

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	中尾 裕子
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-125b in matrix vesicles inhibits osteoclast formation (基質小胞由来 miR-125b は破骨細胞の形成を抑制する)			
論文審査担当者			
主査	教授	内田 隆	印
審査委員	教授	宿南 知佐	
審査委員	教授	香西 克之	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>骨は骨吸収と骨形成を繰り返す動的組織であり，骨代謝は骨吸収を司る破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞の細胞間コミュニケーションにより維持されている。前者は造血系幹細胞に由来し，単球・マクロファージを経て分化する。後者は間葉系幹細胞から段階的に分化し，一部は骨基質に埋入されて骨細胞となる。骨芽細胞はコラーゲン線維を主体とする細胞外基質を形成した後，基質小胞（matrix vesicles, MVs）を出芽的に放出する。基質小胞は平均約 150 nm の脂質二重膜に覆われた小胞であり，膜上に存在するリン酸トランスポーターやカルシウムチャネルは小胞内にカルシウムとリンを集積させ，ハイドロキシアパタイトの結晶成長を促し，石灰化を誘導する。MVs はエクソソームと一部の組成を共有するが，小胞の形成経路や膜構成タンパクが異なることが報告されている。エクソソームは，ほとんどの細胞から分泌され，血流を循環し，尿や唾液にも含まれる。近年，エクソソームのタンパク質や RNA が標的細胞に受容され，様々な機能を制御することが明らかとなってきた。中でも，エクソソームに内包される microRNA（miRNA）は高い関心を集めている。miRNA は 18-25 塩基からなる非翻訳 small RNA で，特定の mRNA に結合することで翻訳を抑制する。最近では，エクソソームに内包された miRNA が標的細胞の特定の遺伝子発現を抑制する事例が次々と報告されている。このような背景から，本研究では，骨基質に埋入された MVs がエクソソームと同様に miRNA を内包し，そのうちの特定の miRNA が骨微小環境を調節する可能性を検討することとした。</p> <p>マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞およびラット頭頂骨由来細胞（RC 細胞），ヒト骨芽細胞を培養し，細胞外基質から超遠心によって MVs を回収した。MVs の性状は電顕，ナノサイト，マーカートンパクの発現により確認した。精製した MVs はマウスマクロファージ細胞株（RAW-D）における RANKL 依存性の破骨細胞形成を用量依存的（$<2 \mu\text{g/mL}$）に抑制した。同様の結果は RANKL/M-CSF で刺激したマウス骨髄マクロファージ細胞（BMM）においても確認された。これらと一致して，MVs が破骨細胞分化マーカー遺伝子の発現を</p>			

抑制すること、ピットフォーメーションアッセイによる骨吸収を抑制することを確認した。一方、MVsはMC3T3-E1細胞、RC細胞のいずれにおいても、細胞増殖・分化、基質石灰化に影響しなかった。MVsを蛍光標識し、RAW-D細胞、MC3T3-E1細胞に負荷すると、いずれの細胞においても24時間後までに大部分の細胞に取り込まれることが確認された。

MC3T3-E1細胞の細胞外基質から精製したMVsを用い、全RNAを抽出し、アジレント社miRNAマイクロアレイを行った。その結果、176種のmiRNAが検出され、そのうち77種はヒトと一致した。ヒトで確認されている77種のmiRNAのうち、内包量の多いものについてmiRnada、TargetScan等のデータベースによる絞り込みを行い、最終的にlet-7c、miR-125b、miR-199aおよびmiR-21aの4種を選択した。ヒト骨芽細胞、MC3T3-E1細胞およびRC細胞ならびにそれらに由来するMVsについて、4種のmiRNAを定量したところ、miR-125bはいずれの場合もMVsにおいて有意に高値を示した。BMMにおいては、miR-125bは破骨細胞分化誘導前後共に著しく低値であった。

miR-125b mimicをRAW-D細胞にトランスフェクションしたところ、RANKL依存性の破骨細胞分化が有意に抑制された。この作用は、miR-125bプロテクターによって阻害された。miR-125bプロテクターは、MVsを負荷した場合にも同様の結果を示した。破骨細胞前駆細胞で発現するmiR-125bの推定標的遺伝子を全て洗い出し、miR-125b mimicをトランスフェクトしたRAW-D細胞を用いてこれらの発現量を確認したところ、*Prdm1*のみが有意に抑制された。これと一致して、PRDM1の下流遺伝子である*Irf8*および*Maib*の発現レベルが増加したことから、miR-125bの標的遺伝子は*Prdm1*と推測された。miR-125bが生体において破骨細胞の形成を抑制するか否かを確認するため、LPS誘導性の頭頂骨骨溶解モデルマウスを作製した。同マウス頭頂部皮下にアテロコラーゲンを担体としてmiR-125b mimicを投与したところ、LPSによって誘導された骨吸収が有意に抑制された。

以上の結果から、本論文は骨芽細胞によって骨基質に埋入された基質小胞に内包されるmiR-125bが、破骨細胞前駆細胞に取り込まれ、破骨細胞分化を抑制することを示唆した。よって審査委員会委員全員は、本論文が中尾 裕子に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。