

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 歯学 )	氏名	小笠原 伯宏
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 <i>Mir125b-2</i> deficiency in mice affects MIR125B-5p expression and ex vivo osteoblastogenesis (マウス <i>Mir125b-2</i> 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)			
論文審査担当者			
主査	教授	宿南 知佐	印
審査委員	教授	宮内 睦美	
審査委員	教授	吾郷 由希夫	
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>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。申請者の所属する研究室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、MIR125B 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、<i>Prdm1</i> 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 <i>Mir125b</i> 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、MIR125B 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、ヒト骨髄間葉系幹細胞の <i>BMPR1B</i> を標的とするなど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 <i>Mir125b</i> は 9 番染色体と 16 番染色体にコードされている (<i>Mir125b-1</i> と <i>Mir125b-2</i>)。成熟 MIR125B-5p は両者共通であるが、-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、<i>Mir125b-1</i> および <i>Mir125b-2</i> ノックアウトマウス (以下 KO マウス) を作製した。本論文では、<i>Mir125b-2</i> KO マウスの骨代謝機能について評価した。</p> <p><i>Mir125b-2</i> 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。<i>Mir125b</i> の発現プロファイルを確認するため、主要器官における <i>pri-Mir125b-1</i>、<i>pri-Mir125b-2</i>、MIR125B-5p、MIR125B-1-3p および MIR125B-2-3p 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、<i>pri-Mir125b-1</i> および <i>pri-Mir125b-2</i> はいずれも脳と心臓で高いレベルを示し、次いで <i>pri-Mir125b-1</i> は頭頂骨、骨格筋および脂肪組織、<i>pri-Mir125b-2</i> 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-1-3p および MIR125B-2-3p は共に頭頂骨で高い発現レベルを示した。<i>Mir125b-2</i> 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。これらの結果を踏まえ、心臓、脳を選択し、これに大腿骨と頭頂骨を加えて <i>pri-Mir125b-1</i>、<i>pri-Mir125b-2</i>、MIR125B-1-3p および MIR125B-2-3p の発現レベルを WT マウスと <i>Mir125b-2</i> KO マウスで比較した。その結果、<i>Mir125b-2</i> KO マウスの <i>pri-Mir125b-2</i> および MIR125B-2-3p はいずれにおいても有意に低値であったが、MIR125B-1-3p レベルは有意差を認めなかった。一方、<i>Mir125b-2</i> KO マウスの <i>pri-Mir125b-1</i> は心臓と大腿骨で有意に低値を示した。</p> <p>次に 12 週齢雄マウス左側脛骨近位端の海綿骨について <math>\mu</math>CT 解析を行なったところ、骨</p>			

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 マウスとの間に有意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、アルカリフォスファターゼおよび von Kossa 染色を行い、骨結節を定量したところ、*Mir125b-2* KO は WT と比較して高値を示した。並行して培養した骨髄間質細胞から経時的に RNA を回収し、骨芽細胞分化マーカーおよび MIR125B-5p、MIR125B-1-3p および MIR125B-2-3p の発現レベルをリアルタイム RT-PCR で確認した。その結果、MIR125B-5p および MIR125B-1-3p は *Mir125b-2* KO、WT 問わず、また WT の MIR125B-2-3p はいずれも骨髄細胞や大腿骨と比較して著しく高いレベルを示した。また、骨分化培地で培養した *Mir125b-2* KO 間質細胞の MIR125B-5p および MIR125B-2-3p は WT のような発現レベルの経時的増加を認めなかった。また、骨髄マクロファージを破骨細胞分化培地 (マクロファージコロニー刺激因子、Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand を含む) で培養し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ陽性の多核巨細胞数を計測したところ、*Mir125b-2* KO と WT の間に有意な差は見られなかった。骨髄マクロファージから回収した RNA を用い、MIR125B-5p、MIR125B-1-3p および MIR125B-2-3p の発現レベルをリアルタイム RT-PCR で確認した。MIR125B-5p および MIR125B-2-3p はいずれも *Mir125b-2* KO で有意に低値であり、MIR125B-1-3p のレベルは両者同等であったが、これらは WT の間質細胞と比較すると、いずれも極めて低いレベルであった。

以上の結果から、調査したマウスの主要器官において、*pri-Mir125b-1*、*pri-Mir125b-2*、MIR125B-5p、MIR125B-1-3p および MIR125B-2-3p もいずれも頭頂骨が高いレベルを示すことが明らかとなった。*Mir125b-2* KO マウスでは、大腿骨を含む多くの主要器官において MIR125B-5p の発現レベルが低値を示したが、*Mir125b-2* KO は脛骨の形態計測パラメータに影響しないことが示された。一方、*ex vivo* における骨髄間質細胞の MIR125B-5p および MIR125B-2-3p レベルは両ジェノタイプが同等に高値を示すものの、*Mir125b-2* KO では、WT のような骨芽細胞分化に伴う発現上昇が見られず、高い骨芽細胞分化能を示すことが明らかとなった。したがって、*Mir125b-2* KO は一定の条件下で骨形成の促進に参与すると推測される。今後、病態モデルにおいて、*Mir125b-2* KO の影響を精査することが必要であると考えられる。

よって審査委員会委員全員は、本論文が小笠原伯宏に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。