

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	吉塚 将昭
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目 Inhibition of microRNA-222 expression accelerates bone healing with enhancement of osteogenesis, chondrogenesis, and angiogenesis in a rat refractory fracture model (microRNA-222の発現抑制は骨分化、軟骨分化、血管新生作用でラット大腿骨難治性骨折モデルにおいて骨形成を促進する)			
論文審査担当者			
主査	教授	酒井 規雄	印
審査委員	教授	本田 浩章	
審査委員	准教授	大上 直秀	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>骨折の多くは骨癒合することが多いが、治癒遅延や偽関節となり治療に難渋することがある。治療として自家骨移植が一般的に行われているが、採骨部への侵襲、感染などの合併症が問題になることがある。non-coding RNAであるmicroRNA(miRNA)は、様々な疾患の病態に関与し、miRNAを利用した治療の試みも行われている。microRNAを骨折難治性モデルへ投与しその再生を試みた報告はない。我々は骨折治癒に重要とされる骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の骨芽細胞分化に関与するmiRNAを同定し、発現を制御することでMSCの骨芽細胞分化への影響を検討した。さらに同定したmiRNAをラット大腿骨難治性骨折モデルにおいて制御し骨形成が促進されるか、骨折治癒に重要とされる軟骨細胞分化、血管新生への影響も検討した。</p> <p>骨芽細胞への分化に関連するmicroRNAを同定するために、MSCと骨芽細胞誘導培地を用いて骨芽細胞に分化誘導後14日目のMSCにおいて、miRNAの発現をマイクロアレイで網羅的に解析した。このうち、分化後に発現が大きく低下したmiRNA-222に注目し、MSCの骨芽細胞分化への影響を検討した。MSCにmiRNA-222 inhibitorとmiRNA-222 mimicsを遺伝子導入し、骨芽細胞分化誘導後5日目のRUNX2、Colla1、10日目のOsteocalcinのmRNAの発現量をPCRで定量し、非機能性miRNAを遺伝子導入したコントロール群と比較した。骨芽細胞分化誘導後10日目のアルカリホスファターゼ(ALP)活性、14日目のアリザリンレッド染色の比較検討も行った。また、MSCの軟骨分化への影響も検討した。MSCにmiRNA-222 inhibitorとmiRNA-222 mimicsを遺伝子導入し、軟骨細胞分化誘導後14日目のCOL2A1、Aggrecan、SOX9のmRNAの発現量をPCRで定量し、非機能性miRNAを遺伝子導入したコントロール群と比較した。さらにmiRNA-222 inhibitor、miRNA-222 mimics、非機能性miRNAをアテロコラーゲンゲルに溶解し、ラット大腿骨難治性骨折モデルの骨折部に局所投与し骨形成を3群間で比較した。miRNA-222の血管新生へ影響は、投与後2週で骨折部の組織切片を作成し、isolectinB4の免疫染色を行い単位面積当たりの血管数で評価した。骨形成は、投与後2、4、6、8週でXP撮影を行い骨癒合の進行度を評価し、投与後8週でmicro-CTを用いて骨癒合完成の有無の評価と投与後8週でtoluidine blue染色を用いた組織学的評価を行った。</p> <p>骨芽細胞分化誘導後のMSCではmiRNA-222を抑制すると、コントロール群に比べ有意に骨形成マーカーの発現は上昇し、アリザリンレッド染色の染色性やALPの活性が上昇し</p>			

た。逆に miRNA-222 の発現を上昇させると、骨形成マーカーの発現、アリザリンレッド染色の染色性、ALP の活性は低下した。これにより miR-222 inhibitor は MSC の骨芽細胞分化を促進、miR-222 mimics は抑制することが示唆された。軟骨細胞分化誘導後の MSC では miR-222 を抑制すると、コントロール群に比べ有意に軟骨形成マーカーの発現は上昇した。一方 miRNA-222 の発現を上昇させても軟骨形成マーカーの発現の低下は認めなかった。これにより miR-222 inhibitor は MSC の軟骨細胞分化を促進することが示唆された。またラット大腿骨難治性骨折モデルの骨折部に miRNA-222 inhibitor を投与した群では、2 週後ではコントロール群と比べ有意に単位面積当たりの血管数が増加し、miRNA-222 mimics を投与した群では他の 2 群と比べ有意に血管数が減少していた。投与後、6 週、8 週の XP 評価では、miRNA-222 inhibitor 投与群では、コントロール群と比べ有意に骨癒合は進行し、miRNA-222 mimics 投与群ではコントロール群と比べ有意に骨癒合は遷延していた。投与後 8 週の micro-CT、組織学的評価では miR-222 inhibitor 投与群でのみ骨癒合が確認できた。miR-222 mimics 投与群では、コントロール群とくらべて有意に XP 評価、組織学的評価で骨癒合が遷延していた。これにより miR-222 inhibitor は難治性骨折モデルで骨癒合を促進させ、miR-222 mimics は骨癒合を阻害させることが示唆された。

本研究で、MSC において miRNA-222 の発現を抑制すると、骨芽細胞への分化、軟骨細胞への分化が促進されることが確認された。過去に、血管内皮細胞において miRNA-222 の発現を抑制すると細胞増殖能、細胞遊走能が増加し血管新生が促進されたとの報告がある。ラット大腿骨難治性骨折モデルに miR-222 inhibitor を投与すると、2 週での isolectinB4 を用いた免疫染色による評価ではコントロール群に比べ血管数が増加した。投与後 8 週で骨癒合が確認された。miRNA-222 の抑制は MSC の骨芽細胞分化促進、軟骨細胞分化促進、骨折部での血管新生促進の作用を持ち、骨再生のための新たな治療法となる可能性が示唆された。

本論文は miR-222 は骨折治癒に重要な因子であり、miR-222 inhibitor でその発現を抑制すると骨折治癒が促進されることを明らかにした。このことは、臨床における骨折治癒遅延や偽関節に対する新たな治療戦略となる可能性を示しており、整形外科科学領域の発展に資すること大である。よって審査委員会全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。