

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 —

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻

友木 里沙

(指導：近藤 壽郎 教授)

**MicroRNA expression analysis and bone formation ability in human dental follicle cells**  
**— Effect of miR-29 during mineralization and evaluation of bone formation in vivo using rat —**

Risa Tomoki

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo,  
Department of Oral and Maxillofacial Surgery

**ABSTRACT**

The dental follicle is an ectomesenchymal tissue surrounding developing tooth germ, and contains osteoblastic-lineage-committed stem/progenitor cells.

Micro RNAs are small non-coding RNAs that regulate gene expression during stem cell growth, proliferation and differentiation. The first, this study is to investigate the key regulators of microRNA during osteogenic differentiation in hDFC. We analyzed miRNA expression profiles in hDFC during osteoblastic differentiation. Expression of miR-29a, -29b and -29c decreased in hDFC during osteogenic induction on microarray analysis. Real-time RT-PCR analysis also showed that the expression of miR-29 family members was significantly decreased in hDFC cultured with osteogenic induction medium (OIM) compared to that with growth medium (GM). The miR-29 family was predicted to target  $\alpha 1$  type I collagen and  $\alpha 2$  by in silico analysis. When miR-29s were transfected into hDFC, type I collagen production decreased. In addition, hDFC transfected with miR-29 mimics showed delayed mineralization when compared to hDFC transfected with negative control and nontransfection culture. Our data suggest that miR-29 negatively regulates the osteogenic differentiation/mineralization of hDFC by targeting type I collagen.

hDFC subjected to 3D culture OIM without dexamethasone (DEX) or GM were transplanted onto the calvarias of F344/NJcl-rnu/rnu male rats. The next, this study is to evaluate the bone formation ability in transplantation of dental follicle cells. H-E staining showed newly formed bone in 3D culture. Immunohistochemistry showed BMP-2, RUNX2, and Osterix staining in areas with newly formed bone. Furthermore, Micro-CT showed transplanted hDFC promoted better bone quality bone mineral density (BMD), bone volume (BV).

In conclusion, these data suggest that miR-29 is negative regulator to the osteogenic differentiation/mineralization of hDFC by targeting type I collagen and hDFC cultured in OIM without DEX have higher ability for bone formation. Therefore, hDFC may be useful in bone regeneration .

## 緒 言

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<sup>1, 2)</sup>。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<sup>2)</sup>。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<sup>3)</sup>、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<sup>3, 4)</sup>。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<sup>5)</sup>。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<sup>6)</sup>。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、翻訳の抑制や mRNA の分解に関与するといわれている<sup>7)</sup>。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<sup>9-11)</sup>。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<sup>12, 13)</sup>。

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検討した。

次に、ラット頭頂骨上へhDFC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<sup>14)</sup>。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<sup>15)</sup>、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、免疫組織化学的に観察した。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。

## 材料および方法

### 1. hDFC の分離および培養

十分なインフォームドコンセントの得られた患者から下顎埋伏智歯を抜去し、その歯冠に付着する歯嚢を分離採取した。歯嚢を PBS で洗浄し、血液成分を取り除いた後、メスを用いて細切し、0.1 U/ml collagenase type 1 と 1 U/ml dispase (Roche) を用いて 37°C で 1 時間酵素処理をし、hDFC を分離した。分離した歯嚢は増殖培地 (GM: Mesenchymal stem cell growth medium, Lonza) を用い、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in air 条件下で初代および継代培養を行った。GM の組成は、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (Lonza) に MSCGM SingleQuots<sup>®</sup> (10% FBS: fetal bovine serum, L-glutamine, penicillin/streptomycin, Lonza) を加えたものとした。培地は 3 日ごとに交換した。実験には継代数 5~6 の hDFC を使用した。本実験は日本大学松戸歯学部倫理委員会 (承認番号: EC05-025, EC10-036) の指針に従って行った。

### 2. 骨芽細胞への分化誘導

hDFC は  $3.1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、24 時間後に骨芽細胞誘導培地 (OIM: Mesenchymal stem cell osteogenic induced medium, Lonza) に置換した。OIM は、Osteogenic Basal Medium (Lonza) に Osteogenic SingleQuots<sup>®</sup> (10% FBS, ascorbate,  $\beta$ -glycerophosphate, DEX, L-glutamine, penicillin/streptomycin, Lonza) を加えたものとした。また、DEX を添加している培地を OIM DEX (+), 添加していない培地を OIM DEX (-) とした。培地を OIM に交換した日を培養 0 日目とし、翌日を培養 1 日目とした。

### 3. Alizarin Red S 染色

hDFC を 10%中性ホルマリンで 30 分間固定後, 1% Alizarin 溶液 (Kanto chemical) で 10 分間染色を行った.

### 4. Alkaline Phosphatase 活性

Alkaline Phosphatase 活性は, StemTAG™ Alkaline Phosphatase Activity Assay Kit (Cell Biolabs) を用いた. 遊離した *p*-nitrophenyl 量を 415 nm で測定し, 1  $\mu$ mol の *p*-nitrophenyl が 1 分間に遊離する力価を 1 unit とした.

### 5. RNA の抽出

hDFC は 100 mm dish に  $1.5 \times 10^5$  cells/dish で播種し, 24 時間後に GM または OIM DEX (+) に置換した. 継時的に miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した.

### 6. microRNA microarray 解析

microRNA microarray 解析には, 培養 0 日目の hDFC と OIM DEX (+) で 7 日間培養した hDFC から抽出した total RNA を用いた. Microarray に用いる total RNA の純度および品質は, RNA6000 Nano Gel System を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で確認した. MicroRNA 発現解析は, Agilent human miRNA Rel. 12.0 arrays (Agilent Technologies) を用いて, Agilent technologies 社のプロトコールに従って測定した. MicroRNA を含んだ total RNA を 100 ng を Agilent Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies) を用いて Cyanine3 (Cy3) でラベルした. Cy3 ラベル RNA を array に添加後, 55°C にて 20 時間

hybridizationを行った。スライドは洗浄し、遠心分離を行った (3000 rpm, 室温)。スキャナー (Agilent Technologies) で画像を取り込み、Feature Extraction Software (Agilent Technologies) で蛍光強度を数値化した。遺伝子発現解析は GeneSpring GX software (Agilent Technologies) を用いた。

## 7. microRNA 標的遺伝子の検索

microRNA の標的候補遺伝子は、microRNA データベース (TargetScan, TarBase, miRecords) を用いて検索した。

## 8. Real-time RT-PCR

MicroRNA 発現量は、miScript System (QIAGEN) を用いてプロトコールに従い測定した。まず、miScript Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて 100 ng total RNA から cDNA を作成した。cDNA に Primer Assay (QIAGEN) および miScript SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit (QIAGEN)で PCR 反応液を作製し、DNA Engine Opticon1 (BioRad) で 95°C 15 分間加熱後、94 °C 15 秒, 55 °C 30 秒, 70°C 30 秒を 40 サイクル行い、蛍光強度を継続的にモニターした。プライマーは、Primer Assay (hsa-miR-29a forward, 5'-UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA-3'; hsa-miR-29b forward, 5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU-3'; hsa-miR-29c forward, 5'-UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA-3'; RNU6 forward primer) および 10×miScript Universal Primer (reverse primer) を使用した。コントロールとして RNU6 を用いた。遺伝子発現量は  $\Delta\Delta C_T$  法で計算した。

## 9. MicroRNA transfection

hDFC を  $3.1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で 24 well plate に播種し, 24 時間後に OIM DEX (+) に交換した. MicroRNA transfection 溶液は, 2  $\mu$ M miScript miRNA Mimic (QIAGEN) 1.5  $\mu$ l (3 種類同時添加の場合は 0.5  $\mu$ l ずつ), HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) 3  $\mu$ l に Mesenchymal Stem Cell Basal Medium を加えて全量を 100  $\mu$ l とした. MicroRNA transfection 溶液を室温で 10 分間 incubation して transfection complex を形成させた後, OIM DEX (+) に交換した hDFC に添加した. Negative control として, AllStars Negative Control siRNA (QIAGEN) を transfection した. Transfection は培養 0 日目, 培養 3 日目に行った. 培地交換は 3 日ごとに行った.

## 10. ELISA

MicroRNA を transfection した hDFC の培養 3~6 日目の培養上清を採取した. ヒトコラーゲンタイプ 1 ELISA Kit (ACEL) を用いて, 培養上清中の I 型プロコラーゲンおよび I 型トロポコラーゲン量を測定した.

## 11. hDFC の三次元培養

$\beta$ -TCP 強化型ゼラチンスポンジ (直径 3.0 mm  $\times$  高さ 2.0 mm, pore size: 100-300  $\mu$ m, MedGel) をスキャフォールドとして用いた.  $5.0 \times 10^5$  cells/ml に調整した hDFC 懸濁液 25  $\mu$ l を 96 well plate 内でスキャフォールドに滴下, CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub> in air 条件下) で 1 時間静置し, スキャフォールドに hDFC を定着させた. その後, GM または OIM DEX (-) を 0.2 ml/well 加え, CO<sub>2</sub> incubator 中で 4 日間培養した.

## 12. hDFC のラット頭頂骨上への移植

生体内における hDFC の骨形成効果を検討するため、動物を用いた移植実験を行った。実験動物は、生後 9 週齢 F344/NJcl-rnu/rnu 雄性ラット (215 ± 15 g, 日本クレア株式会社) 計 6 匹を用いた。GM 群 (GM で 3 次元培養した hDFC を移植した群) と OIM DEX (-) 群 (OIM DEX (-) で 3 次元培養した hDFC を移植した群) の 2 群 (各群 3 匹) に分けた。

全ての工程は、ペントバルビタールナトリウム (25 mg/kg) を腹腔内投与し、全身麻酔下で施行した。GM 群および OIM DEX (-) 群は頭頂部を剃毛し、頭蓋骨側縁に沿って皮膚切開を行い、皮下組織は解剖鋏を用いて剥離・拳上した。上皮・皮下組織および骨膜を拳上し、頭蓋骨面と骨膜の間にスキャフォールドが内部に挿入された PTFE チューブを埋入し、閉鎖した。チューブの内径は 3.0 mm, 外径 4.0 mm, 高さ 2.0 mm とし、埋入前に 121°C で 20 分間の高圧蒸気滅菌を行った。埋入後、骨膜をナイロン糸で縫合し、続いて創部皮膚を縫合閉鎖した。観察期間は、各群いずれも 28 日間とした。本実験は日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認に従って行った (承認番号: AP10-MD001)。

## 13. 組織学的観察

ラットの安楽死は、各群とも移植時同様に全身麻酔を行った後、心臓よりヘパリン含有生理食塩水を灌流、脱血させた後、10%中性ホルマリン水溶液を用いて灌流固定を行い、PTFE チューブを含む頭蓋骨を一塊に摘出した。10%中性ホルマリン水溶液に 3 日間室温下で浸漬した後、10% EDTA で 2 週間脱灰し、矢状断に割断、パラフィン包埋を行い、厚さ 4.0 μm で薄切した。切片は通法に従い H-E 染色を施し観察した。

#### 14. Micro-CT による解析

頭頂骨上の hDFC 埋入部を Micro-CT (R-mCT<sup>®</sup>, Rigaku Corporation) を用いて撮影した。撮影条件は、管電圧 90 kv, 管電流 88  $\mu$ A, 撮影倍率 10 倍, 撮影時間 17 秒で 360 度回転し撮影した。撮影は移植後 4 週目で行った。画像のボクセル解像度は  $20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}$  で、三次元骨梁構造計測ソフト TRI/3D-Bon (Ratoc System engineering) を用いて処理し、骨の微細構造を観察した。チューブ内部の新生骨体積 (TV,  $\text{cm}^3$ ), 骨量 (BV,  $\text{cm}^3$ ) および骨塩量 (BMC, mg) を計算した。骨梁体積率 (BV/TV, %) と骨密度 (BMD,  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) は BV, TV, BMC から算出した。

#### 15. 免疫組織化学的観察

全群の頭頂骨切片に対して免疫組織化学染色を行った。1 次抗体は、マウス monoclonal 抗 BMP-2 抗体 (65529.111; 1:500; Abcam), ラビット polyclonal 抗 RUNX2 抗体 (1:500; Abcam), ラビット polyclonal 抗 Osterix 抗体 (1:500; Abcam) およびラビット polyclonal 抗 VEGF-A20 (1:50; Santa Cruz) を用いた。各切片は、脱パラフィン後、10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を用い、温浴法で  $95^\circ\text{C}$ , 40 分間加熱処理し賦活化させ、室温下で 12 時間反応させた。1 次抗体反応後、内因性ペルオキシダーゼ反応防止のため、3% 過酸化水素エタノールに室温下に 15 分間反応させた。PBS で洗浄後、2 次抗体として、ChemMate ENVISION kit / HRP (DAB) (Dako) を使用し、プロトコールに従って処理した。さらに、PBS で洗浄し、DAB (Merck) にて発色後、マイヤーヘマトキシリン水溶液で対比染色を行い、観察した。各抗原に対する Positive control として、正常な骨の組織切片を、Negative control として、1 次抗体を用いずに 2 次抗体を作用させた。

## 16. 統計的解析

統計解析は、 $t$ -検定を用いて行った。

## 結 果

### 1. hDFC の石灰化過程に関与する microRNA の検索

#### 1) microRNA microarray 解析

microarray 解析を用いて、hDFC の石灰化過程で発現変動する microRNA を検索した。測定した 961 microRNA 中、hDFC で発現が認められたのは 307 microRNA であった。培養 0 日目の hDFC と OIM DEX (+) で 7 日間培養した hDFC 間で比較したところ、2 倍以上発現変動したのは 80 microRNA であった。そのうち、OIM で 7 日間培養によって 2 倍以上発現が上昇した microRNA は 42 microRNA で、1/2 以下に発現が減少した microRNA は 38 microRNA であった (図 1)。

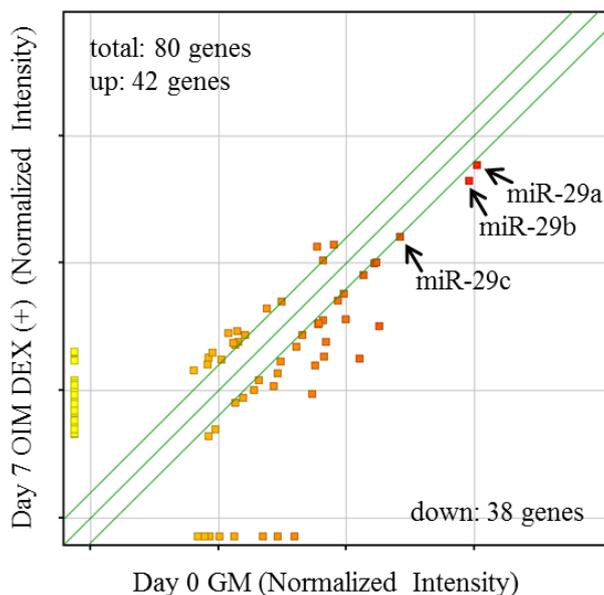


図 1. microRNA microarray 解析結果

培養 0 日目の hDFC と OIM DEX (+) で培養した 7 日目の hDFC 間で microRNA microarray 解析を行った。

2 倍以上発現変動した microRNA の Scatter plot.

## 2) microRNA-29 family の発現

通常, microRNA は相補性を有する mRNA からの翻訳を負に制御されている. そのため, hDFC を OIM DEX (+) で培養した時に, 骨形成や石灰化に関与する mRNA を標的とする miRNA は発現が減少すると考えた. microarray 解析の結果から, 培養 0 日目で発現が高く, OIM DEX (+) での培養 7 日目で 1/2 以下に発現が減少した microRNA 群に, miR-29a, miR-29b, miR-29c が認められた(図 1). 次に, miR-29 family の経時的な遺伝子発現を real-time RCR 法を用いて調べた. miR-29 family はいずれも, 培養 1, 2, 4, 7, 11 日目において GM で培養した時と比較して, OIM DEX (+) で培養した時に減少していた (図 2).

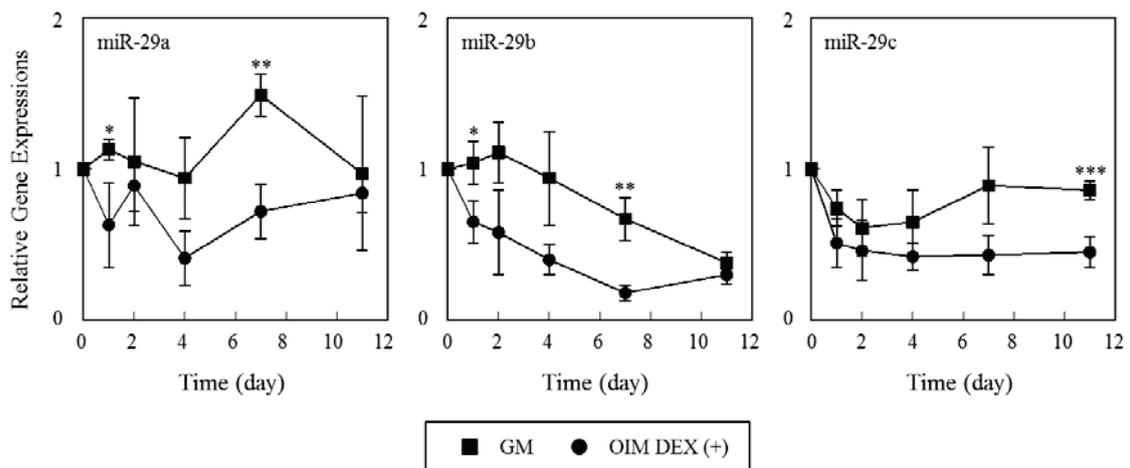


図 2. hDFC の石灰化過程における miR-29 family の遺伝子発現

hDFC を GM または OIM DEX (+) でそれぞれ 1, 2, 4, 7, 11 日間培養した時の miR-29 family の経時的遺伝子発現.

(n = 3, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ )

### 3) I型コラーゲンのタンパク産生における miR-29 family の影響

miR-29 family の標的遺伝子の検索を、TargetScan, TarBase, miRecords を用いて行った。その結果、標的遺伝子群中に $\alpha 1$  type I collagen および $\alpha 2$  が認められた。I型コラーゲンは、主に骨をはじめとした石灰化組織の主要な細胞外基質である。そこで、hDFC に miR-29a, -29b, -29c mimic を遺伝子導入し、培養上清中の I 型プロコラーゲンおよび I 型トロポコラーゲン量を測定した。その結果、Negative control と比較して、miR-29 family を遺伝子導入した hDFC 培養上清中のコラーゲン量は低下した (図 3)。

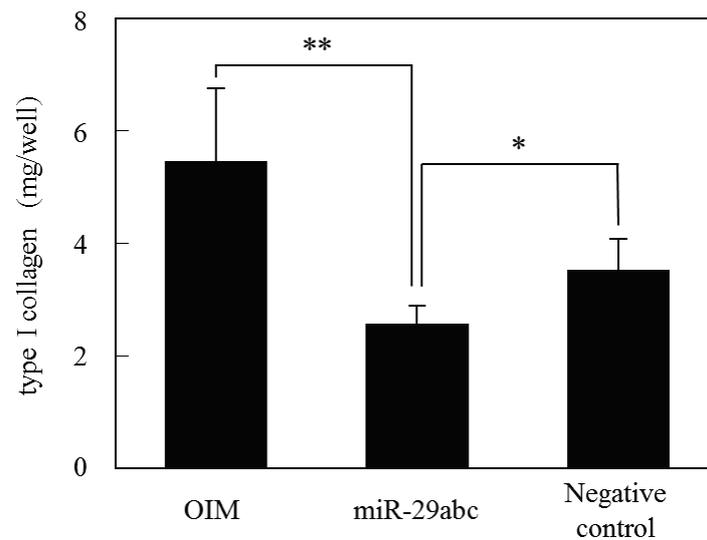


図 3. type I collagen のタンパク産生における miR-29 family の影響

hDFC に miR-29 family (miR-29a, -29b, -29c) mimic を遺伝子導入した時の I 型コラーゲンのタンパク質産生量。

(n = 3, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )

#### 4) 石灰化における miR-29 family の影響

hDFC に miR-29 family を遺伝子導入した時の石灰化への影響を Alizarin red S 染色を用いて調べた。培養 14 日目の遺伝子導入をしていない OIM 群, Negative control 群は, いずれも染色陽性であったが, miR-29 family 導入群は染色陰性であった。培養 18 日目では, miR-29 family 導入群でも染色陽性所見を認めたが, OIM 群, Negative control 群と比較すると染色が弱いことが確認された。また, GM での培養では, 遺伝子導入の有無に関わらず染色は認めなかった (図 4)。

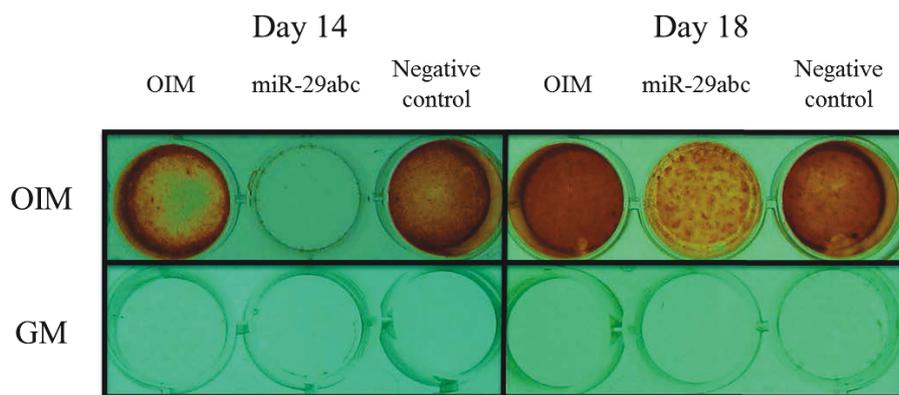


図 4. hDFC の石灰化における miR-29 family の影響

hDFC に miR-29 family (miR-29a, -29b, -29c) mimic を遺伝子導入した時の石灰化能を, 培養 14 日目および 18 日目に Alizarin red S 染色で評価した。

次に, miR-29 family 間における石灰化抑制効果の比較を行った. miR-29a, -29b, -29c mimic を 3 人のドナーから得られたそれぞれの hDFC および hMSC に遺伝子導入し, 培養 15 日目に Alizarin red S 染色で評価を行った. miR-29 family のうち, 最も石灰化抑制効果を示したのは, miR-29b であった (図 5).

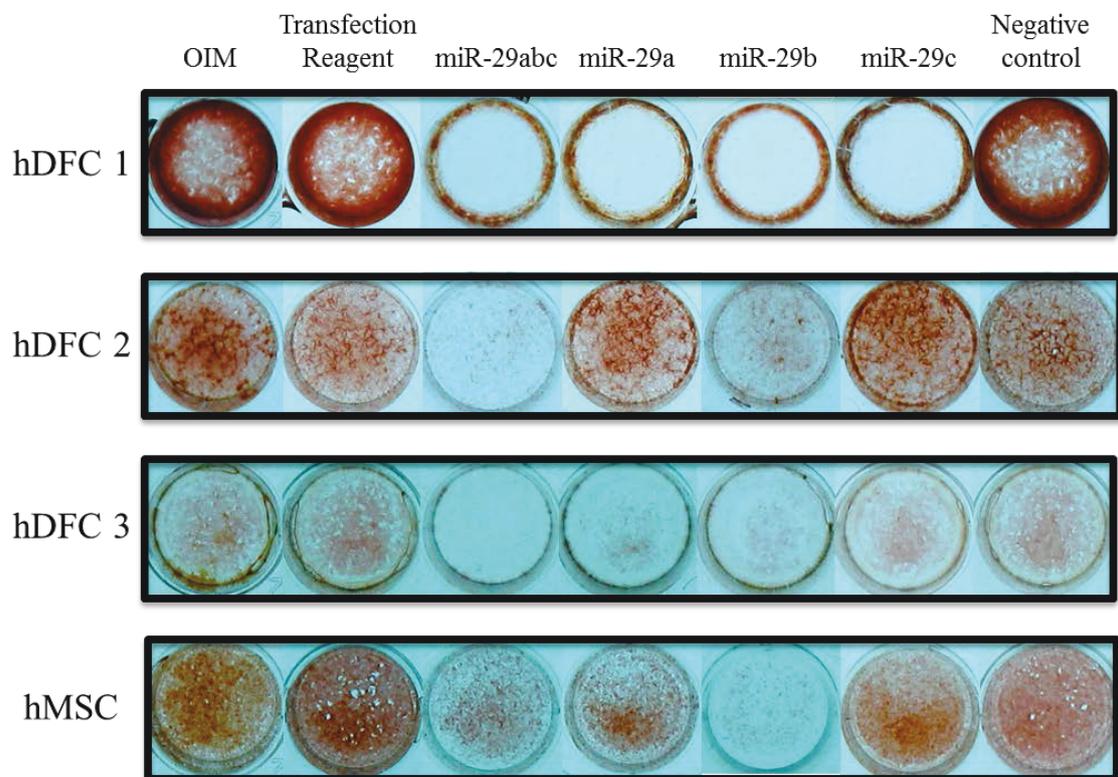


図 5. miR-29 family 間における石灰化抑制効果の比較  
3 人のドナーから得られたそれぞれの hDFC または hMSC に miR-29a, -29b, -29c mimic を遺伝子導入した時の石灰化能を培養 15 日目に Alizarin red S 染色で評価した.

## 2. Dexamethasone 非添加培養 hDFC の生体内における新生骨形成能

### 1) 組織学的所見

スキャフォールドを用いて三次元培養した hDFC を PTFE チューブに挿入し、頭頂骨上に移植した。移植後 4 週目、両群ともに新生骨を認めるが、OIM DEX (-) 群は、GM 群と比較して、スキャフォールド内により多くの新生骨形成を認めた。また、新生骨周囲の結合組織には拡張した毛細血管や多数の紡錘形の細胞を認めた。さらに、新生骨周囲辺縁には骨芽細胞の配列が観察された (図 6)。

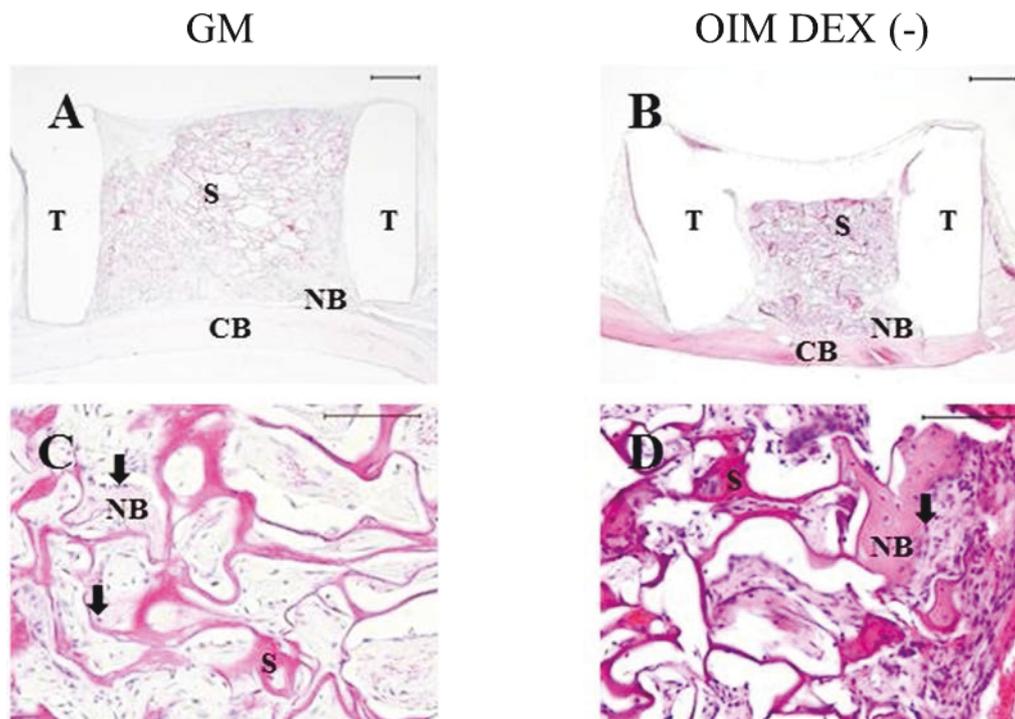


図 6. DEX 非添加培養 hDFC 移植後の組織像

移植後 4 週目の組織像。A, B:  $\times 40$ , Bars = 500  $\mu\text{m}$ , C, D:  $\times 200$ , Bars = 100  $\mu\text{m}$ .

NB: new bone, CB: calvaria bone, S: scaffold, T: tube, black arrows: osteoblast.

## 2) Micro-CT による解析

Micro-CT 画像分析から BMD 値を疑似カラー3D 画像表示した. 両群ともに頭頂骨側からの新生骨形成を認めた. PTFE チューブ内部において, GM 群で少量の新生骨形成を認めたが, OIM DEX (-) 群では GM 群と比較して, より多くの新生骨形成を認めた (図 7 A). 骨梁構造計測において OIM DEX (-) 群は GM 群と比較して, BMD, BMC および BV など全てにおいて高値を示した (図 7 B).

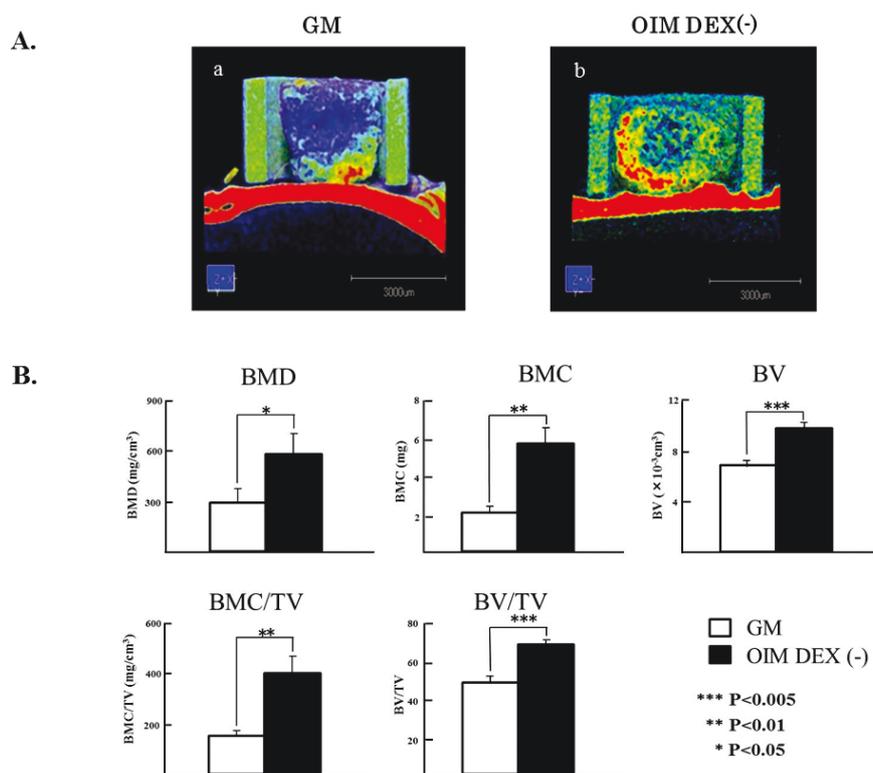


図 7. Micro-CT による解析結果

A. 移植後 4 週目の Micro-CT 画像分析から表示された BMD 疑似カラー 3D 画像. a: GM, b: OIM DEX (-).

B. 移植後 4 週目の骨梁構造計測結果.

BMD: bone mineral density, BMC: bone mineral content, BV: bone volume, BMC/TV: BMC/total volume. (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ )

### 3) 免疫組織化学的所見

免疫組織化学的染色において, BMP-2, RUNX2 および Osterix は両群ともに, 結合組織内の新生骨周囲に配列した骨芽細胞で陽性反応が観察された. 両群ともに VEGF は血管内皮細胞および新生骨の辺縁に配列した骨芽細胞において観察された(図 8).

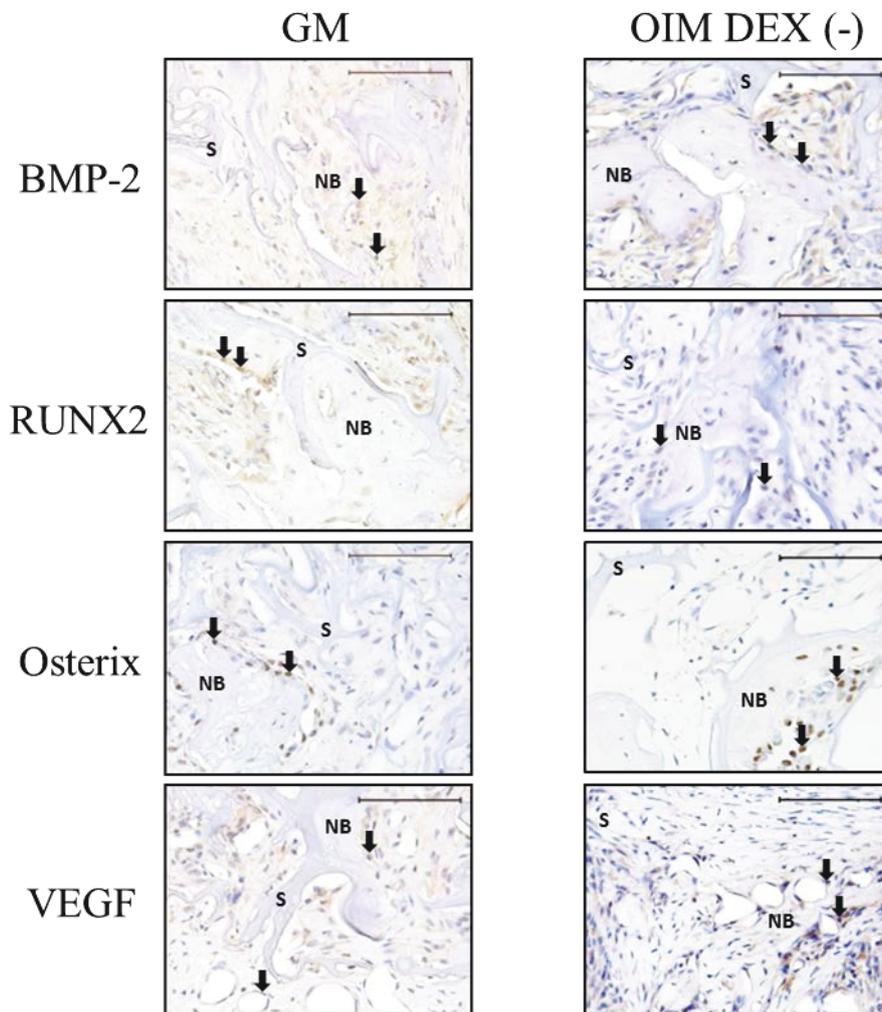


図 8. 免疫組織化学染色像

移植後 4 週目の BMP-2, RUNX2, Osterix, VEGF の免疫組織化学染色像.

× 400, Bars = 100 μm. NB: new bone, S: scaffold, black arrows: indicate to positive reactions.

## 考 察

現在、ヒトの microRNA は 1,000 種類以上同定されており、タンパク質をコードする遺伝子の約 3 割以上の発現を制御しているといわれている。骨芽細胞分化過程で発現変動する microRNA についても報告されるようになり、骨芽細胞分化に必須の転写因子である RUNX2 や Osterix を標的とする microRNA が報告されている<sup>12,13)</sup>。

本研究では、hDFC の石灰化機序解明の一端として、microRNA microarray 解析を用いて石灰化過程で発現変動する microRNA の検索を行った。培養 0 日目の hDFC と比較して、OIM で培養した 7 日目の hDFC で、miR-29 family の発現が減少を認めた。また、real-time RT-PCR 法を用いて miR-29 family の遺伝子発現を調べたところ、GM での培養に比べ、OIM で培養した hDFC で発現が減少していることが確認された。最近では、microRNA の標的遺伝子についての研究だけでなく、microRNA の発現を制御する因子についても研究されるようになり、TGF- $\beta$ によって miR-29 発現が抑制されることが報告されている<sup>16,17)</sup>。当教室では、hDFC を OIM で培養すると、培養初期において TGF- $\beta$  の発現が上昇することを報告している<sup>5)</sup>。このことから、hDFC を OIM で培養した時の miR-29 family の発現減少は、TGF- $\beta$ の発現上昇による可能性が示唆された。

次に、miR-29 family がどのような遺伝子を標的にしているのか、microRNA データベースを用いて調べた。その結果、標的遺伝子群中に $\alpha$ 1 type I collagen (col1a1) および $\alpha$ 2 type I collagen (col1a2) が認められた。そこで、miR-29 family が I 型コラーゲン産生に影響を及ぼすかを調べた。hDFC に miR-29 family を遺伝子導入し、培養上清中の I 型プロコラーゲンおよび I 型トロポコラーゲン量を調べたところ、miR-29 family 導入群でこれらコラーゲン量の減少が認められた。NIH3T3 細胞に miR-29b を遺伝子導入すると I 型コラーゲンの発現が減少

すること<sup>18)</sup>。ヒト肝星状細胞では, *coll1a1* の 3'-UTR 領域に miR-29b が結合し, I型コラーゲンタンパク質産生を抑制するとの報告もある<sup>19)</sup>。また, 肝臓の線維化病変部では miR-29 発現が減少していること, 心筋梗塞を発症した隣接部でも miR-29 発現が減少していることが報告されている<sup>19, 20)</sup>。これらの報告から, miR-29 family は *coll1a1* の 3'-UTR 領域に結合して I 型コラーゲンの翻訳を制御することにより, 細胞外基質の形成に深く関わっていることが示唆された。

次に, miR-29 family が hDFC の石灰化にどのような影響を及ぼすのか, Alizarin red S 染色を用いて調べた。miR-29 family を hDFC に遺伝子導入すると, Negative control を遺伝子導入した群と比較して, 石灰化が抑制された。また, miR-29a, -29b, -29c をそれぞれ遺伝子導入すると, miR-29b が最も強い石灰化抑制効果を示した。現在のところ, miR-29a, -29b, -29c 間での作用の違いについての報告はなく, 詳細は不明である。しかし, miR-29a, -29b, -29c の seed 領域は同じであるため, seed 領域以外の塩基配列の違いが関連している可能性がある。一方, MC3T3-E1 細胞を用いた研究では, 骨芽細胞の分化過程で miR-29b の発現が上昇すること, miR-29b を遺伝子導入すると石灰化が促進することが報告されている<sup>21)</sup>。この結果は, miR-29 は骨芽細胞分化過程において, TGF- $\beta$ 3 や histon deacetylase 4 などの骨芽細胞分化抑制因子を標的にするためと考察されている<sup>21)</sup>。また, 骨芽細胞分化過程後期に miR-29 は発現上昇し, osteonectin 産生を抑制すること<sup>22)</sup>, 正常な骨基質を形成する骨芽細胞分化過程で miR-29 は発現上昇して I 型コラーゲン産生を抑制するという報告もある<sup>23)</sup>。今後, 骨芽細胞分化への miR-29 family の影響については, 細胞の種類や骨芽細胞への分化ステージなどを考慮しての詳細な研究が必要と考える。

次に, hDFC の骨再生医療応用への可能性を検討することを目的に, OIM DEX (-)で培養し

た hDFC をラット頭頂骨上へ移植した。通常 DEX は、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化誘導する場合、培地中へ添加する<sup>14)</sup>。しかし、DEX は、I型コラーゲンの発現を低下させ骨基質形成を抑制することが報告され<sup>24)</sup>、また臨床における DEX の長期投与による副作用として、骨粗鬆症発症増加のリスクが報告されている<sup>25)</sup>。DEX は骨芽細胞の増殖抑制や、アポトーシスの誘導、破骨細胞数を増加させることで骨吸収を促進するとされている<sup>26, 27)</sup>。そのため、骨再生医療において DEX の使用は避けることが望ましいと考えられる。しかしながら hDFC は、*in vitro* において、OIM DEX (-)で培養しても石灰化することが確認されている<sup>15)</sup>。前骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞は、DEX を含まない OIM で培養しても骨芽細胞へ分化すると報告されていることから<sup>28)</sup>、hDFC には、未分化間葉系幹細胞のみならず、前骨芽細胞様細胞も存在する可能性が示唆される<sup>15)</sup>。

本研究では、OIM DEX (-)で培養した hDFC をラット頭頂骨上に移植し、組織学的検討を行った。その結果、hDFC 移植後 4 週目に、新生骨の形成を認め、新生骨辺縁では骨芽細胞の配列および新生骨周囲組織には、拡張した毛細血管が観察された。

次に、Micro-CT による骨量構造計測を行った。OIM DEX (-) で培養した hDFC を移植した群は、GM で培養した hDFC を移植した群と比較して、BMC、BMD、BV、BMC/TV および BV/TV で高値を示した。臨床的に骨粗鬆症患者の健康状態を評価する基準として知られている BMD は hDFC 群で高値を示し<sup>29)</sup>、BV も高値を示した。これらから OIM DEX (-) で培養した hDFC を移植すると、骨量が多く、より成熟した新生骨が形成されることが示唆された。

免疫組織化学的観察では、BMP2、RUNX2 および Osterix は新生骨辺縁に存在する細胞に陽性所見を認めた。BMP2 は未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を促進する<sup>30)</sup>。RUNX2 と Osterix は前骨芽細胞の分化において、必須の転写因子として知られている<sup>31-33)</sup>。また、

RUNX2 または Osterix ノックアウトマウスでは、成熟した骨芽細胞が認められないことから、これらの転写因子は骨形成において中心的な役割を担っていると報告されている<sup>33-35)</sup>。よって新生骨辺縁に存在する細胞は骨芽細胞と示唆された。VEGF は骨芽細胞および血管内皮細胞に陽性所見を認めた。VEGF は血管新生を促進することで、骨形成および骨修復に関与すること<sup>36)</sup>、内因性 VEGF の作用を遮断すると骨形成を阻害することが報告されている<sup>37)</sup>。また、当教室では、*in vitro* において、OIM DEX (-) で培養した hDFC は、GM で培養した hDFC と比較して、VEGF の遺伝子発現およびタンパク質産生が上昇することを確認している (data not shown)。これらのことから hDFC は OIM DEX (-) で培養すると、骨芽細胞分化を促進し、新生骨を形成する可能性が示唆された。

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。

## 結論

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、骨再生医療応用への可能性を検討した。

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  $\alpha 1$  type I collagen 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、石灰化が抑制され、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。

本論文は、参考文献1 「MicroRNA-29 Family Suppresses Mineralization in Dental Follicle Cells」  
Journal of Hard Tissue Biology [掲載予定] および参考文献2 「Applicability of human dental  
follicle cells to bone regeneration without dexamethasone: an in vivo pilot study」 International  
journal of Oral & Maxillofacial Surgery [掲載予定] をまとめたものである。

## 引用文献

- 1) Liechty KW, MacKenzie TC, *et al.* Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med.* 6: 1282-1286, 2000.
- 2) Pittenger MF, Mackay AM, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284: 143-147, 1999.
- 3) Morsczeck C, Götz W, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 24: 155-165, 2005.
- 4) Yao S, Pan F, *et al.* Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res.* 87: 767-771, 2008.
- 5) Aonuma H, Ogura N, *et al.* Characteristics and osteogenic differentiation of stem/progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling. *Cell Tissue Res.* 350: 317-331, 2012.
- 6) Tamaki Y, Nakahara T, *et al.* In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. *Odontology.* 101: 121-132, 2013.
- 7) Lewis BP, Shih IH, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 115: 787-798, 2003.
- 8) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116: 281-297, 2004.
- 9) Gao J, Yang T, *et al.* MicroRNA expression during osteogenic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells from bone marrow. *J Cell Biochem.* 112: 1844-1856, 2011.
- 10) Png KJ, Halberg N, *et al.* A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature.* 481: 190-194, 2012.
- 11) Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell.* 149: 515-524, 2012.
- 12) Zhang Y, Xie RL, *et al.* A program of microRNAs controls osteogenic lineage progression by targeting transcription factor Runx2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108: 9863-9868, 2011.

- 13) Huang J, Zhao L, *et al.* MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells*. 28: 357-364, 2010.
- 14) Khanna-Jain R, Agata H, *et al.* Addition of BMP-2 or BMP-6 to dexamethasone, ascorbic acid, and  $\beta$ -glycerophosphate may not enhance osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Growth Factors*. 28: 437-446, 2010
- 15) Takahashi K, Ogura N, *et al.* Bone morphogenetic protein 6 stimulates mineralization in human dental follicle cells without dexamethasone. *Arch Oral Biol*. 58: 690-698, 2013.
- 16) Wang B, Komers R, *et al.* Suppression of microRNA-29 expression by TGF- $\beta$ 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 23: 252-265, 2012.
- 17) Roderburg C, Urban GW, *et al.* Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*. 53: 209-218, 2011.
- 18) Montgomery RL, Yu G, *et al.* MicroRNA mimicry blocks pulmonary fibrosis. *EMBO Mol Med*. 6: 1347-1356, 2014.
- 19) Ogawa T, Iizuka M, *et al.* Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 391: 316-321, 2010.
- 20) van Rooij E, Sutherland LB, *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 13027-13032, 2008.
- 21) Li Z, Hassan MQ, *et al.* Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem*. 284: 15676-15684, 2009.
- 22) Kapinas K, Kessler CB, *et al.* miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling. *J Cell Biochem*. 108: 216-224, 2009.
- 23) Roberto VP, Tiago DM, *et al.* MiR-29a is an enhancer of mineral deposition in bone-derived systems. *Arch Biochem Biophys*. 564: 173-183, 2014.
- 24) Porter RM, Huckle WR, *et al.* Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem*. 90:13-22, 2003.
- 25) McIlwain HH. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Prev Med*. 36:243-249, 2003.

- 26) Wang FS, Ko JY, *et al.* Modulation of Dickkopf-1 attenuates glucocorticoid induction of osteoblast apoptosis, adipocytic differentiation, and bone mass loss. *Endocrinology*. 149: 1793-1801, 2008.
- 27) Smith E, Frenkel B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -dependent and -independent manner. *J Biol Chem*. 280: 2388-2394, 2005.
- 28) Sudo H, Kodama HA, *et al.* In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol*. 96: 191-198, 1983.
- 29) Burghardt AJ, Link TM, *et al.* High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clin Orthop Relat Res*. 469: 2179-2193, 2011.
- 30) Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 83-A Suppl 1 (Pt 1): S1-6, 2001.
- 31) Ryoo HM, Hoffmann HM, *et al.* Stage-specific expression of Dlx-5 during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol Endocrinol*. 11: 1681-1694, 1997.
- 32) Shirakabe K, Terasawa K, *et al.* Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells*. 6: 851-856, 2001.
- 33) Nakashima K, Zhou X, *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 108: 17-29, 2002.
- 34) Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem*. 112: 750-755, 2011.
- 35) Yoshida CA, Komori H, *et al.* SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PLoS One*. 7: e32364, 2012.
- 36) Street J, Bao M, *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 9656-9661, 2002.
- 37) Gerber HP, Vu TH, *et al.* VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 5: 623-628, 1999.