

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23044

研究課題名(和文) 歯の発生と分化過程におけるmicro RNAの役割解明

研究課題名(英文) The role of micro RNA in tooth development and differentiation processes.

研究代表者

中村 友昭 (Nakamura, Tomoaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50885530

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)：以前の研究で、歯の発生における各段階でのmicro RNA発現レベルを比較し、micro RNA-1(miR-1)の発現が歯の発生初期から中期にかけて顕著な変化を示したことから、この時期において重要な分子である事が示唆された。また本研究では、miR-1過剰発現した歯原性上皮細胞株ではエナメル芽細胞マーカーのmRNA発現量が上昇した。次に細胞内シグナルを検討したところ、PI3KやAKTのリン酸化が亢進した。以上のことから、miR-1はエナメル芽細胞内にて、PI3KやAKTシグナルを介して、エナメル芽細胞分化を誘導している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々は、歯の発生における各段階でのmicro RNA発現レベルを比較し、miR-1の発現が歯の発生過程において顕著な変化を示していることを明らかにしてきた。miR-1は心筋細胞などでConnexin43がターゲット遺伝子で明らかにされており、Connexin43は変位により眼歯指異形成症を発症する。本研究結果によって、miR-1によるConnexin43の発現制御機構の解明は、歯の発生における細胞増殖と分化の制御機構の理解につながるのみならず、眼歯指異形成症の解明と新たな治療法の開発に寄与すると考えている。

研究成果の概要(英文)：Previous studies identified micro RNA-1 (miR-1) expression during tooth development. The expression of miR-1 during tooth development was investigated by qPCR. The miR-1 was strongly expressed at 16.5 days prenatal, and then significantly decreased at 3 days postnatal. Thus it is suggested that it is an important molecule during the early and middle stages of tooth development. The expression of ameloblast markers was investigated by qPCR in a dental epithelial cell line overexpressing miR-1, and the expression level was upregulated. Furthermore, intracellular signaling of miR-1 was examined, and phosphorylation of PI3K and AKT was enhanced. These results suggest that miR-1 induces ameloblast differentiation via PI3K and AKT signaling.

研究分野：歯の発生

キーワード：歯の発生 micro RNA-1

1. 研究開始当初の背景

歯の発生において上皮間葉の相互作用は、歯の大きさや形態形成を制御しており、これらの相互作用によって成長因子、受容体、転写因子の遺伝子発現調節が展開されている。多くの遺伝子は転写だけでなく、転写後の micro RNA によっても精巧にコントロールされている。micro RNA は、タンパク質をコードしていない 20 塩基ほどの小分子 RNA で、その配列により標的となる mRNA と結合し、翻訳抑制を行う事によって、タンパク質発現を抑制する。そのため、micro RNA は発生だけではなく、分化や増殖、癌化、代謝、疾患、炎症などの様々な細胞反応に関与している。しかし、歯の発生における micro RNA の発現と機能については、まだ不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

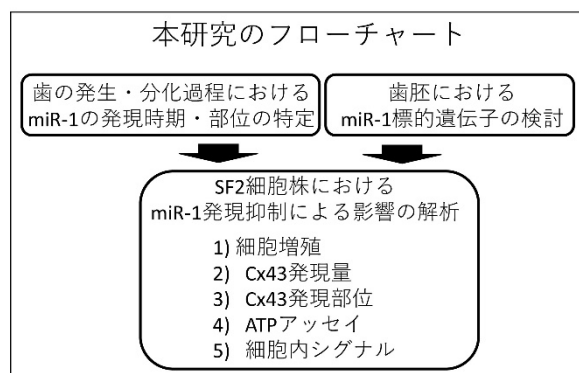
歯の発生中にどの micro RNA が発現し、どのように変化するかを網羅的にプロファイリングし、その結果から歯の発生ステージの発現変化から、顕著に変化した miR-1 について歯の発生における役割の解明および、そのメカニズムについて明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、miR-1 が歯の発生過程において、

- (1) 調節している分子の同定、
- (2) 歯の分化過程における影響

を明らかにする。その方法のフローチャートを右に示す。



歯の発生段階における、miR-1 発現時期と部位の特定

miR-1 がどの時期に発現しているか検討するために、胎生期から歯の萌出までの各ステージの歯胚を回収し、micro RNA cDNA 合成キットにて、micro RNA を回収後、qPCR にて miR-1 の発現量を測定する。以上の研究で、歯の発生における、miR-1 の発生時期を検討し、歯の発生における miR-1 の重要な時期を特定する。また、各ステージのマウス臼歯歯胚に対して miR-1 プローブを組み込んだベクターを作成し、Digoxigenin を用いた in situ ハイブリダイゼーションにより、発現部位の特定を行った。

miR-1 標的遺伝子の検討

micro RNA が標的とする遺伝子を予測するためのアルゴリズムが複数オンラインで公開されているため、in silico にて miR-1 標的遺伝子の候補を絞り込む。更に以前の研究より、胎生期の歯胚や、切歯からマイクロアレイを行い、歯の発生分化過程における 2 万 5 千以上の遺伝子についての発現パターンデータを有している。そこで、このデータを基に miR-1 標的遺伝子の中から、歯の発生過程で発現している分子を絞り込む。

細胞培養及び、miR-1 発現期における、miR-1 阻害による歯の分化発生への影響

マウス歯原性上皮細胞株である SF2 細胞株を用い、10% ウシ胎児血清を添加した Ham F-12/Dulbecco の改良イーグル培地で、5%CO₂ 下、37 °C で培養した。miR-1 のノックダウンには、Exiqon で合成し、アンチセンス分子の両端の 5 つのヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドをロックした miR-1 阻害 RNA (IDT® miRNA Inhibitors) を、Lipofectamine®を用いて細胞へ導入する。この阻害 RNA はウイルスを使用せず、リポフェクション法にて導入できるため、比較的容易に導入する事が可能である。

細胞増殖(WST-8 アッセイ、BrdU アッセイ)

SF2 細胞 4000 個を 96 穴プレートに播種し、BrdU を取り込ませた後に、抗 BrdU 抗体及び Alexa 594 結合二次抗体(Thermo Fisher Scientific)によって取り込まれた BrdU 可視化した。また、同様の細胞数で、経時的に培養し、WST アッセイ (Dojindo) によって細胞増殖を計測した。

歯原性上皮細胞株における Cx43 の発現部特定

SF2 細胞における Cx43 の局在を検討するために、 で作成した scramble siRNA をトランスフェクションしたコントロールと、miR-1 の siRNA をトランスフェクションした miR-1 発現抑制細胞株を使用し、細胞と細胞が接触し始める時期の細胞を 4%PFA にて固定した後、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) を用いて免疫染色を行った。画像は、顕微鏡システム BZ-8000 (KEYENCE) を使用し、切片の組織学的分析は BZ アナライザー (KEYENCE) を使用した。

ATP アッセイ

ATP 放出の検出は、 で作成した scramble siRNA をトランスフェクションしたコントロールと、miR-1 の siRNA をトランスフェクションした miR-1 発現抑制細胞株を使用し、96 ウェルプレートに 1 X 10³ 細胞/ウェルで播種した。24 時間後に ATP 検出キット (Promega) および上清を収集し、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。

miR-1 による細胞内シグナルの解析

細胞内シグナルの検出は、 で作成した scramble siRNA をトランスフェクションしたコントロールと、miR-1 の siRNA をトランスフェクションした miR-1 発現抑制細胞株を使用し、トランスフェクション後、24 時間後の PI3K、AKT の発現と、リン酸化についてウエスタンブロッティング法にて評価を行った。

4. 研究成果

(1) 歯の発生段階における、miR-1 発現時期と部位の特定

まず始めに、歯の発生段階における、miR-1 発現時期を TaqMan[™] による PCR にて検討したところ、胎生 16.5 日で強く発現したのに対し、出生後 3 日では 90% 近く減少した。このことから、miR-1 は歯の発生初期から中期にかけて重要な分子である事が示唆された。そこで、miR-1 を発現している歯胚構成細胞の局在を *in situ* ハイブリダイゼーション分析により検討した。その結果、E 16.5 の臼歯歯胚では、主に歯原性上皮細胞を含む増殖が盛んな cervical loop で検出された。この事から、やはり歯胚発生初期で重要な役割を示している可能性が示唆された。

(2) miR-1 標的遺伝子の検討

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、いくつかの細胞タイプでは、Gja-1 の Cx43 への翻訳を妨げる事が知られている。心筋細胞などでは miR-1 が Connexin43 のターゲット遺伝子と知られている。更に Connexin43 の変位により眼歯指異形成症を発症し、主な症状として、小さな目、顔の異常な形などの頭蓋の異常や、手足の 4 指と 5 指の合指症が見られ、歯に関してはエナメル質形成不全や象牙質形成不全、矮小歯や先天性欠如歯を有する事がある。そこで、歯の未分化上皮細胞株 SF2 を使用して、Cx43 産生に対する miR-1 機能を解析する事にした。SF2 細胞で、miR-1 の発現を qPCR にて発現を検討したところ、miR-1 の発現が認められたため、siRNA を用いて発現抑制を行う事によって、miR-1 の機能を解析することにした。SF2 細胞に対して si-miR-1 を用いた発現抑制細胞株と、scramble siRNA を用いたコントロール細胞株を qPCR にて Cx43 の発現を比較したところ、2 倍ほど発現量が増加していた。

(3) 細胞培養及び、miR-1 発現期における、miR-1 阻害による歯の分化発生への影響

次に歯原性上皮細胞における miR-1 の役割を検討するべく、ラット歯原性上皮細胞株である SF2 細胞に対して qPCR にて miR-1 の発現を検討したところ、miR-1 が発現していたことから、SF2 が未分化歯原性上皮細胞であることが明らかとなった。そこで、miR-1 発現細胞株として、scramble siRNA をトランスフェクトしたコントロール細胞株と、miR-1 siRNA を用いた miR-1 発現抑制細胞株を作成した。

(4) 細胞増殖 (WST-8 アッセイ、BrdU アッセイ)

細胞増殖を検討するために、(3) で作成した細胞を培養し、比較したところ、有意に miR-1 発現抑制細胞株の増殖が抑制された。そこで、BrdU 取り込みアッセイによって細胞増殖も検討した。その結果、コントロール群では約 35% が BrdU 陽性であったが、miR-1 発現抑制細胞株では 25% で、取り込みが 10% 減少した。以上の結果から、miR-1 の発現が歯原性上皮細胞の増殖を制御しており、miR-1 が細胞増殖と正の相関があることが示唆された。

(5) 歯原性上皮細胞株における Cx43 の発現部特定

カバーガラス上で SF2 細胞を培養し、細胞同士が結合した状態で、Cx43 と E-カドヘリンの面積染色を行った。その結果、Cx43 は E-カドヘリンが陽性で、細胞と細胞が接している細胞膜接合部に発現した。この事からギャップ結合が形成されていると考えられる。しかし、miR-1 発現抑制細胞株では、細胞膜接合部以外にも、接合していない部位にも発現が見られたことから、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が推測された。

(6) ATP アッセイ

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ため、miR-1 発現抑制細胞株の ATP 放出を測定した。その結果、miR-1 発現抑制細胞株はコントロールと比較して、有意に ATP の放出が高かった。象牙前芽細胞で限定的に発現している。Panx3 ヘミチャンネルは、細胞内 ATP を細胞外空間に放出することにより、細胞増殖をブロックする。歯原性上皮でも同様に、miR-1 の発現を抑制し、ATP が放出されることにより、細胞増殖が抑制されていることが示唆された。

(7) miR-1 による細胞内シグナルの解析

以上の結果から、miR-1 が ATP 放出を調整することによって細胞増殖をコントロールしていることが示唆されたが、miR-1 による細胞内シグナルが不明なままである。そこで、miR-1 発現抑制細胞株における細胞内シグナルを検討したところ、PI3K や AKT のリン酸化が亢進した。分化過程において、ATP 刺激が、PI3K や AKT のリン酸化を誘導するという報告がある。この事からも、miR-1 はエナメル芽細胞内にて、ATP を介して、PI3K や AKT シグナルを通して、エナメル芽細胞分化を調節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0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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