

## 論文審査の結果の要旨

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－

審査委員：（主査）教授 小方 頼昌

（副査）教授 近藤 壽郎

教授 吉垣 純子

歯嚢組織には未分化間葉系幹細胞が存在し、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報告されている。歯嚢は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採取可能である。そのため、hDFC は、骨再生医療応用や、石灰化機序研究用の体性幹細胞としての有用性が示唆されている。

内在性 small non-coding RNA である MicroRNA は、翻訳や mRNA の分解に関与し、発生や形態形成、細胞増殖や分化などの生物学的機能を制御するといわれている。そこで、まず、hDFC の石灰化に関与する microRNA の検索を目的に、hDFC の microRNA の網羅的遺伝子発現解析を行い、hDFC の石灰化過程で発現変動した microRNA の hDFC の石灰化への影響を検討した。

次に、hDFC を Dexamethasone (DEX) を添加しない OIM [OIM DEX (-)] で培養し、ラット頭頂骨上へ移植した時の新生骨形成能を検討した。通常、未分化間葉系幹細胞の OIM には DEX を添加するが、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。

著者は、hDFC の石灰化に関与する 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、以下の結果を得た。

- 1) hDFC の石灰化過程で 1/2 以下に発現が減少する microRNA 中に miR-29a, miR-29b, miR-29c を認めた。
- 2) OIM DEX (+) で培養した hDFC 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  $\alpha$ 1 および  $\alpha$ 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 OIM DEX (-) で培養すると、Alizarin red S 染色陽性所見を認めた。
- 7) 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るが、OIM DEX (-) 群は GM 群と比較してより多くの新生骨を認めた。
- 8) 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。
- 9) 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。

本論文は、hDFC の石灰化過程での miR-29 family の発現減少が、I 型コラーゲンの産生上昇を誘導する可能性を示した。また、Dexamethasone を含まない骨芽細胞誘導培地での培養でも、hDFC はラット生体内において骨形成を促進することを示した。これらの結果は、hDFC の石灰化機序の一端を明らかにすると同時に、歯嚢が骨再生医療のための細胞供給源候補となる可能性を示唆するものである。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 27 年 1 月 22 日