

平成20年3月24日

先端研究拠点事業による派遣研究者

研究報告書

派遣研究者

所属機関・職 東京医科歯科大学難治疾患研究所・助教

氏 名 早田 匡芳

1. 派遣国名 アメリカ合衆国
2. 研究課題等 骨・軟骨疾患の先端的分子病態生理学研究の国際的拠点形成
3. 派遣期間（本邦出発から帰国まで）
平成18年1月19日 ～ 平成18年3月21日（63日間）
4. 主な受入機関及び受入研究者
ハーバード大学医学部遺伝学科、Cliff Tabin 教授（学科長）
5. 所期の目的の遂行状況及び成果（研究内容、講演、調査等実施の状況とその成果）

今回の研究交流の目的は、私のこれまでの研究を、異なったシステムを用いて発展させる事であった。私は、骨芽細胞分化における **microRNA** の機能解析を行ってきたが、私の研究は、すべて培養細胞を用いた実験であり、これらの **microRNA** の骨芽細胞分化における生体内での意義は不明であり、かつ、明らかにしなければならない事項であった。そのためには、1) **microRNA** が骨組織に発現しているかどうか、2) **microRNA** の成体内への過剰発現により、骨量が変化するかどうかを調べる事が必要であった。今回、ハーバード大学医学部遺伝学科 (Department of Genetics, Harvard Medical School) の Dr. Cliff Tabin の研究室に長期間滞在し、以下の研究を行った。Tabin 博士の研究室は、四肢のパターニング、骨形成、**microRNA** などを発生生物学的なアプローチで解析し、**Nature, Cell, Science** などに非常に優れた論文を発表している世界トップレベルの研究室である。

1) In situ hybridization (ISH) による **microRNA** の発現パターンの解析

microRNA は、20-22 塩基からなる低分子 RNA で、通常の mRNA に比べて、検出が非常に難しい。ニワトリ胚に対して、特殊なプローブ (LNA probe) を用いて、ISH を行ったとこ

ろ、体節、鰓弓、神経管、肢芽、**apical ectodermal ridge (外胚葉性頂堤, AER)**に発現していることがわかった。特に、肢芽は、将来の骨組織を含むので、注目すべき点である。

次に、ニワトリ骨組織の凍結切片を作成し、**ISH**を行った。本来なら、骨を脱灰し、パラフィン切片を作成するが、**microRNA**は、非常に不安定なので、切片作成過程で分解してしまう恐れがあったので、凍結切片を作成した。バックグラウンドが高かったが、コントロールに用いた **mir-206** は、筋肉に強く発現し、骨にはほとんど発現していなかったが、研究対象の **microRNA** は、軟骨、筋肉に同レベルで発現しているように見られた。今後は、明瞭なシグナルを得るために、プローブの標識法を改善し、バックグラウンドを低くする工夫が必要である。

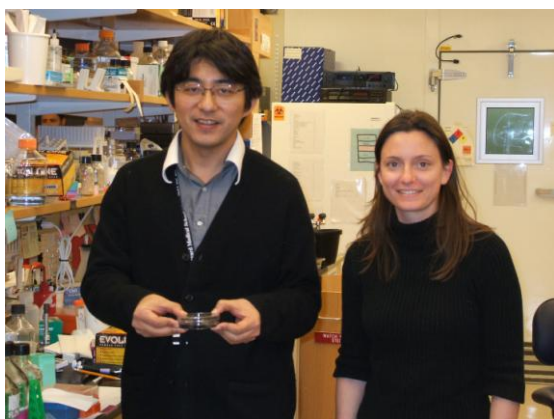
2) RCAS ウイルスを用いた **microRNA** のニワトリ胚への過剰発現

microRNA をニワトリ胚で過剰発現させるために、**RCAS** ウイルスを用いた。最初に、成熟 **microRNA** を含む領域 **500bp** をマウスゲノム **DNA** から **PCR** により増幅した。次に、その **PCR** 断片をマウス **U6** プロモーターの下流に組み込んだ。次に、**U6-microRNA** のカセットを、**RCAS** ウイルスベクター **RCAS-BP (A)** に組み込んだ。各段階で塩基配列を読み、塩基配列が正しい事を確認した。完成したベクター **RCAS-BP (A) -U6-mmu-microRNA** をニワトリ繊維芽細胞 **DF-1** に **transfection** し、14日培養後、ウイルスを回収した。そのウイルスをニワトリ胚 (10 体節期、**st. 10**) の将来の前肢、後肢の部分に微量注入した。骨表現型を解析するために、13日胚で、骨格標本作製する予定だったが、帰国日には間に合わなかったため、現地の共同研究者 **Dr. McGlinn** をお願いすることになった。さらに、微量注入の再実験を行うことをお願いした。これで表現型が得られたら、さらに解析を進めていく予定である。

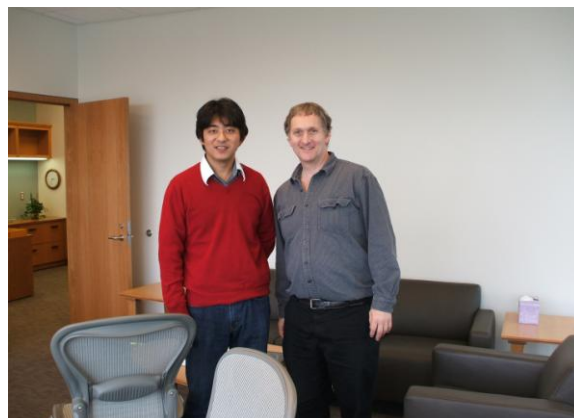
6. その他 (特記事項など)

最後に、**Tabin** 教授と1対1の **Discussion** を行い、また、研究室のミーティングで研究発表を行ったが、好評だった。

研究室訪問の際の写真



共同研究者の **Dr. Edwina McGlinn**



受け入れ研究者 **Cliff Tabin** 教授