

論文の内容の要旨

氏名：友 木 里 沙

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ヒト歯嚢由来細胞の microRNA 発現解析および骨形成能

－石灰化における miR-29 の影響とラット生体での骨形成の評価－

近年、再生医療分野において、ヒト成体幹細胞を用いた研究が注目されている。骨髄由来のヒト未分化間葉系幹細胞 (human mesenchymal stem cells from bone marrow: hMSC) は、成人の体内からも採取が可能であること、骨芽細胞や脂肪細胞などへの分化能を有することから、様々な再生医療に臨床応用されている。また、骨髄以外にもヒト未分化間葉系幹細胞は種々の成体組織に存在することが明らかとなった。そこで、健常部への侵襲が少なく、治療に必要な十分な細胞数が得られる細胞源の検索が行われている。

歯嚢は、神経堤の外胚葉性間葉組織由来の結合組織で、歯科治療の過程で破棄される組織であるため、新たに生体侵襲を加えることなく再生医療用の細胞を採取することが可能である。歯嚢には、未分化間葉系幹細胞が存在すること、ヒト歯嚢から分離したヒト歯嚢由来細胞 (human dental follicle cells: hDFC) は、骨芽細胞誘導培地 (osteogenic induction medium: OIM) で培養すると石灰化することが確認されている。hDFC は、Notch-1, STRO-1 などの幹細胞マーカーや、CD29, CD44 などの間葉系細胞マーカーが発現することから、hMSC と類似した性質を有する。さらに、hDFC は hMSC と比較して、細胞増殖能が優れているとの報告もある。そのため、hDFC は、骨再生医療の細胞源としてだけでなく、石灰化機序研究用の体性幹細胞としても有用ではないかと示唆される。

MicroRNA は、20-25 塩基程度の内在性 small non-coding RNA で、相補性を有する mRNA の 3' 末端領域に結合することで、翻訳の制御や mRNA の分解に関与するといわれている。また、microRNA は、発生や組織形成、細胞の増殖や分化といった生物学的機能を制御することが明らかとなった。最近では、骨芽細胞の分化や石灰化に関与する microRNA の検索を目的に、MC3T3 細胞や C3H10T1/2 細胞を用いた microRNA 研究が行われている。本研究の第一の目的として、hDFC の石灰化に関与する microRNA の検索を目的に、hDFC の石灰化過程における microRNA の網羅的遺伝子発現解析を行った。また、hDFC の石灰化過程で発現変動した microRNA が hDFC の石灰化に関与するのかが検討した。

次に、ラット頭頂骨上へ hMSC を移植し、新生骨形成能を評価した。hMSC を骨芽細胞へ分化誘導する場合、通常は培地中へ Dexamethasone (DEX) を添加する。しかし、DEX は多様な副作用を有するステロイドであり、再生医療材料への使用は避けることが望ましいと考える。hDFC は、*in vitro* において、DEX を添加しない OIM [OIM DEX (-)] で培養しても石灰化することが報告されているが、生体内における新生骨形成能についての報告はまだない。本研究の第二の目的として、OIM DEX (-) で培養した hDFC を生体内へ移植した時の新生骨形成能を検討することとした。hDFC を GM または OIM DEX (-) で三次元培養し、ラット頭頂骨上へ移植した。移植後、経時的な新生骨形成を組織学的、免疫組織学的に観察した。さらに、Micro-CT を用いて形成された新生骨の三次元骨梁構造計測を行った。

本研究は、hDFC の microRNA 解析を行うことにより、石灰化に関与する microRNA を検索するとともに、hDFC をラット生体内へ移植した時の新生骨形成能を検討した。

本研究により、以下の結果を得た。

- 1) hDFC の石灰化過程で 1/2 以下に発現減少する microRNA 中に miR-29a, miR-29b, miR-29c を認めた。
- 2) OIM DEX (+) で培養した hDFC では、GM での培養と比較して miR-29a, miR-29b, miR-29c の遺伝子発現が減少した。
- 3) miR-29 family の標的遺伝子に collagen type I α 1 および α 2 を認めた。
- 4) hDFC に miR-29 family を遺伝子導入すると、I 型コラーゲンタンパク質産生量が減少した。
- 5) hDFC に miR-29 family を遺伝子導入すると、石灰化が抑制し、特に miR-29b は最も高い石灰化抑制効果を示した。
- 6) hDFC をラット頭頂骨上へ移植後 4 週目、組織学的所見において、両群ともに新生骨を認めたが、OIM DEX (-) 群は GM 群と比較してより多くの新生骨を認めた。
- 7) hDFC をラット頭頂骨上へ移植後 4 週目、Micro-CT 画像分析にて、OIM DEX (-) 群は GM 群と比較してより多くの新生骨を認め、BMD, BMC, BV など全てにおいて高値を示した。

8) hDFC をラット頭頂骨上へ移植後 4 週目, 免疫組織化学的所見において, 両群ともに BMP2, RUNX2, Osterix および VEGF の陽性所見を認めた.

以上の結果から, hDFC の石灰化には miR-29 family の減少による I 型コラーゲンの産生上昇が関与していることが示唆された. また, DEX 非存在下で新生骨を形成する歯嚢は, 骨再生医療の細胞源として有用であることが示唆された.