

学 位 論 文 全 文 の 要 約

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)

マイクロ RNA (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、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、*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 *BMPR1B* を標的とするなどして骨芽細胞分化を抑制することが唆されている。マウス *Mir125b* は 9 番染色体および 16 番染色体にコードされており (*Mir125b-1* および *Mir125b-2*)、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、本研究では、*Mir125b-2* ノックアウトマウス (以下 KO マウス) を作製し、主要器官/組織における *Mir125b* 転写産物の発現をプロファイリングするとともに、*Mir125b-2* KO の骨代謝への影響を評価した。

Mir125b-2 KO マウスは CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により作製した。*Mir125b-2* KO マウスは雌雄ともに野生型マウス (以下 WT マウス) と比較して外観上特筆すべき所見を認めなかった。*pri-MiR125b-1*、*pri-MiR125b-2*、MIR125B-5p、MIR125B-1-3p および MIR125B-2-3p の発現をリアルタイム RT-PCR により確認した。WT マウス (12 週齢雄) において、*pri-MiR125b-1* および *pri-MiR125b-2* の発現はいずれも脳および心臓で高く、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、成熟 MIR125B はいずれも頭頂骨、心臓および脳の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、腎臓などにおいて WT マウスよりも低値を示したが、頭頂骨、脳などは WT と同等であった。そこで、WT および *Mir125b-2* KO マウスの心臓、脳、大腿骨および頭頂骨について、*pri-MiR125b-1*、*pri-MiR125b-2*、MIR125B-1-3p および MIR125B-2-3p の発現レベルを比較した。*Mir125b-2* KO マウスの *pri-MiR125b-2* および MIR125B-2-3p はいずれにおいても低値を示し、MIR125B-1-3p レベルに差は認められなかった。

Mir125b-2 KO の骨代謝への影響を評価するため、WT および *Mir125b-2* KO マウス (12 週齢

雄) 脛骨近位端海綿骨のマイクロコンピュータ断層撮影 (μ CT) 解析および非脱灰標本による骨形態計測を行なった。その結果、骨量、骨密度、骨梁幅、骨芽細胞数、石灰化速度などの各種パラメータに差は認められなかった。さらに、両マウス (15 週齢雄) 大腿骨・脛骨骨髓細胞から得られた間質細胞を骨分化培地 (アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸およびデキサメタゾンを含む) で培養した。その結果、*Mir125b-2* KO 細胞では、アルカリフォスファターゼおよび von Kossa 染色陽性の骨結節が WT よりも多く、これと一致して骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現レベルも亢進していた。MIR125B-5p、MIR125B-1-3p ならびに MIR125B-2-3p の発現をリアルタイム RT-PCR で確認したところ、間質細胞の MIR125B-5p および MIR125B-1-3p レベルは *Mir125b-2* KO に関わらず、骨髓細胞や大腿骨と比較して著しく高値であった。WT の MIR125B-2-3p も同様に間質細胞で高い発現レベルを示した。骨分化誘導した *Mir125b-2* KO 細胞においては、WT 細胞に認められる MIR125B-5P および MIR125B-2-3p レベルの上昇が確認できなかった。上記骨髓細胞由来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- κ 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 の間に差は見られなかった。

以上の結果から、マウス *Mir125b* 転写産物は主要器官/組織において異なる発現プロファイルを示し、成熟 MIR125B はいずれも頭頂骨において高値であることが明らかとなった。MIR125B-5p および MIR125B-2-3p はともに *Mir125b-2* KO マウスの多くの器官/組織で低値を示すが、頭頂骨あるいは脳の MIR125-5p レベルに変動は見られず、*Mir125b-2* の機能的特異性が示唆された。*Mir125b-2* KO は脛骨の形態計測パラメーターに影響しないものの、骨分化誘導した *Mir125b-2* KO 骨髓間質細胞の骨芽細胞分化と骨結節の形成を促進すると推測される。*Mir125b-2* KO は骨髓間質細胞の骨芽細胞分化に関与するものの、その影響は限定的と考えられる。