齢の雄及び雌の臼歯および顎骨は、野生型マウスと比較し、大きな差は認められなかった。

今後、胎生期の歯胚に変化が生じていないか、E11.5、12.5の歯胚を組織学的に解析する予定である。また、他に抽出された遺伝子においても、遺伝子欠損マウスを入手し、解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Nosho S, Ono M, Komori T, Mikai A, Tosa I, Ishibashi K, Tanaka Y, Kimura-Ono A, Hara S E, Oohashi T, Kuboki T	4. 巻 66
2. 論文標題 Preclinical bioequivalence study of E. coli-delivered rhBMP-2/ -TCP and autogenous bone in a canine guided-bone regeneration model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 124-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2186/jpr.JPR_D_20_00226	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 -

1. 著者名 Tanaka Y, Kyaw TA, Ono M, Mikai A, Anh TD, Emilio SH, Tosa I, Ishibashi K, Ono-kimura A, Nawachi K, Kuboki T, Oohashi T	4. 巻 22
2. 論文標題 Suppression of bone necrosis around tooth extraction socket in a MRONJ-like mouse model by E-rhBMP-2 containing artificial bone graft administration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222312823.	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 -

1. 著者名 Mukai T, Akagi T, Hiramatsu-Asano S, Tosa I, Ono M, Kittaka M, Ueki Y, Yahagi A, Iseki M, Oohashi T, Ishihara K, Morita Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Imatinib has minimal effects on inflammatory and osteopenic phenotypes in a murine cherubism model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.14073	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三海晃弘, 大野充昭, 土佐郁恵, 納所秋二, 大野 彩, 縄稚久美子, 田仲由希恵, 大橋俊孝, 窪木拓男
2. 発表標題 薬剤関連顎骨壊死様モデルマウスにおけるE-rhBMP-2の治療効果の検討.
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第130回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 納所秋二, 大野充昭, 土佐郁恵, 石橋 啓, 田仲由希恵, 大野 彩, 大橋俊孝, 窪木拓男
2. 発表標題 rhBMP-2, rhFGF-2の骨形成能は移植部位に存在する骨髄組織の影響を受ける.
3. 学会等名 第51回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野 充昭
2. 発表標題 大腸菌由来rhBMP-2含有人工骨の開発と硬組織再生の未来
3. 学会等名 日本矯正歯科学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021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	辻 孝  (Tsuji Takashi)  (50339131)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー   (82401)	
研究 分担者	渡辺 亮  (Watanabe Akira)  (60506765)	京都大学・医学研究科・特定准教授   (14301)	

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