

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 永井 孝宏
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 371 号
学位授与の日付 平成 29 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 Eyelid development is controlled by mesenchymal microRNAs through regulating Wnt signaling
(**間葉の MicroRNA は、Wnt シグナルを介して眼瞼の発生を制御する**)

論文審査委員 主査 教授 高木 律男
副査 教授 大峽 淳
副査 教授 前田 健康

博士論文の要旨

【目的】

複雑で連続した形態変化を経る器官発生には、messengerRNA (mRNA) を介したタンパク形成に対する厳密な制御が必須となる。タンパク情報を持たない MicroRNA (miRNA) は特定の mRNA に結合しタンパクへの翻訳を阻害することで、タンパク量の調整に関わる。近年、この miRNA による調整が様々な生命現象をコントロールすることが明らかにされてきている。しかし、miRNA の器官発生での役割については、未だ不明な点が多い。哺乳類の眼瞼発生は、その過程における癒合と分離を特徴としており、マウスでの癒合または分離の異常は、出生時開眼異常 (Eyelid open at birth: EOB) として現れる。EOB は識別が容易な表現形であるため、器官形成における分子制御メカニズム解明にとって優れた実験モデルとなる。そこで、本研究では、この眼瞼発生における miRNA の機能を解析した。

【方法】

Dicer は miRNA 形成に不可欠な分子であり、その欠損により miRNA は機能を失う。しかし、全細胞における *Dicer* 欠損は眼瞼形成前に胎生致死となるため、眼瞼形成の検索には使用できない。そこで、上皮組織特異的 *Dicer* 欠損マウス (*Dicer^{f/f}/K14Cre*) と、神経堤由来間葉組織特異的 *Dicer* 欠損マウス (*Dicer^{f/f}/Wnt1Cre*) を作成し、眼瞼の形態学的、分子生物学的検索を行った。

【結果】

Dicer^{f/f}/K14Cre マウスの眼瞼に著しい異常は認められなかった。一方、全ての *Dicer^{f/f}/Wnt1Cre* マウスで EOB が確認された。組織学的検索から、*Dicer* 欠損マウスの EOB は眼瞼原器が癒合する前に発生が停止されることにより引き起こる事が明らかとなった。また、*Dicer^{f/f}/Wnt1Cre* の眼瞼における細胞増殖に差は認められなかったものの、アポトーシス活性が有意に増加していた。補体成分の C1q を構成する各分子 (C1qa, C1qb, C1qc) の RNA 量の増加が *Dicer* 欠損マウスで認められ、C1qa siRNA による C1q の機能抑制により *Dicer* 欠損マウスの眼瞼発生が正常化し癒合が確認された。一方、*Dicer^{f/f}/Wnt1Cre* マウスでは、Wnt シグナルのインヒビターである *Dkk2* の減少と、Wnt シグナル活性の上昇も認められた。*Dkk2* 欠損マウスが EOB を示すことは過去に報告されており、*Dkk2* 欠損マウスに認められる角膜上皮の平坦化と、結膜における毛包の異所性形成も、*Dicer^{f/f}/Wnt1Cre* マウスで観察された。さらに、*Dicer* 欠損マウスの器官培養への DKK2 タンパク質の添加により、*Dicer* 欠損マウスの眼瞼発生がレスキューされ、眼瞼癒合が確認された。一方、眼瞼形成に重要とされる Fgf や Shh シグナルの減少も *Dicer^{f/f}/Wnt1Cre* マウスで確認されたが、それらのシグナルの意図的増加による眼瞼発生の正常化は、観察されなかった。

【考察】

今回の結果より、眼瞼原器の間葉に発現する miRNA は眼瞼に必須であり、その欠損によりアポトーシスが誘導され、眼瞼形成が停止し EOB に至ることが示された。また、DKK2 タンパクの添加により *Dicer* 欠損マウスの眼瞼発生が正常化したことは、*Dkk2* の減少とそれに伴う Wnt の上昇が EOB の大きな誘因因子であることを示唆している。しかし、miRNA の欠損は、標的の mRNA の発現増加を引き起こすため、*Dicer* 欠損マウスで減少している *Dkk2* は miRNA の直接の標的遺伝子ではない。一方、*Dicer* マウスでは補体成分である C1q が過剰発現していた。この C1q の抑制により眼瞼発生が正常化したことは、C1q が眼瞼における miRNA の重要なターゲットであることを示している。近年、様々な組織における老化現象で、Wnt シグナルが活性化することは知られている。C1q は老化において Wnt シグナルを誘導し、老化における Wnt シグナルの増加はアポトーシスを活性化することが報告されている。*Dicer* 欠損マウスでの EOB は、本来、胎児期に活性化されない老化関連のシグナルが、miRNA の欠損により誘導されたことで引き起こった可能性が考えられる。このように miRNA は、不必要な遺伝子を排除することで、正常な器官形成に関与することが示された。

審査結果の要旨

近年、microRNA は、様々な生物現象への関与が報告され、バイオマーカーとしても注目を集めているものの、その機能の多くは謎のままである。*Dicer* の欠損により microRNA は機能を失う。しかし、その *Dicer* ノックアウトマウスが胎生の非常に早期の段階で致死となる為、発生期間中における機能は明らかにされていない。その打開策として組織特異的 *Dicer* 欠損マウスが報告され、歯などの異常が認められるものの、その表現形の発生率にはばらつきがあり、実験モデルとしての優位性は低い。そこで本研究では、全ての神経堤由来細胞特異的 *Dicer* 欠損マウスに認められる出生時開眼異常 (Eyelid open at birth: EOB) を microRNA の機能解析の為の実験モデルとしたことは、特筆すべき点である。特に、眼瞼形成は、歯や舌などの組織と同様に上皮と間葉の相互作用から発生するため、本研究における知見は他の組織の発生研究にとっても非常に大きな意義を持つ。さらに眼瞼形成異常は鑑別が容易であることも、実験モデルとして大きな利点である。本研究では、上皮組織特異的 *Dicer* 欠損マウス (*Dicer*^{f/f}/*K14Cre*) と、神経堤由来間葉組織特異的 *Dicer* 欠損マウス (*Dicer*^{f/f}/*Wnt1Cre*) の両方を作成し、間葉特異的 *Dicer* 欠損マウスのみ EOB を認めたという。このように、上皮と間葉それぞれの組織特異的欠損マウスを作成し、眼瞼原器の間葉に発現する microRNA のみが眼瞼に必須であることを見出した点は、非常に高く評価できる。さらに、*Dicer* 欠損マウスの EOB は、眼瞼原器が癒合する前に発生が停止されることにより引き起こる事、*Dicer*^{f/f}/*Wnt1Cre* の眼瞼における細胞増殖に差は認められなかったものの、アポトーシス活性が有意に増加していた事から、*Dicer* の欠損によりアポトーシスが誘導され、眼瞼形成が停止し EOB に至ったとする結論も評価できる。また、補体成分の C1q を構成する各分子 (C1qa, C1qb, C1qc) の RNA 量の増加が *Dicer* 欠損マウスで認められ、C1qa siRNA による C1q の機能抑制により *Dicer* 欠損マウスの EOB がレスキューされたという知見は特筆すべき事である。多くの変動分子の中で、原因となる分子の同定を、表現形のレスキューにより行う手法は、本申請の研究精度の高さを示している。さらに C1q に加え、*Dicer*^{f/f}/*Wnt1Cre* マウスでは、Wnt シグナルのインヒビターである *Dkk2* の減少と、Wnt シグナル活性の上昇を認めた点、EOB を示す *Dkk2* 欠損マウスに認められる角膜上皮の平坦化と、結膜における毛包の異所性形成を、*Dicer*^{f/f}/*Wnt1Cre* マウスでも確認した点は、本申請の真理追求の幅の広さを表している。さらに、*Dicer* 欠損マウスの器官培養への DKK2 タンパク質の添加により、*Dicer* 欠損マウスの眼瞼発生がレスキューされ、*Dkk2* の減少とそれに伴う Wnt の上昇も EOB の大きな誘因因子であることを示している。このように、Wnt シグナルと C1q という 2 つの別々の分子の関与を示した点は興味深い。

microRNA の欠損は、標的の mRNA の発現増加を引き起こすため、*Dicer* 欠損マウスで減少している *Dkk2* は microRNA の直接の標的遺伝子ではない。一方、*Dicer* マウスでは補体成分である C1q は過剰発現しており、この C1q の抑制により *Dicer* 欠損マウスの眼瞼発生が正常化したことは、C1q が眼瞼における microRNA の重要なターゲットであることを示している。この論理展開

は、非常にクリアであり、多くの示唆を与えている。とくに、**C1q** は、**C1qa**、**C1qb**、**C1qc** の3つの分子で構成されているため、それら3つの共通のコアプロモーターを制御する分子が **microRNA** のターゲットであると考察した点は非常に興味深い。また、**Wnt** シグナルが様々な組織の老化現象で、活性化すること、**C1q** は老化において **Wnt** シグナルを誘導し、老化における **Wnt** シグナルの増加はアポトーシスを活性化することに着目した点は、特筆すべき点である。以上のことから、**Dicer** 欠損マウスでは、本来、胎児期に活性化されることのない老化関連のシグナルが、**microRNA** の欠損により誘導されたことで、**EOB** が引き起こったとする本研究の結論は非常に大きな発見と言える。**microRNA** は、不必要な遺伝子を排除することで、正常な器官形成に関与するという本論文の知見は、今まで報告がなく、生物学的に非常に価値のあるものと考えられる。

本論文は、全ての神経堤由来細胞特異的 **microRNA** 欠損マウスに認められる表現形である **EOB** を利用することで、より精巧で詳細な **microRNA** の機能を解析することに成功している。その研究成果の生物学、発生学における意義は極めて大きく、学位論文としての十分な価値が認められる。