

論文名 : The role of microRNAs in midline formation during mandibular development  
下顎正中形成におけるマイクロ RNA の役割

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 Supaluk Trakanant

### 【緒言】

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、タンパクへの翻訳を抑制し、最終的なタンパク量を調整する。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。

### 【材料と方法】

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<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre*) を作成し、形態学的、分子生物学的検索を行った。

### 【結果】

*Dicer<sup>fl/fl</sup>;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<sup>fl/fl</sup>;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<sup>fl/fl</sup>;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<sup>fl/fl</sup>;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

(*Smo<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre*) もしくは Wnt シグナル (*Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre*) の欠損したマウスを作成し、検索したところ、*Smo<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* に *Dicer<sup>fl/fl</sup>;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】

*Dicer<sup>fl/fl</sup>;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 *Dicer<sup>fl/fl</sup>;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、*Dicer<sup>fl/fl</sup>;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。*Dicer<sup>fl/fl</sup>;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、*Dicer<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスと *Smo<sup>fl/fl</sup>;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、*Dicer<sup>fl/fl</sup>;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、*Dicer<sup>fl/fl</sup>;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、*Dicer<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの下顎正中中部における *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、*Dicer<sup>fl/fl</sup>;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、*Ctnnb1<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの下顎の表現型が *Dicer<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの下顎と大きく異なることより、*Dicer<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウスの下顎で認められる Wnt シグナルの低下は、*Dicer<sup>fl/fl</sup>;Wnt1Cre* マウス表現型との直接的な関連性は低いと推察された。

#### 【結語】

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。