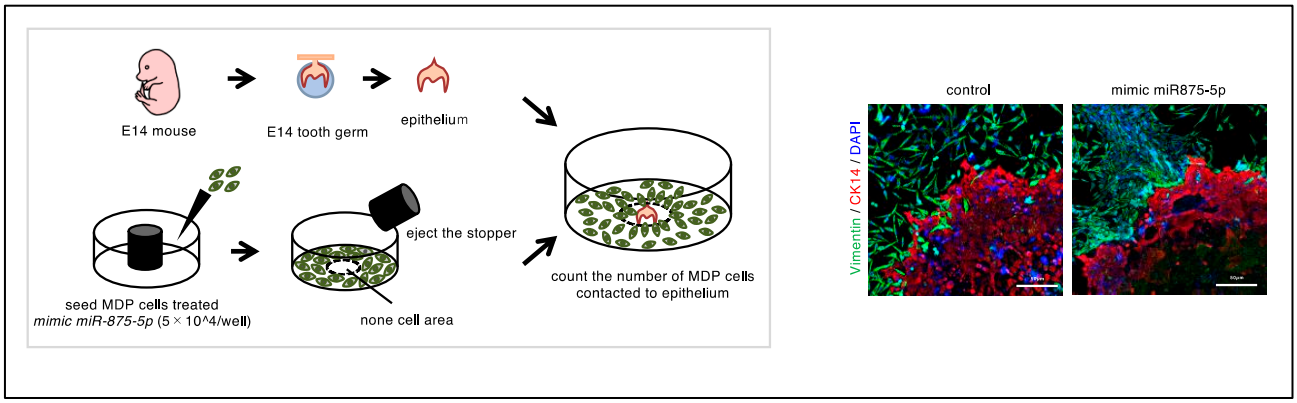
185　転写制御による上皮ー間葉相互作用誘導法の開発と応用	吉崎　恵悟

【目的】上皮ー間葉相互作用は、肺、腎臓、毛、唾液腺および歯といった様々な器官の発生に重要であり、これらの器官は上皮の肥厚および間葉細胞の凝集という共通のイベントを経て、様々なシグナル経路により発生制御が行われている。本研究では、上皮ー間葉相互作用を通じて形成される器官のうち、歯に特異的な遺伝子について網羅的にスクリーニングを行い、上皮ー間葉相互作用に重要な遺伝子の機能解明することを目的として研究を開始した。

【方法】歯に特異的に発現する遺伝子をスクリーニングするため、CAGE（Cap Analysis of Gene Expression）解析を行った。さらに、*in situ* hy bridization 法を用いて、スクリーニングした遺伝子の歯における発現パターンを確認した。同遺伝子を制御している転写因子を同定するため、データベースを用いたスクリーニングを行い、同転写因子が結合する部位を Luciferase assay を用いて確認した。また、上皮ー間葉相互作用に与える影響を確認するため、下図に示す細胞凝集実験を行った。

【結果】トランスクリプトーム解析を用いて網羅的遺伝子解析を行い、歯に特異的と考えられる microRNA 875（miR875）を同定した。miR875 の転写開始点に結合しうる転写因子をデータベース上にて予測し、ホメオボックス転写因子である Prrx1/2 が結合している可能性を発見した。さらに、miR875 は歯の発生初期において間葉細胞に強く発現していた。そこで、上皮ー間葉相互作用に与える影響を確認するため、歯の間葉細胞株に miR875 を遺伝子導入し、マウス胎仔歯胚より摘出した歯の上皮細胞を共培養することで、間葉細胞の動態を確認したところ、miR875 遺伝子導入群において、間葉細胞の上皮細胞への細胞凝集を認めた（図）。以上の結果から、歯の発生初期に特異的に発現する miRT875 が、上皮ー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考えられ、将来の歯の再生技術に応用できる可能性が示唆された。

上皮ー間葉相互作用における細胞凝集能の検討



185. 転写制御による上皮－間葉相互作用誘導法の開発と応用

吉崎　恵悟

九州大学 大学院歯学研究院 口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野

Key words：歯，上皮－間葉相互作用，発生

緒　言

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［1］。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、それぞれの器官に特異的に発現する遺伝子群、それぞれの器官に共通して発現する遺伝子群に大別できた。この結果は、上皮の間葉への貫入などの発生初期における共通の現象は、それぞれの器官に共通して発現する遺伝子が担い、それぞれの器官の特異性、即ち細胞分化や器官運命決定は特異的な遺伝子が担っている可能性が考えられる。

本研究では、今回同定できた遺伝子群の中で、歯の発生初期に特異的に発現する遺伝子からクロモゾーム 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。

方　法

1. CAGE 解析

胎生 14 日齢マウス（E14）歯胚および胎児から 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、解析を行った。遺伝子発現解析は Subio Platform、version1.18 を用いて行った。

2. *In situ* hybridization

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。E14 マウスから取り出された歯胚は 4%PFA にて固定され、Cryostat（CM1800、Leica）にて凍結切片を作製した。作製した切片を、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行った。

3. 発現ベクター作製

Prrx1 および Prrx2 発現ベクターを Gateway cloning system（Life Technologies）を用いて行った。Prrx1 および Prrx2 の cDNA からストップコドンを排除し、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。

4. 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）細胞については 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℃、5％ CO_2 の環境下で培養した。Scratch assay は 10 ng/ml の mouse recombinant protein PDGF-AA および PDGF-BB（#315-17-2UG、#315-18-2UG、PeproTech）を添加した。作製した発現ベクターおよび mimic miRNA（miR875-5p、MSY0004937、Qiagen）は Neon Transfection System（Thermo Fisher Scientific）を用い、既存のプロトコールに従って遺伝子導入を行った。

5. Luciferase assay

目的の配列を pGL4.15 vector（Promega）に挿入し Luciferase レポーターを作製した。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 Tech- nologies）を用いて作製した。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。

6. 細胞凝集実験および免疫組織化学染色

MDP 細胞を培養皿に播種後、mimic-miR875-5p（MSY0004937、Qiagen）およびコントロール miRNA（YM00479902、Qiagen）を遺伝子導入し 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ストッパーのあった領域においた。コラーゲンビーズ（Koken）に PDGF-AA（1 ng/μl）を添加し 4℃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。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 B iologicals）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。

結果および考察

1. Mir875 は歯に特異的に発現する

歯に特異的に発現する遺伝子を解析するため、CAGE 法を用いて歯に特異的な transcription start sites（TSSs）を解析した（図 1A）。その結果、歯に特異的な TSS の一つとして、クロモゾーム 15qD1 領域にピークを認めた（図 1B）。同領域は mir599 および mir875 をコードしている可能性が考えられたため、器官発生初期の臓器ごとの qPCR を行ったところ miR875 が歯に特異的発現しており CAGE 法にて認めた TSS からは miR875 が転写されている可能性が考えられた（図 1C）。また、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 で発現が最も見られ、その後、発生が進むに従って発現が減少していた（図 1D）。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（図 1E）、*in situ* hybridization においても歯乳頭の間葉細胞に局在を認めた（図 1F）。

2. Prrx1/2 は miR875 の転写を促進する

CAGE 解析により miR875 の転写開始点が正確に同定できるため、その周囲にある転写因子が結合しうるプロモーター領域も正確に予測することができる（図 2A）。そこで、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（図 2B）、発生段階後ごとの qPCR においても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（図 2C）。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製し（図 2D）、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（図 2E）。さらに、qPCR において、Prrx1/2 を遺伝子導入した場合に miR875 の mRNA レベルでの上昇を認めた（図 2F）。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製し（図 2G）、Prrx1/2 と共に遺伝子導入したところ、変異を入れたもの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 が直接的に miR875 のプロモーター領域に結合し転写を促進している可能性が示唆された。

これらの知見は、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た。

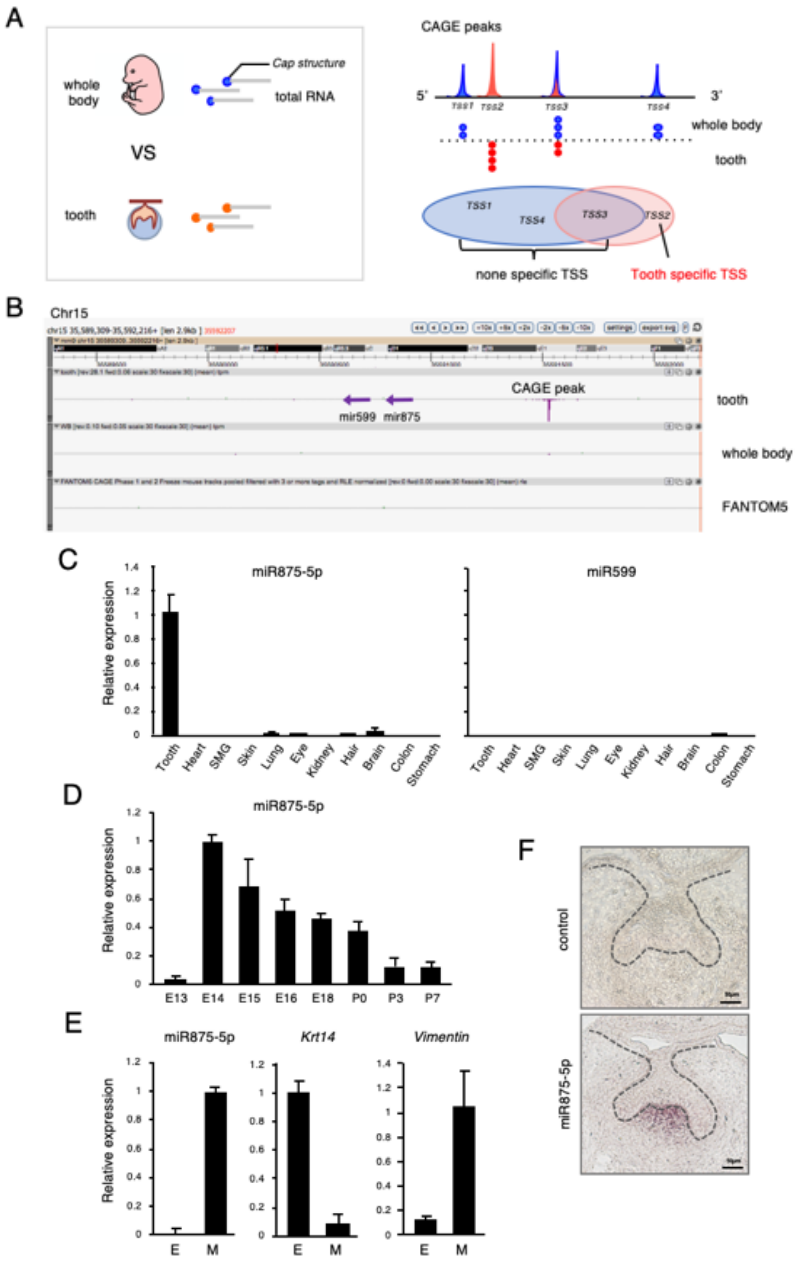


図 1. miR875 は歯に特異的に発現している

A) CAGE 解析の模式図。E14 歯胚および胎子全身から抽出した RNA を用いて CAGE 解析を行った（左）。右図に示すように歯に特異的な TSS は TSS2 であると判断できる。

B) 理研の ZEMBU データベースに同定した TSS をアップロードしたところ、mir875 もしくは 599 が転写させる可能性が考えられ、全身の CAGE 解析データが公開されている FANTOM5 のデータベースにおいても同 TSS は全身での発現を認めず、歯にのみ特異的に発現していた。

C) E14 胎子の臓器ごとの miR875 および miR599 の qPCR。Gapdh にて正規化した。

D) 歯胚発生段階ごとの miR875 の qPCR。Gapdh にて正規化した。

E) E14 歯胚における上皮および間葉ごとの miR875 の qPCR。Krt14 は上皮に、Vimentin は間葉に発現を認めた。

F) E14 歯胚（第一大臼歯）における miR875 の *in situ* hybridization。

エラーバーは標準偏差を示す。スケールバー：50 μm。

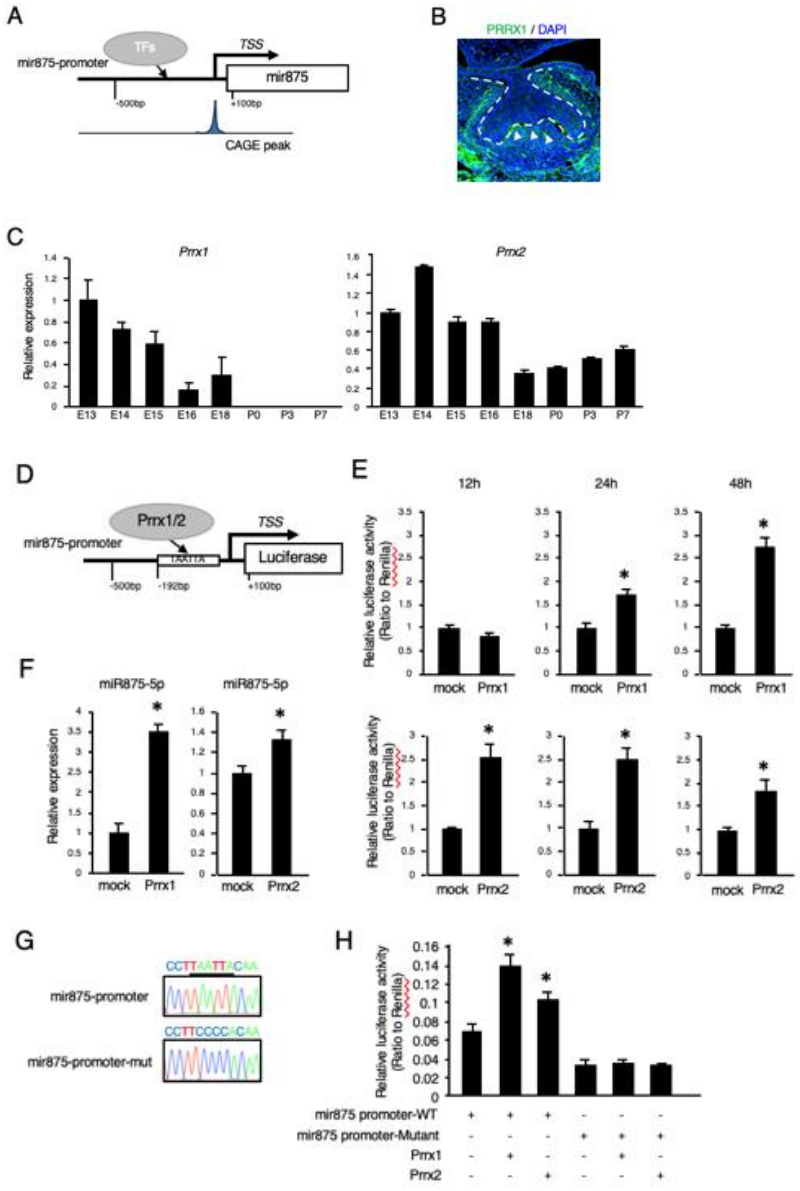


図 2. Prrx1/2 は miR875 の転写を促進する

A) MiR875 のプロモーター領域の模式図。CAGE 解析により TSS の正確な位置が同定できる。

B) E14 歯胚における Prrx1（緑）および DAPI（青）の免疫組織化学染色像。PRRX1 の間葉での局在を認める（白矢頭）。

C) 歯胚発生段階ごとの Prrx1 および Prrx2 の qPCR。Gapdh にて正規化した。

D) 作製したルシフェラーゼレポーターの模式図。PASPER データベースにて TAATTA の配列に Prrx1/2 が結合する可能性が考えられた。

E) MPD 細胞に作製したレポーターおよび Prrx1/2 を遺伝子導入後、12、24、48 時間後のルシフェラーゼ活性。Student's t-test、*P＜0.05。

F) MDP 細胞に Prrx1/2 およびコントロールとして mock を遺伝子導入した際の miR875 の qPCR。Student's t-test、*P＜0.05。

G) MiR875 プロモーター領域の塩基配列。Prrx1/2 が結合すると思われる TAATTA にミューテーションを加え TCCCCA の配列のレポーターを作製した。

H) 作製したレポーターおよび Prrx1/2 を mDP 細胞に遺伝子導入した場合のルシフェラーゼ活性。エラーバーは標準偏差を示す。One-way ANOVA、*P＜0.05。

3. MiR875 は間葉細胞の上皮への凝集に影響を及ぼす

In situ hybridization 法において miR875 は上皮近傍の歯乳頭の間葉細胞に局在していたことから、上皮との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 3A）。歯の発生初期の上皮細胞を中央に置き、上皮への遊走能を確認したところ、mimic miR875 を遺伝子導入した歯原性間葉細胞株 mDP は上皮細胞に凝集していた（図 3B）。上皮と接している間葉細胞数を計測したところ、mimic miR875 遺伝子導入群では有意に凝集細胞数が上昇していることがわかった。これらの結果から、miR875 が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。

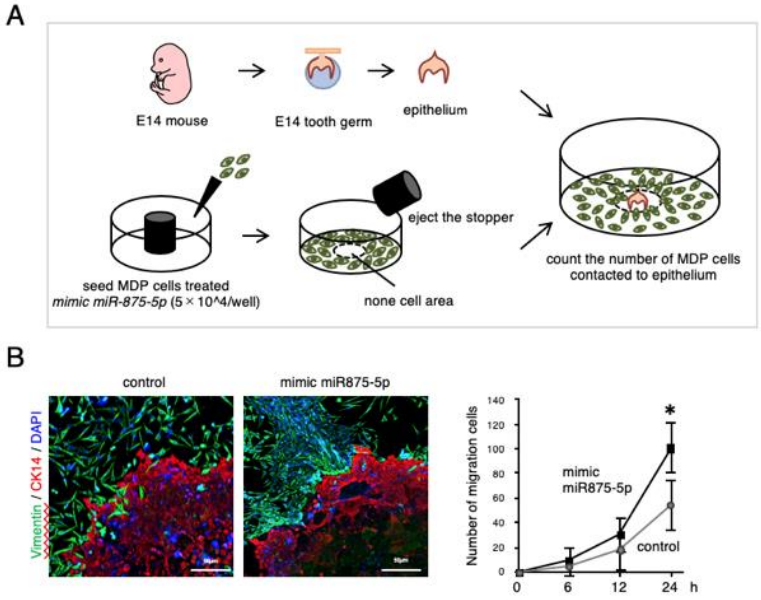


図 3. Mir875 は間葉細胞の上皮への凝集に影響を及ぼす

A) 間葉細胞の凝集実験のプロトコールの模式図。

B) E14 上皮をおいて 24 時間後の免疫組織化学染色像。歯原生間葉細胞株である mDP 細胞を Vimentin（緑）、E14 歯胚上皮を Krt14（赤）、核を DAPI（青）で染色した（左）。上皮をおいて 6、12、24 時間後に上皮と接している間葉細胞数をカウントした（右）。
エラーバーは標準偏差を示す。スケールバー：50 μ m。Student's t-test、*P＜0.05。

共同研究者・謝辞

CAGE 解析において、DANFORM 社（横浜、日本）に技術的指導を受け、多大な協力をいただいきましたことに感謝いたします。

文　献

1) Thesleff, I. & Sharpe, P. Signalling networks regulating dental development. Mechanisms of development 67, 111-123 (1997). PMID: 9392510 DOI: 10/1016/s0925-4773(97)00115-9

2) Mitchell, J. M. et al. The Prx1 homeobox gene is critical for molar tooth morphogenesis. Journal of dental research 85, 888-893. PMID: 16998126 DOI: 10.1177/154405910608501003