

論文審査の結果の要旨

氏名：栗田 隆史

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Crosstalk between microRNA-21-5p and the transcription factor Dec1 maintains osteoblast function
(マイクロ RNA-21-5p と転写因子 Dec1 間の相互作用は骨芽細胞機能を維持する)

審査委員：(主査) 教授 泉福 英信

(副査) 教授 岡田 裕之

教授 金田 隆

骨形成において極めて重要なマイクロ RNA (miRNA) は転写後遺伝子調節に関連している。miRNA は mRNA の 3'非翻訳領域をターゲットとし、骨格生物学において転写後レベルで遺伝子発現を調節する。これまでの研究で、骨のリモデリングと骨芽細胞形成の調節における miRNA の関与が明確に示されており、主要な miRNA の中で多面的な miRNA として認識されている microRNA-21-5p (miR-21-5p) は、低酸素症や酸化ストレスなどの多様な生理学および病理学的機能の調節に関与している。また、miR-21-5p は、認知機能低下の改善に大きな役割を果たす。

以前の研究では、miR-21-5p の欠失により、Bone marrow stromal cells (BMSCs) におけるラント関連転写因子 2 (Runx2) の発現減少および、骨芽細胞の分化が減少した。骨芽細胞形成における miR-21-5p の作用は、主に細胞レベルで研究されており、miR-21-5pKO マウスの創傷治癒の遅延を報告し、それらのマウスで頭蓋冠形成の障害を示した。miR-21-5p は現在、多くの生理学のプロセスにおける様々な調節のために、最も広く研究されている miRNA の 1 つと考えられる。miRNA と転写因子間の相互作用は、細胞の恒常性を維持するための種々の生物学のプロセスを引き起こす可能性がある。いくつかの報告では、細胞の再生と維持に関与する遺伝子発現の転写後調節による幹細胞の分化において miRNA の増進が明らかにされており、Runx2 と Osterix という 2 つの骨の特異的転写因子が骨芽細胞の分化を制御し、miRNA が Runx2 mRNA の発現を制御している。また、miRNA が骨形成分化と骨形成を促進できるという報告が増えている。バイオインフォマティクスに基づく予測方法により、PIK3R1 が miR-21-5p の直接のターゲット遺伝子として確立され、最近 KLF3 も miR-21-5p の別のターゲットとして特定された。塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス (bHLH) 転写因子の軟骨分化誘導遺伝子 1 (Dec1) は、骨形成や骨のリモデリングなどの複数の細胞プロセスを制御している。Dec1 の過剰発現は NIH3T3 細胞増殖を抑制し、細胞増殖停止を引き起こした。また、Dec1 の過剰発現は、マウス 3T3-L1 細胞の脂肪生成分化も抑制した。転写因子は miRNA の量を調節するため、骨芽細胞の分化と骨芽細胞の機能における転写因子 Dec1 の応用は、潜在的に miR-21-5p の発現を調節することにより、機能的効果をもたらす可能性があるという仮説を立てた。

本研究では、骨芽細胞機能における miR-21-5p と Dec1 の特徴的な役割を調査し、それらの生物学的功能の解明を目的とした。MC3T3-E1 前骨芽細胞を *in vitro* 解析に用い、miR-21-5pKO マウス、Dec1KO マウス、同じ週齢の野生型 (WT) マウスを使用して、骨形成における miR-21-5p および Dec1 欠損の影響を考察した。形態学的解析 [マイクロコンピュータ断層撮影(マイクロ CT)] により、測定値を集積し miR-21-5pKO マウスを検証した。マウス大腿骨組織の病理組織学的変化は、H-E 染色、アザン染色、マッソントリクローム染色、およびトルイジンブルー染色により評価した。定量的リアルタイム RT-PCR、ウェ

スタンプロッチング，および免疫組織化学染色により，アルカリホスファターゼ，Runx2，Osterix，Osteopontin，Dec1，および miR-21-5p の発現レベルを解析した。Dec1 が miR-21-5p のターゲットであることを確認するためにバイオインフォマティクス分析とデュアル-ルシフェラーゼ-レポーター-アッセイを行った。

Dec1 の発現は，骨芽細胞誘導の7日目から徐々に増加し，miR-21-5p は21日目にピークを示した。非誘導骨芽細胞では，miR-21-5p 模倣体は Runx2 と Osterix の発現を強化したが，Dec1 は抑制された。miR-21-5pKO マウスでは骨の成長が低下していた。Dec1KO マウスは，WT マウスと比較して12週齢で高度な骨形成を示した。Dec1KO マウス大腿骨で，Runx2 および Osterix 発現を上方制御した。しかし，これらの変化は，WT マウスの大腿骨と比較して，miR-21-5pKO マウスの大腿骨では逆転していた。デュアル-ルシフェラーゼ-レポーター-アッセイは，Dec1 が miR-21-5p の下流のターゲットである可能性を示した。これらの結果は，miR-21-5p 欠乏による骨形成能の低下が Dec1 発現の増強によって達成され，miR-21-5p/Dec1 軸が骨芽細胞機能の調節に関与していることを示している。更には，miR-21-5p と Dec1 が骨芽細胞の調整軸を構成するという仮説につながるが，その軸の障害は，多動性に関与するメカニズムである可能性がある。

また，本研究にはいくつかの限界がある。まず，本来はできるだけ多くの時点を含める計画だったが，今回の研究では3つの時点のみ調査を行った。ただし，一貫性のない矛盾した結果を最小限に抑えるため，この研究では前骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞を骨芽細胞の分化に使用した。第二に，適切な検体を入手するのが困難であり，若いマウス (12 週齢) の大腿骨標本のみが動物実験で使用されたため，老齢マウスの大腿骨における miR-21-5p および Dec1 発現のレベルを評価する必要がある。第三に，本研究では若い雄性のマウスが使用されたが，雌性のものが異なる反応を示した場合，様々な結果が観察された可能性があるため，miR-21-5p の包括的な機能を明らかにするには，追加の研究が必要となる。

結論として本研究は，miR-21-5p の強力なターゲットとして Dec1 を認め，実験的に確立した。さらに，*in vivo* での miR-21-5pKO マウスでは，miR-21-5p 欠乏により骨小柱数，骨体積/組織体積が減少し，骨芽細胞の恒常性が弱まり，Dec1 の機能における miR-21-5p の機能的関与が示唆された。本研究結果は，骨形成における miR-21-5p 機能に関する以前の知識を拡張し，骨形成を調節することが可能であることを示唆した。

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

4 年 1 2 月 1 5 日