

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (歯学)	氏名	大頭 慎太郎
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 MIR125B-5p Derived from the <i>Mir125b-1</i> Gene Negatively Regulates Osteoblast Differentiation (<i>Mir125b-1</i> 由来 MIR125B-5p は骨芽細胞分化を負に制御する)			
論文審査担当者			
主査	教授	吾郷 由希夫	印
審査委員	教授	宿南 知佐	
審査委員	教授	太田 耕司	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>骨粗鬆症は、骨代謝のアンバランスによる骨の質と量の低下によって引き起こされ、閉経後の女性や高齢者に多くみられる。マイクロ RNA (miRNA) は、標的となるメッセンジャー RNA に結合することでタンパク質翻訳を抑制し、細胞の増殖、分化や癌の抑制などの多種多様な生命現象の制御に寄与している。骨の恒常性維持には、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の均衡が必要とされる。骨芽細胞の分化制御機構において様々な miRNA が関与することが報告されており、骨疾患治療のターゲット分子としても期待されている。先行研究では、骨粗鬆症患者において MIR125B-5p の発現が上昇していることが報告されており、MIR125B-5p の機能獲得または喪失は、マウス骨髄ストローマ細胞由来細胞株である ST2 細胞において骨芽細胞分化を阻害または亢進することが明らかとなっている。しかしながら、この MIR125B-5p は、2 つの遺伝子 (<i>Mir125b-1</i> と <i>Mir125b-2</i>) によってコードされていることが知られており、MIR125B-5p がどちらの前駆体から生成され機能しているかは不明である。そこで本研究では、骨形成制御における両遺伝子の役割を明らかにすることを目的に、CRISPR-Cas9 システムにより、<i>Mir125b-1</i> ノックアウト (以下 KO1) および <i>Mir125b-2</i> ノックアウト (以下 KO2) ST2 細胞を樹立し、骨芽細胞分化への影響について検討した。</p> <p>ノックアウト (KO) 細胞を樹立するため、リポフェクション法を用いて、Cas9 と <i>Mir125b-1</i> あるいは <i>Mir125b-2</i> 遺伝子のコード領域を標的とする guide RNA を ST2 細胞に導入し、バルク細胞のゲノム DNA を用いて変異の検出を確認した。つづいて、限界希釈法によりシングルセルクローンを樹立した。各クローンの pri-MiR125b-1 と pri-MiR125b-2 を定量し、標的遺伝子の欠失の有無を判定したところ、それぞれのターゲットで PCR 産物が検出されないクローンが見いだされた。本結果から、KO1 および KO2 細胞を樹立できたと考えられた。</p> <p>KO 細胞における MIR125B-5p の発現量について、培養後の細胞から総 RNA を単離し解析したところ、KO1 細胞の MIR125B-5p 発現量は、ネガティブコントロール (NC) の細胞と比較して有意に低下していたが、KO2 細胞では変化がみられなかった。本結果から、ST2 細胞における MIR125B-5p の発現は、主に <i>Mir125b-1</i> 遺伝子に由来することが示唆された。</p> <p>つづいて、骨芽細胞分化における <i>Mir125b-1</i> KO の影響を明らかにするため、ST2 細胞を 10% FBS 含有の増殖用培地 (α-MEM) から、アスコルビン酸、β-グリセロリン酸、骨形成因子 BMP-2 を含む分化誘導培地に交換し、培養した。分化誘導 10 日目において、KO1 細胞では NC 細胞と比較して、<i>bone sialoprotein (Bsp)</i> や <i>bone gamma-carboxyglutamate protein (Bglap)</i> などの骨芽細胞マーカーの遺伝子発現レベルが有意に増加していた。MIR125B-5p の標的遺伝子であり骨分化の活性化因子としても知られる <i>core-binding factor subunit beta (Cbfb)</i> についても、有意な増加が認められたが、KO1 細胞と NC 細胞の間で、アルカリフォスファターゼ活性に有意な差はみられなかった。さらに石灰化について解析したところ、KO1 細</p>			

胞では NC 細胞よりも von Kossa 染色陽性面積が約 3 倍増加していた。以上の結果から、*Mir125b-1* は後期骨形成分化遺伝子を負に制御している可能性が示された。

最後に、*Mir125b-1* 由来の MIR125B-5p が、実際に骨芽細胞の分化に直接関与しているかを明らかにするため、KO1 細胞に対する MIR125B-5p レスキュー実験を行った。RT-qPCR により、MIR125B-5p mimic をトランスフェクションした KO1 細胞において、コントロール処置群と比較して MIR125B-5p の発現量が著明に増加していることを確認した。MIR125B-5p の発現を増加させると、KO1 細胞において *Bsp*, *Bglap*, *Cbfb* の発現が有意に低下した。さらに、MIR125B-5p mimic により、KO1 細胞での von Kossa 染色陽性面積が減少し、骨芽細胞の石灰化が阻害された。本結果から、*Mir125b-1* 由来の MIR125B-5p は、骨芽細胞分化に対して抑制的に作用していることが示された。

以上、本研究では CRISPR-Cas9 システムを用いて、マウス間葉系幹細胞株である ST2 細胞から *Mir125b-1* および *Mir125b-2* KO 細胞を樹立し、*Mir125b-1* 遺伝子から生成される MIR125B-5p が骨芽細胞の分化抑制に関与していることを実証した。これは、骨分化制御における *Mir125b-1* 遺伝子の役割を示す新知見であり、発達成育に基づく矯正歯科学や関連歯科医学分野の発展に大きく寄与するものと評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が大頭慎太郎に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。