

論文内容要旨

Overexpression of miR-125b in osteoblasts inhibits
bone resorption without affecting skeletal
development and improves age-related changes in
bone mass and quality

(miR-125b の骨芽細胞特異的過剰発現は骨格成長への影響なく骨吸収を阻害し、加齢性の骨量や骨質への変化を改善する)

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：吉子 裕二教授

(医系科学研究科 硬組織代謝生物学)

副指導教員：上田 宏准教授

(医系科学研究科 歯科矯正学)

伊藤 翔太

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

マイクロ RNA (miRNA) は 21~25 塩基からなる 1 本鎖の RNA で、種々の mRNA に部分的に相補的な配列を以って結合する。その結果、標的 mRNA を不安定化し、翻訳抑制を行うことが知られている。近年、細胞外小胞の一種であるエクソソームが miRNA を含有し、miRNA を介してドナー細胞-レシピエント細胞間で遺伝子ベースのコミュニケーションを行うことが報告された。骨芽細胞から出芽的に分泌される基質小胞 (MV) も細胞外小胞の一種であるが、MV は類骨に蓄積してハイドロキシアパタイトの結晶成長を促し、基質の初期石灰化に関与することが知られている。我々は MV に miRNA が内包され、骨芽細胞で発現する miRNA が MV を介して骨基質に輸送されることを見出した。MV の生物活性を各種培養細胞でスクリーニングしたところ、破骨細胞の形成阻害作用が見出されたため、データベースにより破骨細胞形成に関与する遺伝子と結合可能な miRNA を抽出し、さらに MV、骨基質への輸送選択性が見られる miRNA を選定した。このうち、miR-125b は *Prdm1* と結合し、下流の破骨細胞形成抑制因子である *IRF8*、*MAFB* の発現を上昇させ、破骨細胞の形成を阻害すること明らかにした。そこで、ヒトオステオカルシンプロモーター制御下で骨芽細胞特異的に miR-125b を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製したところ、頭蓋、椎骨、四肢の骨量、とりわけ海綿骨骨量の著しい増加を認めた。Tg マウスの骨形成パラメータならびに骨芽細胞に異常は認められず、破骨細胞数の減少が確認された。Tg マウスおよび野生型 (WT) マウス骨髄マクロファージを Tg マウスまたは WT マウス頭頂骨骨片上で培養したところ、いずれの組み合わせにおいても Tg マウス骨片上で培養した場合のみ、破骨細胞の形成が抑制され、同培養上清から多くの miR-125b が検出された。したがって、骨芽細胞で発現する miR-125b は MV を介して骨基質に貯蔵され、骨吸収に伴って微小環境に放出された後、破骨細胞の形成を抑制するものと推察された。

骨芽細胞における miR-125b の過剰発現に伴う骨量増加が骨吸収抑制によるものであることから、Tg マウスでは骨の構造、質的・機能的劣化が懸念される。そこで、本研究では Tg マウスの長管骨を用い、骨量増加の過程を詳細に検討するとともに加齢あるいは骨折治癒過程における骨の構造変化、質的・機能的変化に及ぼす miR-125b の影響を評価した。

はじめに、雄マウス胎生期から生後直後の大腿骨および脛骨を組織学的に解析した。軟骨内骨化によって制御される長管骨長軸方向の成長については Tg マウスに異常は認められなかった。骨膜性成長を評価するため、カルセイン・アリザリンレッド S による骨二重標識を施し、骨幹中央部のモデリングおよびリモデリングを観察した。胎生 16.5 日 (E16.5) から生後 5 日齢 (P5) において、Tg マウスの骨膜側への骨添加、石灰化速度はともに WT と同等であった。一方、骨内膜側の骨吸収は P2 において Tg マウスで抑制され、これと一致して破骨細胞数が減少した。 μ CT 解析による Tg マウス同骨幹中央部の骨量および骨密度は E18.5 から WT と比較して高値となった。次に、10 週齢、30 週齢と 77 週齢雄の脛骨を解析し、加齢の影響を確認した。WT マウスでは Tg マウスと比較し、30 週齢に対する 77 週齢の海綿骨量減少率が著しく、これに対応して 77 週齢海綿骨の FT-IR 分析は Tg マウスのミネラル/マトリックス比が WT マウスより高値を示した。大腿骨 3 点曲げ試験では、Tg マウスは WT マウスと比較して高い機械的強度を示した。

大腿骨骨折モデルにおける骨折治癒過程を組織学的に評価したところ、初期のカルス形成に両系

統間の差は認められなかった。WT マウスにおいて、カルス内の軟骨は次第に骨に置換され、術後6週でカルス骨量は著しく減少した。一方、Tg マウスでは術後6週においても軟骨を含むカルスが残存し、カルスの成熟遅延が示唆された。

以上の結果より、Tg マウスでは破骨細胞の形成が抑制されるものの、骨形成はWT と同等のレベルで維持され、骨形成優位なリモデリングが進行することで骨量が増加するものと推察された。Tg マウスは加齢環境でも健康な骨質、骨強度をもたらしたが、一方で、骨折治癒の遅延を認めた。MV を介して骨基質に蓄積された miR-125b は骨吸収に伴って微小環境中に放出されるため、miR-125b による骨吸収の抑制は一定量の骨吸収を伴うことが示唆され、その結果、骨形成優位のリモデリングが維持されるものと考えられる。これらの所見は、骨粗鬆症のための新しい治療標的の可能性を提供するものと期待される。