

研究者：中野 将志（所属：広島大学病院 小児歯科）

研究題目：潜在型 TGF- β 結合タンパク質 LTBP-3 のエナメル質形成に関する遺伝子制御メカニズムの解明

目的：

エナメル質の構造異常は色調異常による審美面だけでなく、齲蝕や歯髄炎、不正咬合の原因となり、しばしば小児歯科臨床においても問題となる。当科を受診したある女兒は全顎にわたりエナメル質形成不全を認めた。既往歴としてアトピー性皮膚炎および喘息を認めたが、家族歴もなく原因不明であった。そこで申請者らはエクソーム解析を行い原因遺伝子を探索した。その結果、歯牙発生および形成において役割を担う TGF- β の主要な調節因子である潜在型 TGF- β 結合タンパク質（LTBP-3；Latent-transforming growth factor beta-binding protein 3）のコーディング遺伝子である *LTBP3* に変異を認めることが判明した。しかし *LTBP3* の特異的な遺伝子発現パターンは明らかでない。

近年、次世代シーケンサーの登場により塩基配列の解析速度や精度は著しく向上しており、RNA-Seq 解析により遺伝子発現の変化の広範な影響を捉えられるようになった。さらにゲノム解析技術の進歩により単一細胞レベルでの解析が可能となり、従来の細胞集団の解析では捉えることができなかった細胞の特性が明らかにされつつある。

そこで本研究では機械学習を用い、*LTBP3* の遺伝子発現パターンを同定し、歯牙硬組織における役割を検討することを目的とした。

対象および方法：

TGF- β は増殖や分化、機能制御など多機能な因子として知られており、骨芽細胞の分化や骨の発生に重要であると考えられている（Tang Y., et al：Nat Med, 15：757-765, 2009）。そこで、骨芽細胞（骨芽細胞に蛍光タンパク Venus を発現するレポーターマウスより単離した Venus⁺ 細胞）の遺伝子発現プロファイルをデータベースより取得し、骨芽細胞系譜での *LTBP3* の発現を検討することとした。

1. データの取得

DDBJ Sequence Read Archive より、accession number DRA011310 および DRA011348（Yoshioka et al., JBMR Plus, 5 (6)：e10496, 2021）のデータを取得。FASTQ 形式のファイルを得た。

2. データ解析

mm10（genome Release M23；GRCm38.p6）をリファレンスデータに用い、ゲノムアライメントフリー定量化ツール Salmon にてシーケンスデータを定量化した。解析には R パッケージである Seurat を使用した。サンプルの品質検定を行い、各データは 1 細胞あたりのリード数を 1 万リードとなるように換算し、正規化（Log ノーマライズ）後、以降の解析に使用した。

結果および考察：

1. クラスタリング解析

クラスタリング解析を行うと、遺伝子発現パターンから各細胞は5つのクラスターに分類された。図1の縦軸は各遺伝子を示し、横軸は個々の細胞を示す。クラスター2、3、4、5は遺伝子発現パターンが近似していた。

2. 骨芽細胞系譜マーカー遺伝子と *LTBP3*

各クラスターでのマーカー遺伝子の発現を図2に示す。クラスター1では一般的に成熟度の低い細胞に関連する *Cd34* の発現が顕著であった（多重検定補正後の $p < 0.01$ ）。骨芽細胞の早期マーカーとして知られている *Runx2* および成熟骨芽細胞のマーカーとして知られている *Bglap*、*Ibsp* は全てのクラスターで発現を認めたが、クラスター1においては低値であった（多重検定補正後の $p < 0.01$ ）。*Bglap* はクラスター5で高値を認めた（多重検定補正後の $p < 0.01$ ）。

LTBP3 の発現を図3に示す。*LTBP3* は全てのクラスターに発現を認めたが、各クラスター間での発現に有意な差は認めなかった。

本研究から、*LTBP3* は *Venus*⁺ の早期および成熟骨芽細胞に発現を認めることが示唆された。今後解析を追加・発展させ、*LTBP3* のパスウェイや機能、関連遺伝子を探索することでエナメル質形成不全症発症の解明の一助となるものと考ええる。

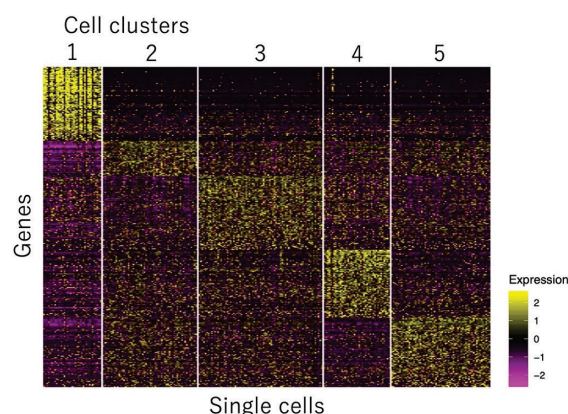


図1 Heatmap による遺伝子発現プロファイル

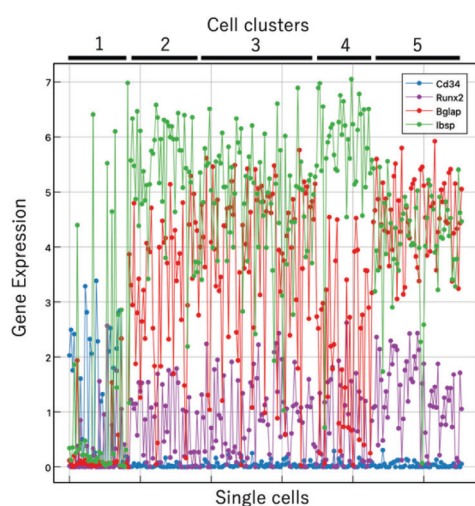


図2 マーカー遺伝子の発現

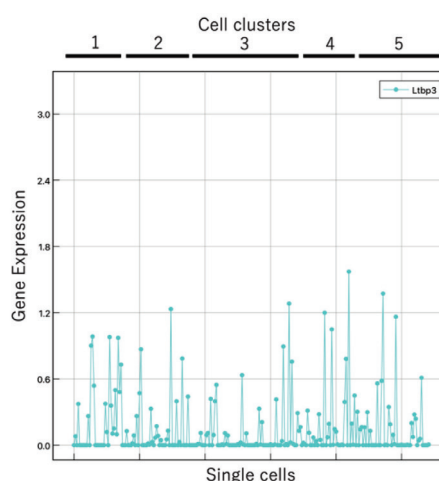


図3 *LTBP3* の発現

成果発表：（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

追加検証の後小児歯科学会にて発表予定