

# 論文内容要旨

*Mir125b-2* deficiency in mice affects MIR125B-5p  
expression and ex vivo osteoblastogenesis

(マウス *Mir125b-2* 欠損は MIR125B-5p の発現と ex vivo  
における骨芽細胞分化に影響する)

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：加来 真人教授

(医系科学研究科 生体構造・機能修復学)

小笠原 伯宏

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

miRNA は 20 から 25 塩基長の 1 本鎖 RNA で、転写後の発現調節を担う non-coding RNA である。ゲノムより転写された 1 本鎖 RNA は、相補配列の結合によってヘアピンループ構造をとり、primary miRNA (以下 pri-miRNA) となる。pri-miRNA は Drosha により核内で切断され、miRNA 前駆体 (以下 pre-miRNA) となった後、細胞質内に輸送され、Dicer によるプロセッシングを受けて 2 本鎖 RNA となる。Dicer や Ago2 などのタンパク複合体に取り込まれた miRNA は、一本鎖化され、成熟 miRNA となり、標的 mRNA の 3'UTR に結合して翻訳抑制や mRNA の分解を促進することが知られている。近年、細胞外分泌小胞 exosome 中に miRNA が内包され、受容細胞において遺伝子発現を調節することも明らかにされた。一方、骨芽細胞等は基質小胞と呼ばれる固有の細胞外小胞を放出し、石灰化開始の起点として機能することが知られている。我々は骨芽細胞由来の基質小胞に多数の miRNA が内包されることを明らかにした。このうち、miR-125b は骨基質に埋入された後、骨代謝の過程で破骨細胞前駆細胞に受容され、Prdm1 を標的として破骨細胞分化を抑制することを見出した。成熟骨芽細胞特異的に Mir125b を過剰発現するトランスジェニックマウス (以下 Tg マウス) を作製したところ、破骨細胞数の減少と著明な骨量の増加が確認された。一方、miR-125b は骨粗鬆症患者において高値を示すことが報告されており、BMP1b を標的として骨芽細胞分化を抑制することが示唆されている。マウスの Mir125b は 9 番染色体と 16 番染色体にコードされる (Mir125b-1 と Mir125b-2) が、成熟 MIR125b-5p は両者共通であり、-3p は MIR125b-1-3p および MIR125b-2-3p の 2 種が存在する。そこで、MIR125b の骨代謝における生理的役割を明らかにするため、Mir125b-1 および Mir125b-2 ノックアウト(KO)マウスを作製した。本研究では、Mir125b-2 KO マウスについて主として骨形成機能について評価した。

Mir125b-2 KO マウスは野生型マウス (以下 WT マウス) と比較し、正常に出生し、雌雄ともに外観上特筆すべき所見を認めなかった。また、生後 3 週齢から 12 週齢までの体重変化は雌雄とも WT マウスと同等であった。Mir125b の発現プロファイルを確認するため、主要器官における pri-MiR125b-1、pri-MiR125b-2、MIR125b-5p および MIR125b-1-3p の発現レベルをリアルタイム RT-PCR により確認した。12 週齢の雄 WT マウスにおいて、pri-MiR125b-1 および pri-MiR125b-2 はいずれも脳と心臓で高いレベルを示し、次いで pri-MiR125b-1 は頭頂骨、骨格筋および脂肪組織、pri-MiR125b-2 は頭頂骨、精巣、肝臓および腎臓で検出された。一方、MIR125b-5p は頭頂骨、心臓および脳の発現レベルが高値であった。Mir125b-2 KO マウスの MIR125b-5p 発現レベルは、大腿骨、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、精巣において WT マウスよりも低値を示した。Pri-MiR125b-1 の発現レベルが高い心臓、脳に加え、大腿骨と頭頂骨の MIR125b-1-3p レベルを測定したところ、Mir125b-2 KO と WT マウスとの間に差は認めなかった。

次に 12 週齢雄マウス左側脛骨近位端の海綿骨について  $\mu$ CT 解析を行なったところ、骨量、骨密度、骨梁幅などの各種パラメータにおいて Mir125b-2 KO マウスと WT マウスとの間に差は認められなかった。さらに、同マウス右側脛骨の非脱灰標本を作製し、Villanueva 染色を施して骨形態計測を行なったところ、骨芽細胞数、石灰化速度をはじめとする各種パラメータは両マ

ウスの間で同等であった。

15 週齢雄 *Mir125b-2* KO および WT マウス大腿骨・脛骨から回収した骨髄細胞を低酸素下 (5%) で培養し、骨髄間質細胞を得た。間質細胞は骨分化培地 (アスコルビン酸、 $\beta$ -グリセロリン酸およびデキサメタゾンを含む) で骨結節が観察されるまで培養を継続した。培養終了後、細胞を固定し、ALP および von Kossa 染色を行い、骨結節を定量したところ、*Mir125b-2* KO 骨髄細胞は WT 骨髄細胞と比較して高値を示した。並行して培養した骨髄細胞から経時的に RNA を回収し、骨芽細胞分化マーカーおよび MIR125b-5p の発現レベルをリアルタイム RT-PCR で確認した。*Mir125b-2* KO 骨髄細胞の MIR125b-5p のレベルは WT よりも低値を示した。骨分化培地で培養した *Mir125b-2* KO 間質細胞の骨芽細胞マーカーは WT よりも高い値を示した。

以上の結果から、*Mir125b-2* KO は成熟雄マウスの個体レベルにおいて骨代謝に影響しないものの、*ex vivo* において間質細胞の骨芽細胞への分化が促進された。したがって、MIR125b-5p の発現レベルの低下は一定の条件下で骨形成を促進すると推測される。