

## 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	藤原 祐輔
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 ① 2 項該当		
論文題目 miR-23a/b clusters are not essential for the pathogenesis of osteoarthritis in mouse aging and a post-traumatic models (miR-23a/b クラスターはマウスの加齢および外傷後モデルにおける変形性関節症の発症に必須ではない)			
論文審査担当者			
主査	教授	平田 信太郎	印
審査委員	教授	檜井 孝夫	
審査委員	准教授	中津 祐介	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>変形性関節症 (OA) は、運動器疾患の中でも最も罹患者が多い関節疾患であり、関節軟骨の変性・破壊による運動機能障害をきたすことから、健康寿命に深く関与している。しかし、OA は主に加齢、肥満や外傷などによる多因子疾患であることから、その発症機構は十分に理解されておらず、根本的な治療法も確立されていない。これまでに、遺伝子発現を制御するノンコーディング RNA である microRNA が、OA の病因に関与していることが多数報告されている。しかし、その多くは軟骨細胞を用いた <i>in vitro</i> 実験であり、遺伝子改変マウスを用いた実験により骨格形成や OA 発症における miRNA の役割を明らかにした研究は多くない。本論文では、軟骨細胞で高発現していた miR-23a/b クラスターに着目した。miR-23a/b クラスターは、miR-23a-27a-24 (miR-23a クラスター) および miR-23b-27b-24 (miR-23b クラスター) の 2 つから構成され、それぞれ成熟 miR-23a/b、miR-24、miR-27a/b として協調的かつ相補的に機能していると考えられる特徴的な miRNA である。しかし、骨格発生や OA 発症における miR-23a/b クラスターの役割は明らかになっていない。そこで、本論文では、軟骨特異的 miR-23a/b クラスター欠失 (KO) マウス (Cart-miR-23clus KO マウス) および全身 miR-23a/b クラスター欠失マウス (Glob-miR-23clus KO マウス) を用いて、それぞれ自然加齢モデルおよび外傷モデルでの OA 発症における miR-23a/b クラスターの機能を調べた。</p> <p>miR-23a/b クラスターを軟骨特異的に欠失させるために Col2-Cre マウスと、全身で欠失させるために CAG-Cre マウスと、それぞれ miR-23a/b クラスター floxed マウスと交配することで Cart-miR-23clus KO マウスおよび Glob-miR-23clus KO マウスを作製し、対象群マウス (Control) として miR-23a/b クラスター flox/flox マウスを使用した。加齢モデルでは、12 および 18 ヶ月齢マウス膝関節の組織学的評価を行なった。外傷モデルでは、12 週齢の Control および Cart-miR-23clus KO マウスの内側半月板切除および内側側副靭帯切断を行うことにより OA を誘導し、術後 8 週と 12 週の膝関節の組織学的評価を行なった。サフラニン O 染色による組織学的評価では、関節軟骨の変性・損傷、軟骨下骨の変化、半月板の変性、滑膜炎の重症度について各々スコアリングによる評価を行なった。また、OA 関連因子である肥大軟骨マーカー 10 型コラーゲン、軟骨基質分解酵素 ADAMTS5 および MMP13、老化細胞マーカー p16<sup>INK4a</sup> について免疫染色を行なった。さらに、Cart-miR-23clus KO マウスと Control マウスの軟骨細胞を用いてマルチオミクス解析を行なった。</p> <p>ヒト正常軟骨細胞と OA 軟骨細胞における miR-23a/b クラスターの発現は、クラスターの中でも miR-23a、miR-24、miR-27a の発現が、正常軟骨細胞に比べて OA 軟骨細胞で有意に低下していた。Cart-miR-23clus KO マウスは、骨格発生・成長に顕著な異常は認められず、膝関節の組織学的評価では、Cart-miR-23clus KO マウスと Control の間に有意な差はなかった。外傷モデルの組織学的評価においても、Cart-miR-23clus KO マウスと Control との間に有意差はなかった。そして、ADAMTS5 と MMP13 の発現は、加齢モデルおよび外傷モデル</p>			

においても関節軟骨におけるその陽性細胞数に有意な差はなかった。Glob-miR-23clus KO マウスでは、12 ヶ月齢まで Control や Cart-miR-23clus KO マウスより体重や体長、脂肪組織量、骨密度の有意な低下を示し、早期の老化様変化を認めた。しかし、MMP13 や p16<sup>INK4a</sup> 陽性細胞は、Glob-miR-23clus KO マウスの関節軟骨で有意に増加していたにも関わらず、早期の OA 様変化は認めず、組織学的評価においても Control と比較し各スコアに有意差はなかった。これまでの報告からは、miR-23a/b クラスターと OA との関係には議論の余地が残されたままであった。しかし、遺伝子改変マウスを用いた本研究により、miR-23 a/b クラスターは、加齢や外傷による OA の発症や進行に本質的な役割を持たないことが明らかになった。軟骨で高発現していた miR-23a/b クラスターであるが、OA への関与を示さなかった理由として、軟骨で高発現している miR-23a/b クラスターを含む複数の miRNAs が共通の標的 OA 関連遺伝子の発現レベルを協調的に制御しているためと考察した。

以上の結果から、miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-27a, miR-27b からなる miR-23a/b クラスターは、軟骨の発生や恒常性維持に必須でないことが明らかになった。今後、複数の miRNAs による共通標的遺伝子の発現レベル制御機構の解明や、Glob-miR-23clus KO マウスでは老化様の表現型を早期に示すことから、その原因を明らかにすることで miRNA による老化機構の解明やアンチエイジング研究への発展が期待できる。

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。