

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 （ 歯 学 ）	氏名	・ 田 英 里
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・ 2 項該当		
論 文 題 目 歯周組織由来細胞の液性因子による間葉系幹細胞の骨分化制御			
論文審査担当者 主 査 教 授 加 藤 功 一 印 審査委員 教 授 高 田 隆 審査委員 教 授 杉 田 誠			
〔論文審査の要旨〕 歯周組織再生のひとつとして間葉系幹細胞（MSC）移植が行われている。移植された MSC は、移植先において他の細胞の直接接触または間接接触により転写因子、microRNA（miRNA）、サイトカインなどを介して、増殖・分化の制御を受けていると考えられる。液性因子が他の細胞に与える影響についてはいくつか報告されており、歯周組織構成細胞から分泌される液性因子も MSC の分化に影響を与えられとされる。そこで本研究では、歯周組織構成細胞であるヒト歯肉線維芽細胞（HGF）とヒト歯周靭帯細胞（HPL cells）に着目し、HGF および HPL cells から分泌される液性因子がヒト MSC（hMSCs）の骨分化に与える影響について調べることを目的とした。 細胞は腸骨骨髓由来の hMSCs および HGF、HPL cells を用いた。HGF と HPL cells の液性因子の hMSCs に対する作用を調べるために Transwell®を用いて非接触下での共培養を行った。プレート上に hMSCs、Transwell®上に HGF または HPL cells を培養した。hMSCs どうしの共培養をコントロールとした。 まず、骨分化誘導時において HGF あるいは HPL cells との共培養が hMSCs の骨分化に与える影響を確認した。骨分化誘導培地で共培養を行ったのち、hMSCs から RNA を抽出し、骨分化マーカー遺伝子の mRNA 発現を Real-time PCR によって検討したところ、hMSCs との共培養と比較し、hMSCs における Osteocalcin、BMP2、Runx2 の mRNA 発現は減少した。タンパク発現を Western Blotting 法によって調べた結果、HGF およ			

び HPL cells との共培養で Osteocalcin 発現の減少がみられた。さらに、Alizarin red 染色を行ったところ、石灰化の抑制が認められた。これらの結果から、HGF および HPL cells 由来の液性因子は hMSCs の骨分化を抑制することが示唆された。

また、MSC が発現する未分化マーカーとして 9 つの転写因子 (ETV1, ETV5, FOXP1, GATA6, HMGA2, KLF12, PRDM16, SIM2, SOX11) が報告されており、いくつかの miRNA は MSC の分化を制御することが報告されている。そこで、hMSCs は未分化状態において HGF, HPL cells 由来の液性因子により、上記の転写因子や miRNA を介して制御されていると仮定した。まず、hMSCs と HGF あるいは HPL cells との共培養を行い、9 種類の転写因子の mRNA 発現を比較したところ、いくつかの転写因子で発現の変化を認めた。次に、miRNA Array を用いて miRNA 発現レベルを網羅的に解析した。HGF あるいは HPL cells 由来の液性因子によって、hMSCs の骨分化が抑制されていることから、同様の発現傾向を示している miRNA に注目した。hMSCs と HGF あるいは HPL cells との共培養で共通して発現の差が認められた miRNA に着目し、発現が上昇していた miR-101-3p および減少していた miR-299-5p についてさらに検討を加えた。

これらの miRNA が hMSCs における、未分化マーカー転写因子の発現と骨分化に与える影響について検討した。miR-101-3p, miR-299-5p の mimic および inhibitor を hMSCs にトランスフェクションし、通常培養を行ったところ、これらの miRNA はいくつかの未分化マーカー転写因子の mRNA 発現レベルを変化させたが、HGF と HPL cells 由来の液性因子と miRNA との間で相関関係は認められなかった。これは、他の因子あるいは転写後の制御が関与しているためと考えられる。最後に、miR-101-3p および miR-299-5p の mimic および inhibitor を hMSCs にトランスフェクションした後に、その細胞を骨分化誘導培地中で培養した。miR-101-3p を過剰発現させた場合、Osteocalcin の mRNA 発現量が有意に減少し、BMP2 および Runx2 の mRNA 発現量が有意に増加した。また、Alizarin red 染色の結果から、石灰化の抑制されることがわかった。miR-101-3p の機能を抑制した場合、Osteocalcin の mRNA 発現量が有意に上昇した。一方、miR-299-5p の過剰発現は Osteocalcin の mRNA 発現レベルを有意に上昇させ、石灰化を促進した。しかし、miR-299-5p の機能抑制では、骨関連遺伝子の mRNA 発現および石灰化において有意な変化は認められなかった。miR-299-5p の過剰発現は骨分化を促進したが、一般的に miRNA は抑制作用を有するため、miR-299-5p によって抑制された因子が骨分化を促進していると考えられる。miR-101-3p の発現抑制は Osteocalcin の mRNA 発現のみ制御したが、転写から石灰化に至るまでの間に何らかの因子が関係している可能性が考えられる。

以上の結果から、本論文は HGF と HPL cells 由来の液性因子が hMSCs の骨分化を抑制し、それらの液性因子は hMSCs において、miR-101-3p および miR-299-5p を介していくつかの未分化マーカー転写因子の発現および骨分化を制御していることを示唆した。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

