

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 Supaluk Trakanant
学位 位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 451 号
学位授与の日付 令和 2 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 The role of microRNA in midline formation during mandibular development
(下顎正中形成におけるマイクロ RNA の役割)

論文審査委員 主査 教授 齋藤 功
副査 教授 大峽 淳
副査 教授 前田健康

博士論文の要旨

【背景および目的】

下顎は、先天性異常が引き起こりやすい器官の一つである。つまり、下顎形成を制御する分子メカニズムは、内外の変化に敏感に反応するほど精巧なバランスによって成り立っていることを意味する。そのため、下顎における先天異常を理解するためには、正常な下顎形成における分子制御メカニズムを理解する必要がある。microRNA は、21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、タンパク質をコードしない非コード RNA の一種である。microRNA は相補性をもった標的 messenger RNA に結合することで、タンパク質への翻訳を抑制し、最終的なタンパク質量を調整する。しかし、この microRNA の下顎形成における役割には未だ不明な点が多い。そこで、本研究は、下顎発生における microRNA の役割を明らかにすることを目的に、神経堤由来細胞特異的に microRNA を欠損させたマウスを作成し検索を行なった。

【材料および方法】

microRNA は messenger RNA と同様にゲノムから転写されるが、転写後に複数のステップを経て機能を発する 1 本鎖の成熟 microRNA である。Dicer はそれらのステップにとって必須の分子であり、Dicer の欠損は、成熟 microRNA の欠損を意味する。しかし全身の細胞からの Dicer の欠損は、胎生の初期に致死となる。そこで、Cre-LoxP システムを利用して、神経堤由来細胞でのみ Dicer が欠損したマウス (*Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre*) を作成し、形態学的、分子生物学的検索を行った。

【結果】

Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre マウスは、胎生 16 日で致死となるが、胎生 15 日の下顎の正中部に溝が観察され、それらは胎生 11 日から認められることが確認された。一方で、胎生 10 日の下顎正中部には形態的異常は観察されなかったものの、アポトーシスの異常な活性と正中のマーカー分子の発現減少が認められた。これらのことから、胎生 10 日後の下顎正中部の形成が抑制されたことにより、正中部に溝が生じたと考えられた。そこで、胎生 10 日でいかなるシグナル経路の変動が生じているか確認したところ、Wnt シグナルと Shh シグナルの低下が認められた。Shh シグナルのインヒビターである *Ptch1* の発現が *Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre* マウス下顎正中で上昇していた。それら Shh シグナルまたは Wnt シグナルの低下が、*Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre* マウス下顎の正中の表現型の原因であるかを検索するために、*Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre* マウスと同じように、神経堤由来細胞でのみ Shh シグナル (*Smof1/fl;Wnt1Cre*) もしくは Wnt シグナル (*Ctnnb1/fl;Wnt1Cre*) の欠損したマウスを作成し、検索したところ、*Smof1/fl;Wnt1Cre* に *Dicer^{fl/fl};Wnt1Cre* マウスと類似した表現型を認めた。

正常マウスの下顎の間葉細胞にいかなる microRNA が発現しているか single channel microRNA で確認したところ、約 400 種の microRNA の発現が認められた。miRBase や miRDB などの複数の検索システムを利用して、それらの microRNA の中で Ptch1 と結合能を有するものがあるか確認したところ、約 17 種の microRNA に Ptch1 への結合能を認めた。

【考察】

Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎は胎生 15 日において著しい劣成長を示しているものの、今回、正中での形態的表現型の確認できた胎生 11 日において、下顎の大きさに著しい変化は認められなかった。さらに過去に Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎の劣成長の原因とされる Wnt5a の上昇は、臼歯部のみで生じていた事を申請者は確認しており、Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎の劣成長は臼歯部での変化により生じたもので、申請者が見出した正中部の表現型とは関連しないと考えられた。Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎正中中部で Shh シグナルの活性が減少していたこと、Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスと Smofl/fl;Wnt1Cre の下顎正中における表現型が類似していたこと、Shh シグナルが顔面の正中形成に必須であるとの報告がなされていることなどから、Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎正中部の表現型の原因は、Shh シグナルの減少によるものであると考えられた。さらに、下顎間葉の正中に発現している複数の microRNA が Ptch1 に結合能を有すること、Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎正中中部で Ptch1 の発現上昇が認められたことなどから、Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎正中における Shh シグナル活性の減少は、Ptch1 の上昇によるものであることが示された。一方、Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎では Wnt シグナルの低下も認められたものの、Wnt シグナルが欠如した Ctnnb1fl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎の表現型が Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎と大きく異なることより、Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎で認められる Wnt シグナルの低下は、Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの表現型との直接的な関連性は低いと推察された。

【結論】

下顎形成において、microRNA は正中での Ptch1 の発現を減少させることで Shh シグナルを活性化し、下顎の正中形成に関与することが示唆された。

審査結果の要旨

先天異常の約 3 分の 1 に、頭部の異常が含まれているとされる。特に、顎は、先天性異常が最も引き起こりやすい器官の一つであり、それは下顎形成を制御する分子メカニズムが、内外の変化に敏感に反応するほど精巧なバランスによって成り立っていることを意味する。microRNA は、21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、タンパク質をコードしない非コード RNA の一種である。microRNA は相補性をもった標的 messenger RNA に結合することで、タンパク質への翻訳を抑制し、最終的なタンパク質量を調整する。つまり、microRNA は遺伝子の発現量を調整する分子であり、microRNA を下顎形成における遺伝子発言の精巧なバランス調整の担い役と考えたことは非常に鋭い着眼点と言える。microRNA を欠損させるために、microRNA 形成過程を担う必須の分子である Dicer を欠損させた点も合理的な戦略として頷ける。また、全身からの Dicer 欠損は胎生の初期に致死となるため、そのままでは研究が成り立たなくなってしまうところを、Cre-LoxP システムを応用することで、下顎における microRNA の機能解析という実験を可能にした点も、実験の展開力として大きく評価できる。下顎形成は、上皮と間葉の相互作用によって形成されることが知られているが、Cre-LoxP システムを応用して、上皮、間葉それぞれの組織からの microRNA を欠損させ、間葉での欠損でのみに異常が引き起こったことを確認して、研究を開始しており、論理性の高い実験の進め方と感ずる。Dicerfl/fl;Wnt1Cre マウスの下顎の大きさに関する報告はすでになされているが、その原因が複数存在し、その一つに正中の欠損があることを見出した観察力の高さは特筆すべきものがある。形態変化の認められた胎生 11.5 日を探索対象とすると、分子の変化が正中の欠損によって引き起こった二次的変化なものなのか、

microRNA の欠損によって直接的に引き起こったものなのかを判別することが難しいこと、その1日前の胎生10.5日での分子変化を確認したことをもとに、胎生10.5日を検索対象とした点は、本研究の科学性の高さを示している。また、胎生10.5日は正常マウスにおいても同腹仔間での体の大きさのばらつきが大きい。そのため、somite の数が同じマウス同士を比較することで、同じステージのマウスの比較を可能にした点は、本実験のデータの信憑性を高める上で極めて重要なポイントと言える。本研究は、正中での Hh シグナルの低下が *Dicer1/fl;Wnt1Cre* マウスにおける正中異常の原因であることを、Hh シグナル欠損マウスである *Smof1/fl;Wnt1Cre* マウスにおける正中の異常が *Dicer1/fl;Wnt1Cre* マウスの正中異常と類似していることから結論づけている。このことは、データの信頼性の高さという点で意味が大きい。さらに、その Hh シグナルの低下の原因を Hh シグナルのインヒビターである *Ptch1* の上昇であると導き出したことも、Hh シグナルの活性部位と *Ptch1* の発現部位が一致することを鑑みれば、極めて信頼できる知見と言える。また、*Dicer1/fl;Wnt1Cre* マウス下顎において Wnt シグナルの低下も認められたが、Wnt シグナルが欠損したマウスである *Ctnnb1/fl;Wnt1Cre* マウスでの表現型と一致しないことから否定したことも、本研究結果の科学的レベルの高さを示している。さらに microRNA の欠損による *Ptch1* の上昇を証明するために、下顎の間葉に発現する micro RNA を全て同定し、その中から *Ptch1* へ結合可能な microRNA を選出したことも、本研究の知見の正確性を理解する上で極めて大きな意味を持つ。特に、*Ptch1* への結合能の検索を、一つのソフトではなく複数のソフトを利用して行ったことも重要なポイントとなる。さらに、選出した microRNA の発現とその発現部位を *in situ hybridization* で確認したことも、本研究の知見を確かなものにしていく。また、LNA プローブを利用しているため、*in situ hybridization* の結果の信頼性が高いことも、得られた知見を強固なものとしている。本研究は、下顎の正中に焦点を絞っているが、上顎に同じ表現型が認められなかったことに言及して、上下顎で正中形成の分子メカニズムが同一でないことを示していることは、興味深く臨床的な意義も大きい。このように本研究成果は、幅広い領域に対し影響を与えると感じる。

本研究によって得られた下顎の正中形成における microRNA の機能解析は、顔面発生研究にとっても、先天異常の発症メカニズムの理解にとっても、非常に意義のある研究といえ、学位論文としての十分な価値が認められると判断した。