

氏名	伏見 滋子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5922号
学位授与の日付	平成31年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Involvement of miR-140-3p in Wnt3a and TGFβ3 signaling pathways during osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells (骨芽細胞分化に関わる Wnt3a と TGFβ3 シグナルを制御する miR-140-3p の機能解析)
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 岡元 邦彰 教授 上岡 寛 教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

【緒言】

骨芽細胞分化には、Wnt, TGFβ, BMP, Ihh など多くのサイトカインやホルモンが関与し、これらの因子はそれぞれのシグナル伝達経路を介して細胞分化を制御している。その中で、β-catenin を介して遺伝子発現を制御する Wnt/β-catenin シグナルは骨芽細胞の増殖と分化に必須であり、多面的な作用をすることが知られている。リガンドとして Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a などがあり、特に Wnt3a は強い活性を有するとされている。

一方、近年の研究では遺伝子の発現は転写だけでなく、miRNA などによっても制御されることが明らかになっている。miRNA は約 22 塩基からなる 1 本鎖の non-coding RNA で、標的となる遺伝子 mRNA の 3'UTR 領域に結合して遺伝子発現を負に制御する。

本研究では骨芽細胞分化において Wnt3a が制御する miRNA の発現プロファイルおよびその機能の解析を行うことを目的とした。

【方法】

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞にアデノウイルスシステムを用いて Wnt3a または eGFP を過剰発現させ、骨芽細胞分化への影響をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色と骨芽細胞関連遺伝子である ALP, タイプ I コラーゲン (Col1), Runx2, オステオカルシン (OCN) mRNA の発現解析で検討した。

miRNA の発現解析は、過剰発現 3 日後の試料を用いて miRNA microarray 解析で行ない、2 倍以上の発現変動があるものを抽出した。さらに、発現量が高いものを選択し、リアルタイム PCR 法にて確認を行うことで特徴的な miRNA の絞り込みを行った。

注目した miRNA の標的遺伝子の予測は、3 種類のデータベース、MicroRNA.org, miRDB, DIANA-

microT を用いて行った。miRNA の標的候補遺伝子の 3'UTR への結合検証は、Dual-luciferase reporter assay で行った。miRNA の機能解析は、細胞に miRNA mimic を導入して骨芽細胞関連遺伝子の発現解析にて検討した。さらに、標的候補遺伝子の機能を検討した。

【結果】

MC3T3-E1 細胞に *Wnt3a* を過剰発現させたところ、ALP 陽性細胞の増加と *ALP* mRNA の発現亢進が認められたが、*Coll*, *Runx2*, *OCN* mRNA の発現は抑制された。

miRNA プロファイル解析では、2 倍以上発現が増加した miRNA が 14 種、減少した miRNA が 21 種得られた。その中で発現量が高い miRNA を抽出し、リアルタイム PCR で有意な発現変動が確認できた miRNA として、miR-140-3p, miR-140-5p, miR-322-5p が得られた。いずれも、*Wnt3a* 過剰発現によって減少した miRNA であった。最も高発現で変動幅が大きな miR-140-3p に注目し、その標的遺伝子をデータベースで検索したところ、*TGFβ3* が候補の 1 つとして得られた。

TGFβ3 が miR-140-3p の標的遺伝子であるかどうかの検証実験を行った。*Wnt3a* 過剰発現は *TGFβ3* 発現を亢進したが、miR-140-3p mimic の細胞導入は *TGFβ3* 発現を抑制した。さらに、Dual-luciferase reporter assay で miR-140-3p が *TGFβ3* mRNA の 3'UTR に直接結合することが明らかとなった。以上の結果から、*TGFβ3* が miR-140-3p の標的遺伝子の 1 つであることが確認された。

miR-140-3p の機能を検討するため、miR-140-3p mimic を細胞導入したところ、*ALP*, *Coll*, *Runx2* mRNA では対照群と比べて変化がなかったが、*OCN* mRNA では有意な増加が認められた。さらに、r*TGFβ3* の *OCN* mRNA 発現への作用を検討したところ、その発現は抑制された。

【考察】

Wnt3a 過剰発現細胞では ALP 発現が亢進し初期分化が亢進すると考えられたが、後期分化マーカーである *OCN* mRNA の発現は抑制された。*Wnt3a* によって発現が抑制される miR-140-3p が *TGFβ3* の遺伝子発現を直接制御する miRNA であることが明らかとなった。さらに、*TGFβ3* は *OCN* の発現を調節していると考えられた。これらの結果より、骨芽細胞分化において miR-140-3p は *Wnt3a* シグナルと *TGFβ3* シグナル間に制御因子として関与することで、*OCN* の発現を調整していると考えられた。

【結語】

骨芽細胞分化において *Wnt3a* シグナルと *TGFβ3* シグナル経路に関与する miR-140-3p による調節が存在することが明らかとなった。さらに、miR-140-3p は *OCN* 発現促進を目指した新たな治療薬の開発につながる可能性がある。

論文審査結果の要旨

骨芽細胞分化には、Wnt, TGF β , BMP, Ihh などの多くの因子が関与している。その中で、Wnt/ β -catenin シグナルは骨芽細胞の増殖と分化に必須であり、多面的な作用をもつ。一方、近年、遺伝子の発現は転写だけでなく、miRNA などの non-coding RNA によって翻訳レベルでも制御されることが明らかになった。本研究では、骨芽細胞の分化において Wnt3a により制御を受ける miRNA の同定およびその機能解析を行うことを目的とした。

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞にアデノウイルスシステムを用いて Wnt3a または eGFP を過剰発現させ、骨芽細胞の分化への影響を調べた。miRNA のプロファイル解析は、過剰発現 3 日後の試料を用いた miRNA microarray で行ない、2 倍以上の発現変動があるものを抽出した。その中から、発現量が多いものを選択し、リアルタイム PCR 法にて発現の確認を行い、miRNA の絞り込みを行った。注目した miRNA の標的遺伝子の予測は、データベースを用いて行った。miRNA の標的候補遺伝子の 3'UTR への結合検証は、Dual-luciferase reporter assay で行った。miRNA の機能解析は、細胞に miRNA mimic を導入して骨芽細胞関連遺伝子の発現解析にて検討した。さらに、標的候補遺伝子の機能を検討した。

MC3T3-E1 細胞に Wnt3a を過剰発現させたところ、ALP 陽性細胞の増加と ALP mRNA の発現亢進が認められたが、Coll1, Runx2, OCN mRNA の発現は抑制された。miRNA プロファイル解析で大幅に発現が減少した miR-140-3p に注目し、その標的遺伝子をデータベースで検索したところ、TGF β 3 が候補として得られた。Wnt3a 過剰発現は TGF β 3 の発現を誘導したが、miR-140-3p mimic の導入により、TGF β 3 発現が抑制された。さらに、miR-140-3p が TGF β 3 mRNA の 3'UTR に直接結合することが明らかとなった。以上の結果から、TGF β 3 が miR-140-3p の標的因子の 1 つであることが確認された。miR-140-3p の機能を検討するため、miR-140-3p mimic を導入したところ、OCN mRNA の有意な増加が認められ、この増加は、リコンビナント TGF β 3 の投与により抑制された。これらの結果から、TGF β 3 シグナルを介した OCN の発現は miR-140-3p により制御をうけることが示された。

本研究により、Wnt3a シグナルと TGF β 3 シグナル経路が関与する骨芽細胞の分化において miR-140-3p による調節メカニズムが存在することが明らかとなった。さらに、miR-140-3p は OCN 発現促進を目指した新たな治療薬の開発のターゲットとなる可能性が示唆された。

以上より、本研究の成果は高く評価され、基礎歯学及び臨床応用の発展に寄与するものと期待される。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。