

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06324・19K21408

研究課題名(和文) 時間軸を考慮した顎顔面形成におけるmicroRNAの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of microRNAs in craniofacial formation considering the time axis

研究代表者

永井 孝宏 (Takahiro, Nagai)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70827675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、組織特異的欠損Cre-LoxPシステムにERを導入することにより、microRNAを好きな時期に欠損させることで、顎顔面発生メカニズムにおけるmicroRNAの機能の把握を目指す。そのために、ERの導入されたDicer;Gli1ERTCreを作成した。しかし、胎児への十分な量のタモキシフェンが到達しなかった。そこで、胎児をroll bottle法による器官培養を行う中で、培養液へタモキシフェンを投与する方法を試みた。Dicer;Gli1ERTCre マウスの頭部のroll bottle法による器官培養に、4-OH-タモキシフェンを添加し、正中と舌の形成異常を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顔面形成は、胎生10.5から数日であればroll bottle法により器官培養で、形態的にある程度は正常な発生を誘導することが可能である。Dicer; Gli1ERTCreマウスの頭部をroll bottle法により器官培養し、その培養液に4-OH-タモキシフェンを添加させたところ、下顎の正中の形成不全が確認できた。Dicer; Gli1ERTCreマウスでは、舌の形成も抑制されていた。roll bottle法により器官培養に、タモキシフェンを応用することで、顎顔面発生の各時期におけるmicroRNAの機能の把握が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to understand the function of microRNAs in the mechanism of maxillofacial development by introducing ERs into the tissue-specific deficiency Cre-LoxP system, allowing microRNAs to be deficient at any given time. For this purpose, we created the ER introduced Dicer;Gli1ERTCre. However, treatment of maternal mice with tamoxifen did not induce Dicer deficiency in the fetus. It is likely that sufficient amounts of tamoxifen did not reach the fetus. Therefore, we tried to administer tamoxifen to the culture medium in fetal organ cultures by the roll bottle method: 4-OH-tamoxifen was added to the organ cultures of the head of Dicer;Gli1ERTCre mice by the roll bottle method, and abnormalities in the formation of the midline and tongue were confirmed.

研究分野：発生生物学

キーワード：microRNA 顎顔面形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

顎顔面は、体内で最も複雑な構造と機能を有するため、発生過程における顎顔面形成の制御メカニズムも複雑を極める。一方で、先天性疾患の3分の1に顎顔面異常が認められることは、その精巧なメカニズムが、外的・内的要因の変化に簡単に破綻することも意味している。なぜ顎顔面が他の器官の形成メカニズムに比べ、影響を受けやすいのかは、全く明らかにされていない。顎顔面の脆弱性の理解には、顎顔面の分子発生メカニズムの正確な把握が必須となる。

### 2. 研究の目的

そのような極めて厳格な制御が求められる形成過程を、セントラドグマ(DNA RNA タンパク質)というシンプルな機構のみで、制御しているとは考えにくい。タンパクをコードしない microRNA は、ターゲットのメッセンジャーRNA と結合することによりタンパクへの翻訳を阻害し、タンパク量を調節する分子群である。microRNA の欠損は、顎顔面のほとんどを欠損させることが報告されており、microRNA が顎顔面形成のメインプレーヤーの一つである事を示している。しかし、顎顔面がほとんど形成されないという表現形は、重篤すぎて機能解析には適さない。顎顔面の発生は、半日単位での継時的な変化を大きな特徴とするため、microRNA を単純に除去するという手法では、microRNA の顎顔面形成における役割を把握することはできない。そのため、新しい実験デザインが必要である。

Cre と変異エストロゲン受容体の融合タンパク質である Cre-ER を Cre-LoxP システムに応用することで、タモキシフェンを注射した時から、遺伝子を欠損させることが可能となる。つまり、このシステムの応用により、特定の部位から、好きな時期に microRNA を欠損させることができ、microRNA の時間的・空間的な機能の解析が可能となる。顎顔面の発生は、半日単位での継時的な変化を大きな特徴とするため、重篤すぎる表現形への対応は、任意の時期で遺伝子を欠損させるような時間軸を考慮した研究デザインにより回避できる。

そこで本研究では、組織特異的欠損 Cre-LoxP システムに ER を導入することにより、microRNA を好きな時期に欠損させることで、顎顔面発生メカニズムにおける microRNA の機能の把握を目指した。

### 3. 研究の方法

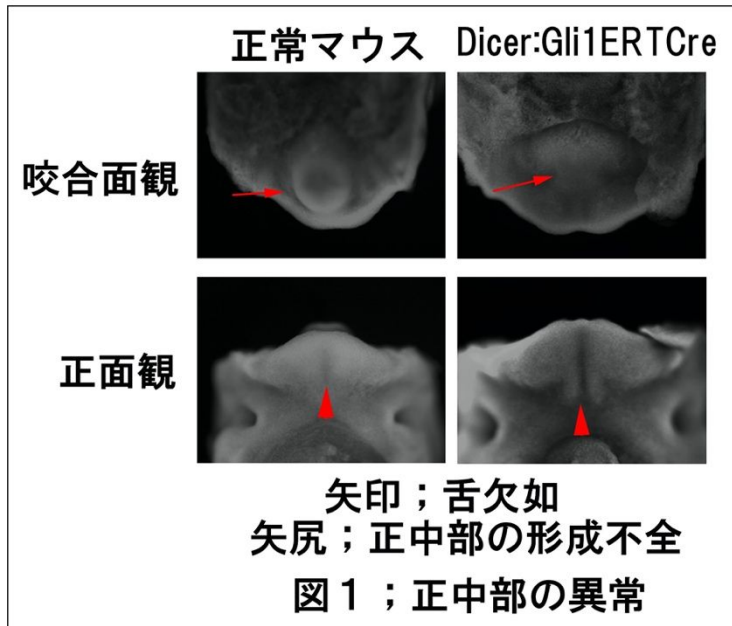
Gli1 は顔面形成の初期から発現し、特に正中領域の形成に重要であることが知られている。そこで、Gli1ERTCre マウスと Dicer flox マウスとの交配により Dicer; Gli1ERTCre マウスを作成することで、様々な時期における Dicer 欠損マウスをタモキシフェンの投与時期を変更することにより作成し、microRNA の様々な時期における役割の解析を行った。

### 4. 研究成果

microRNA の顔面形成における役割を知るためには、Dicer; Gli1ERTCre マウスが子宮内にいるときにタモキシフェンを作用させる必要がある。タモキシフェンに胎盤透過性があることは知られている。そこで、Dicer; Gli1ERTCre マウスを子宮内に持つ母親マウスに、Dicer; Gli1ERTCre マウスが胎生 10.5 日になる時期にタモキシフェンを腹腔内投与した。しかし、Dicer; Gli1ERTCre マウスが胎生 16.5 日となった時期で、Dicer; Gli1ERTCre マウスを取り出したが、大きな変化は認められなかった。そこで、Dicer; Gli1ERTCre マウスが胎生 9.5 日、8.5 日になる時期に投与したものの、Dicer; Gli1ERTCre マウスが胎生 16.5 日となった時期で、Dicer; Gli1ERTCre マウスを取り出しても大きな変化は認められなかった。そこで、タモキシフェンの量を増やしたところ、全ての胎子が投与直後に致死となっていた。そこで、タモキシフェンの投与方法を、oral gavage に変更して、同様の時期に同じ実験を行ってみたが、結果は同じであった。タモキシフェンの母親への投与で、子宮内の胎仔に到達しているか確認するために、Cre リコンビナーゼが発現した細胞に YFP が発現するように設計したマウス(Dicer; Gli1ERTCre;R26-YFP)を作成し、タモキシフェンを腹腔内投与、oral gavage による投与を行ってみたが、YFP の発現は確認できなかった。これらのことより、母親への投与では、胎仔に Cre リコンビナーゼを発現させるだけの十分量のタモキシフェンが到達しないことと結論づけた。

顔面形成は、胎生 10.5 から数日であれば roll bottle 法により器官培養で、形態的にある程度は正常な発生を誘導することが可能である。体内に投与したタモキシフェンは、4-OH-タモキシフェンに変化することで、ERTCre に反応する。そこで、Dicer; Gli1ERTCre マウスの頭部を roll bottle 法により器官培養し、その培養液に 4-OH-タモキシフェンを添加させたところ、下顎の正中の形成不全が確認できた。Dicer; Gli1ERTCre マウスでは、舌の形成も抑制されていた(図1)。roll bottle 法により器官培養に、タモキシフェンを応用することで、顎顔面発生

の各時期における microRNA  
の機能の把握が可能であるこ  
とが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----