

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	大本 武児
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ① 2 項該当		
論文題目			
<p>Tendon-Specific Dicer Deficient Mice Exhibit Hypoplastic Tendon Through the Downregulation of Tendon-Related Genes and MicroRNAs</p> <p>（腱特異的 Dicer 欠損マウスは、腱関連遺伝子と microRNA の下方制御を介して腱の低形成を呈する）</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	池上 浩司	印
審査委員	教授	神沼 修	
審査委員	講師	小久保 博樹	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>腱は力を伝達する関節運動に重要な線維性結合組織であり、分子生物学的に未知な点が多い。臨床では修復腱の石灰化や癒痕形成が問題になるが、治療法の進歩は乏しい。遺伝子改変マウスの解析より Scleraxis (Scx) や Mohawk (Mkx) といった腱の発達・成熟に重要な転写因子や、Tenomodulin (Tnmd) などの腱特異的な細胞外マトリックス (ECM) が明らかになってきたが、腱細胞の分化や修復の詳細な分子機構の理解は不十分である。microRNA (miRNA) は標的遺伝子の発現を負に制御し、発生や細胞・組織恒常性の維持に関与する一方、その発現異常はがんを含む様々な疾患の原因になると考えられている。miRNA の生成に関与する RNA プロセッシング酵素 Dicer の欠損マウスは、それに起因する miRNA 生成・機能の不全から胎生致死となる。これまで、腱における Dicer-miRNAs の役割や腱特異的な miRNA は不明であった。本論文は、腱における Dicer-miRNAs の役割を明らかにし、腱特異的な miRNA を同定することを目的とした研究に関するものである。本研究では、腱特異的な転写因子 Scx の発現制御領域下に Cre リコンビナーゼをノックイン (KI) した Scx:CreKI マウスと Dicer floxed マウスを交配することで、腱特異的に Dicer を欠損させた Dicer cKO マウスを作製し、その表現型の解析と腱特異的な miRNA の同定がなされた。</p> <p>腱特異的な Dicer cKO マウスの腱の表現型解析では、主に組織学および行動学的検証が実施され、腱の脆弱性、腱の機能低下、腱の治癒能力の低下、腱線維芽細胞の増殖細胞数の低下、が見出された。腱の脆弱性については、体長や体重に野生型マウスとの差は見られないが、アキレス腱、膝蓋腱、前腕筋腱において肉眼的脆弱性が観察された。また、アキレス腱組織の横断面積は Dicer cKO で小さい一方、単位面積の細胞数に差は見られなかった。さらに、透過型電子顕微鏡を用いたコラーゲン線維径の定量解析から、Dicer cKO では小径のコラーゲン線維が増加するとともに、線維径のばらつきが増大することが明らかとなった。腱の機能低下については、Dicer cKO では、筋力やアキレス腱の破断強度に野生型マウスとの差は見られなかったが、牽引による腱の伸長が大きくなり、歩行動作解析では足関節の可動域の拡大が観察された。腱の治癒能力の低下については、アキレス腱損傷モデルに対し腱修復スコアリングシステムを用いた腱修復の組織学的検討が行われ、Dicer cKO の修復腱に異所性骨化へと至る軟骨化生像と治癒能力の低下が見出された。腱線維芽細胞の増殖細胞数の低下については、生後 3 日の Dicer cKO のアキレス腱において、EdU 陽性である増殖腱線維芽細胞数の低下が観察された。一方で、細胞死を示す TUNEL 陽性腱線維芽細胞は検出されなかった。</p> <p>腱特異的な miRNA の同定では、Dicer cKO マウスのアキレス腱における腱関連遺伝子及び miRNA の発現解析が、RNA シーケンシングおよびリアルタイム PCR により行われた。発現解析の結果、Dicer cKO における腱関連転写因子である Scx、Mkx、Egr1 の発現低下、さらにそれら転写</p>			

因子に制御される主要な腱関連 ECM である *Coll1a1*、*Col3a1*、*Tnmd* 等の発現低下が見出された。また、腱幹/前駆細胞マーカー遺伝子の *Pdgfra* や *Tppp3* の発現低下も見られた。遺伝子オントロジー (GO) 解析の結果、*Dicer* cKO において発現が減少した遺伝子群の多くが、骨格系の発生や ECM の組織化などの生物学的プロセスに関与することが示された。さらに、*Dicer* 依存的に腱の形成や再生に関わる miRNA の候補として、腱特異的に強く発現し、且つ *Dicer* cKO において発現減少を示す miR-135a と miR-1247 が同定された。miR-135a のさらなる機能解析が行われ、損傷腱由来腱線維芽細胞に対する miR-135a 模倣体の過剰導入は *Scx* や *Tnmd*、*Tppp3* などの発現上昇を誘導することが明らかになった。また、miR-135a の標的候補を含む *Dicer* cKO において発現増加した遺伝子群に対する GO 解析では、それらの遺伝子群が細胞周期に最も強く関連することが示された。

以上のとおり、本研究は *Dicer*-miRNAs が腱の発生/成熟に重要な役割を持っていることを明らかにし、*Dicer* 依存的な腱の発生/成熟に関わる腱特異的 miRNA の候補として miR-135a を提示した。今後、miR-135a のノックアウトによる miR-135a の詳細な機能解析、miR-135a の標的遺伝子の同定、さらには発現を抑制するはずの miR-135a 模倣体によって *Scx*、*Tnmd*、*Tppp3* の発現が誘導される分子機構の解明などが期待される。miR-135a を起点にした腱・靭帯の発生やその分子メカニズムの理解が進むことで、腱再生/修復治療の発展も期待できる。すなわち、本研究は腱修復における臨床的問題点の解決に資するものとして高く評価できる。

よって審査委員会委員全員は、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あるものと認めた。