

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建・再生科学領域脊椎脊髄病態修復学教育研究分野 氏名 千葉 紀之
<p>(論文題目)</p> <p>Decreased DNA methylation in the promoter region of the WNT5A and GDNF genes may promote the osteogenicity of mesenchymal stem cells from patients with ossified spinal ligaments.</p> <p>(WNT5A と GDNF のプロモーター領域における DNA メチル化の減少によって脊柱靭帯骨化症患者由来の間葉系幹細胞の骨化が促進される)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p><b>【目的】</b>我々は、脊柱靭帯骨化症患者の靭帯から得られた間葉系幹細胞(MSCs)に高い骨化傾向を見いだした。本研究の目的は、胸椎黄色靭帯骨化症患者(OYL 群)と非骨化症患者(non-OYL 群)の両 MSCs 間における、DNA 脱メチル化処理による遺伝子発現量の変化の違いを、マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、メチル化による遺伝子修飾というエピジェネティクスの機構が、MSCs の骨化傾向に関与しているのかどうかを検討することである。</p> <p><b>【対象および方法】</b>OYL、non-OYL 各 4 例を対象に、手術時に採取した黄色靭帯から MSCs を調製し、5-aza-2'-deoxycytidine(5AdC)によって脱メチル化処理を行った。検討項目は 1)マイクロアレイを用いた網羅的解析による、脱メチル化によって、骨化促進遺伝子を探索する。、2)real-time PCR で当該遺伝子の発現変化を確認する、3)当該遺伝子が実際にメチル化でコントロールを受けているかどうかを、メチル化 DNA 免疫沈降反応によって定量する、4)siRNA により当該遺伝子を抑制した状態で、骨化能が抑制されるかどうか、機能面から検討する。</p> <p><b>【結果】</b>DNA メチル化で調節をうけているであろう骨化促進遺伝子の探索のアルゴリズムは以下のとおりである。</p> <p>すなわち、Group 1：正常組織の MSCs (non-OYL) ではメチル化されているため、脱メチル化処理で発現が大きく増加する。一方、Group 2：骨化組織での MSCs(OYL) では DNA メチル化が低下しているため、さらに脱メチル化処理しても、発現が大きく増加することはない。そして、Group 3：通常の培養条件下では、骨化促進している OYL での発現が、non-OYL での発現より著明に高い。</p> <p>これらを同時に満たす遺伝子が、メチル化によって正常時は抑制されているが、病態では脱メチル化されていることで、MSCs を骨化し易い性質に導くと想定した。それに該当する遺伝子として、WNT5A と GDNF の 2 つの遺伝子が抽出された。2)real-time PCR においてもマイクロアレイの結果が再現された。3)これら 2 つの遺伝子は、OYL 患者由来 MSCs と比較して非骨化症患者由来 MSCs では高度にメチル化されていた。4)OYL 患者由来 MSCs において、siRNA により WNT5A と GDNF を抑制すると、骨化関連遺伝子および、骨化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性が有意に減少した。</p> <p><b>【考察】</b>非骨化症患者の MSCs では DNA メチル化で発現抑制されている WNT5A と GDNF が、骨化患者 MSCs では脱メチル化されていた。</p> <p>今回異所性骨化に関連する遺伝子として、現れてきた WNT5A であるが、もともと WNT 系は MSCs の系統と発達を決定する役割を持つことが知られていた。さらに最近、骨芽細胞形成に WNT5A が関わっていることが示されている。また GDNF が骨芽細胞形成に関与することが示された。したがって、WNT5A、GDNF とともに、骨化能のエピジェネティックな調節に関わっている可能性が考えられる。</p> <p>これらのことを合わせると、OYL 患者由来 MSCs の高い骨化傾向は、GDNF、WNT5A の脱メチル化で起こっている可能性が示唆された。</p>	

