

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲口 甲口保 乙口第 397 号 乙口保 口修	氏名	岩脇有軌
審査委員	主査 野間 隆文 副査 羽地 達次 副査 岩本 勉		

題目

MiR-494-3p induced by compressive force inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 cells
(MC3T3-E1細胞における圧縮応力誘導性miR494-3pによる細胞増殖の阻害)

要旨

生体内環境においてメカニカルストレスは、骨組織の骨量・骨量構造を決定する重要な外的因子の1つである。骨芽細胞はメカニカルストレスの応答細胞であり、骨機能調節の中心的な役割を担う。メカニカルストレスが骨芽細胞の骨分化や骨増殖に影響を与えることは知られているがそのシグナルの制御分子については、未だ不明な点が多い。近年、新たな遺伝子発現制御因子としてmicroRNA (miRNA) が注目されている。本研究では、持続的圧縮応力 (CF: Compressive Force) を負荷したマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) で変動するmiRNAを同定し、その機能を検討した。

MC3T3-E1細胞に294 Paの持続的圧縮応力を24時間負荷した際のmiRNA発現変動をマイクロアレイ解析によって検討した。発現上昇を認めた14種のmiRNAについて定量的PCR解析を行い、CF負荷により有意に発現が上昇するmiRNAとしてmiR-494-3p, miR146a-5p, miR-210-3p, miR-1247-3pを同定した。このうち、MC3T3-E1細胞で発現量が多く、変化量も顕著であったmiR-494-3pの細胞増殖への関与について、MTT Assayにより検討した。miR-494-3pの過剰発現はMC3T3-E1細胞の細胞増殖を抑制した。さらに24時間のCFを負荷したMC3T3-E1細胞をトリプシン処理と遠心により回収し再播種した細胞で、miR-494-3pの発現上昇の維持と増殖抑制を認めた。次に、miR-494-3pの標的遺伝子候補をmiRDB、Target Scan、microRNA-orgのデータベースを用いて検索した。得られた標的遺伝子候補のうち、fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) とRho-associated coiled-coil kinase 1 (Rock1) について検討を行った。CF負荷やmiR-494-3pの過剰発現はMC3T3-E1細胞でのFgfr2のmRNAレベルとタンパク質レベルを低下させた。一方、Rock1の発現抑制はmRNAレベルでのみ認められた。Fgfr2あるいはRock1のsiRNAによる発現低下はMC3T3-E1細胞の増殖を抑制した。さらにFgfr2とRock1の両方の発現低下は、相乗的な増殖抑制を示した。Fgfr2とRock1 mRNAの3'-非翻訳領域には、それぞれ2箇所のmiR-494-3p結合部位が存在することがmiRDBにより予測されたが、ルシフェラーゼアッセイを用いた検討において、miR-494-3pによるFgfr2遺伝子の発現抑制には、2つの結合予測部位の両方が、Rock1遺伝子の発現抑制には5'側の結合予測部位のみが関与することが示された。

以上より、MC3T3-E1細胞でCFにより誘導されるmiR-494-3pは、Fgfr2とRock1の発現抑制を介してMC3T3-E1の増殖を抑制することが示された。CFによるMC3T3-E1細胞のストレス応答にmiR-494-3pがシグナル分子として関与している可能性が考えられた。

本研究成果は、骨に対するメカニカルストレス負荷のシグナル伝達において特異的なmiRNAが関与していることを示唆するものであり、今後、miRNAを標的とした核酸医薬やバイオマーカーとしてメカニカルストレスを基盤とした病態などに応用できる可能性をもつと考えられる。よって本研究は、博士(歯学)の学位に相応しいと判断した。