

平成25年 2月

岡本秀治 学位論文審査要旨

主査 豊島良太
副主査 汐田剛史
同 領家 和男

主論文

Involvement of microRNAs in regulation of osteoblastic differentiation in mouse induced pluripotent stem cells

(マウス人工多能性幹細胞の骨芽細胞分化の制御におけるmicroRNAの関与)

(著者：岡本秀治、松見吉朗、星川淑子、田窪千子、領家 和男、汐田剛史)

平成24年 PLoS ONE 7巻 e43800

参考論文

1. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3β

(テトラサイクリン誘導性hepatocyte nuclear factor 3β 発現によるヒト骨髓由来間葉系幹細胞の肝細胞分化)

(著者：石井恭子、吉田陽子、明地雄司、坂部友彦、西尾れん、池田礼美奈、寺林慶、松見吉朗、権田一絵、岡本秀治、田窪千子、但馬史人、土谷博之、星川淑子、栗政明弘、梅澤明弘、汐田剛史)

平成20年 Hepatology 48巻 597頁～606頁

学 位 論 文 要 旨

Involvement of microRNAs in regulation of osteoblastic differentiation in mouse induced pluripotent stem cells

(マウス人工多能性幹細胞の骨芽細胞分化の制御におけるmicroRNAの関与)

MicroRNA(miRNA)は、mRNA 3'非翻訳領域(3'UTR)配列に結合し、遺伝子発現を制御する細胞分化の重要な制御因子として注目されている。近年、骨芽細胞分化に関与するmiRNAも複数報告されており、骨芽細胞分化の制御にmiRNAが関与すると考えられている。

本研究では、マウスiPS細胞のBMP-4処理による骨芽細胞分化誘導系で、誘導期間でのmiRNA microarray解析を行い、誘導期間内に発現低下したmiRNAに焦点をあて、骨芽細胞分化に関与する転写因子Dlx5及びMsx2を制御するmiRNAを同定し、それらを標的とする6つのmiRNAのanti-miRNAを用いて骨芽細胞分化誘導を試みた。

方 法

マウスiPS細胞を用いてBMP-4処理による骨芽細胞分化を行った。骨芽細胞分化への誘導をreal-time PCR解析とAlizarin Red染色、及びAlkaline phosphatase染色で確認した。骨芽細胞分化誘導期間にtotal RNAを回収し、miRNA microarray解析を行った。分化誘導期間中に有意に発現低下したDlx5及びMsx2を標的とする6つのmiRNAの発現低下をreal-time PCRで確認した。これらのmiRNAのうち、miRNA-124aとmiR-181aについて、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1細胞にそれぞれ導入し、reporter assay、Western blotting、およびreal-time PCR解析を行った。また、Dlx5及びMsx2を標的とする6つのmiRNAのanti-miRNAをマウスiPS細胞に導入し、骨芽細胞への分化誘導を試みた。BMP-4処理での骨芽細胞分化誘導と同様の方法により、骨芽細胞分化を評価した。

結 果

BMP-4処理によるマウスiPS細胞の骨芽細胞分化において、骨芽細胞関連遺伝子 (Runx2、Osteocalcin等) の著しい発現増加を認め、それぞれの染色で陽性を認め、骨芽細胞への分化を確認した。miRNA microarrayの結果、分化誘導期間に発現低下したmiRNAの中で、6つのmiRNAは、転写因子Dlx-5及びMsx2を標的遺伝子とすることが予測された。これらのmiRNAは、real-time PCR解析で分化誘導期間中の発現低下を確認した。これらのmiRNAのうち、

Dlx5及びMsx2をより有意に標的とすると予測されたmiR-124aとmiR-181aを用いたreporter assay、Western blot、及びreal-time PCR解析の結果、miR-124a及びmiR-181aは、それぞれDlx5及びMsx2 mRNA 3' UTRを特異的に制御し、蛋白発現を低下させ、これら遺伝子を直接的に制御し、骨芽細胞分化に関与することを示した。また6つのmiRNAのanti-miRNAを導入した分化誘導では骨芽細胞分化マーカー、Runx2、Msx2及びOsteopontinの上昇がみられた。

考 察

BMP-4誘導性骨芽細胞分化で抑制されたmiRNAの中に、Dlx5及びMsx2を標的とする6つのmiRNAが存在し、そのうちmiR-124aとmiR-181aがそれぞれDlx5とMsx2を直接的な標的とし、遺伝子発現レベルを減少させ、骨芽細胞分化を抑制することを示した。つまり、miR-124aとmiR-181aによるDlx5とMsx2 mRNAの制御は、非骨性細胞において骨芽細胞分化を抑制するためにDlx5とMsx2を負に制御する重要なメカニズムである。本研究結果より、miRNAが骨芽細胞分化を制御していると推論できる。

マウスiPS細胞の骨芽細胞分化において、Dlx5及びMsx2を標的とする6つのmiRNAの機能は何なのか。予備実験で、anti-miR-124aとanti-miR-181aの導入では骨芽細胞分化へ誘導されなかった。Dlx5及びMsx2を直接的に標的とするmiR-124aとmiR-181aの抑制だけでは不十分であり、これら2つのmiRNAに加え少なくとも、もう一つのmiRNAの抑制が必要であると考えられた。miR-10a、miR-10b、miR-19b、miR-9-3pはDlx5及びMsx2に対する制御メカニズムを構成する可能性がある。これらmiRNAの機能を明確にするために、さらなる分析が必要である。

結 論

マウスiPS細胞を用いたBMP-4処理による骨芽細胞分化誘導系で、骨芽細胞分化に関連する6つのmiRNAを同定し、分化制御での重要な役割を示した。標的遺伝子を抑制することにより、マウスiPS細胞のBMP-4誘導性骨芽細胞分化制御に強く関与し、重要な役割を担う6つのmiRNAを見出した。また、anti-miRNAを用いた骨芽細胞分化誘導の可能性を示した。

審査結果の要旨

本研究は、マウスiPS細胞のBMP-4処理による骨芽細胞分化誘導系で、誘導期間内でのmiRNA microarray解析を行い、誘導期間内に発現低下したmiRNAに焦点をあて、骨芽細胞分化に関与するmiRNAを同定し、同定したmiRNAのanti-miRNAによる骨芽細胞分化誘導の可能性を検討した。その結果、マウスiPS細胞を骨芽細胞分化誘導系で同定した6つのmiRNAは、Dlx5及びMsx2を抑制することにより骨芽細胞分化制御に強く関与することが判明し、anti-miRNAによる骨芽細胞分化誘導では一部の骨芽細胞分化マーカーの発現増加を認め、その可能性が示唆された。本論文の内容は、再生医療の分野で、マウス人工多能性幹細胞の骨芽細胞分化の制御におけるmiRNAの関与を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。