

論文内容要旨

MIR125B-5p Derived from the *Mir125b-1* Gene
Negatively Regulates Osteoblast Differentiation
(Mir125b1 由来 miR-125b-5p は骨芽細胞分化を負に
制御する)

The journal of Hiroshima University Dental Society,
2023, in press.

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：寺山 隆司教授
(医系科学研究科 顎顔面解剖学)
副指導教員：内藤 真理子教授
(医系科学研究科 口腔保健疫学)

大頭 慎太郎
(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【諸言】

骨粗鬆症は、骨代謝のアンバランスによる骨の質と量の低下によって引き起こされ、閉経後の女性や高齢者に多く見られる。マイクロ RNA(miRNA)は、標的となるメッセンジャーRNAに結合することでタンパク質翻訳を抑制し、細胞の増殖、分化や癌の抑制などの多種多様な生命現象の制御に寄与している。骨の恒常性維持には、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の均衡が必要とされる。骨芽細胞の分化制御機構においても様々な miRNA が関与することが報告されており、骨疾患治療のターゲット分子として期待されている。先行研究では、骨粗鬆症患者において MIR125B-5p の発現が上昇していることが報告されており、MIR125B-5p の機能獲得または喪失は、マウス骨髄ストローマ細胞由来細胞株である ST2 細胞における骨芽細胞分化を阻害または亢進することが明らかとなっている。しかしながら、この MIR125B-5p は、2 つの主要な遺伝子 (*Mir125b-1* と *Mir125b-2*) によってコードされており、骨分化制御に関与する MIR125B-5p がどちらの前駆体から生成されているかは全く不明である。そこで私は、CRISPR-Cas9 System を用いて、2 つの遺伝子、*Mir125b-1* ノックアウト(以下 KO1)および *Mir125b-2* ノックアウト(以下 KO2) ST2 細胞を樹立し、これら 2 つの miRNA から主要な骨形成制御因子を同定した。

【材料と方法】

1. CRISPR-Cas9 System を用いた KO1 および KO2 細胞の樹立

ST2 細胞に対して Cas9 タンパクと guideRNA (*Mir125b-1* と *Mir125b-2* 遺伝子のコード領域を標的とする)を Lipofectamine CRISPRMAX 試薬を用いてトランスフェクトし、バルク細胞からのゲノム DNA は、GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit を用いて変異の検出を確認した。次に、バルク細胞から限界希釈法によりシングルセルクローンを樹立した。各クローンの pri-Mir125b-1 と pri-Mir125b-2 を定量し、標的遺伝子のノックアウトを判定した。

2. KO1 および KO2 細胞における MIR125B-5p 発現量解析実験

骨芽細胞分化は、増殖培地(10%FBS を含む α -MEM)を骨芽細胞分化培地 (50 μ g/mL ascorbic acid, 20 mM β -glycerophosphate, and 20 mM bone morphogenetic protein-2 を含む増殖培地)に交換、培養することで誘導した。培養後の細胞から総 RNA を単離し、TaqMan miRNA assay を用いて MIR125B-5p の発現レベルを定量した。

3. KO1 細胞の骨芽細胞分化関連遺伝子発現、ALP 定量および von Kossa 染色

骨芽細胞分化における *Mir125b-1* ノックアウトの影響を明らかにするために、ALP 活性測定キットを使用して ALP 定量を行った。骨芽細胞分化関連遺伝子発現については ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて cDNA を合成し、THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix を用いて qPCR を行った。また、細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、von Kossa 染色を行った。

4. KO1細胞に対する MIR125B-5p mimic レスキュー実験

Mir125b-1 由来の MIR125B-5p が骨芽細胞分化関連遺伝子制御の関与について解析するために、KO1 細胞に RNAiMAX 試薬を用いて、MIR125B-5p mimic をトランスフェクトし、骨分化関連遺伝子の RT-qPCR 解析および von Kossa 染色を行った。

【結果】

1. 樹立した各シングルクローンの pri-MiR125b-1 および pri-MiR125b-2 発現レベルを定量したところ、それぞれのターゲットで PCR 産物が検出されないクローンが確認された。この結果は、*Mir125b-1* および *Mir125b-2* ノックアウト細胞クローンが樹立されたことを示した。
2. 増殖培地中で培養した KO1 細胞の MIR125B-5p 発現レベルは、NC 細胞と比較して有意に低下したが、KO2 細胞では変化が見られなかった。したがって、ST2 細胞における MIR125B-5p の発現は、主に *Mir125b-1* 遺伝子に由来することを示した。
3. KO1 細胞と NC 細胞の間で ALP レベルに有意差は観察されなかった。一方、bone sialoprotein (Bsp) や bone gamma-carboxyglutamate protein (Bglap) などの骨芽細胞マーカーの遺伝子発現レベルは、分化誘導 10 日目に有意に増加した。MIR125B-5p の標的遺伝子である Core-binding factor subunit beta (Cbfb) は、骨分化の活性化因子として関与している。我々は、KO1 細胞で Cbfb 発現レベルの増加を観察した。von Kossa 染色では KO1 細胞では NC 細胞よりも陽性染色面積が約 3 倍増加した。したがって、*Mir125b-1* は後期骨形成分化遺伝子を負に制御している可能性が示された。
4. RT-qPCR の結果、MIR125B-5p の発現レベルは MIR125B-5p mimic をトランスフェクトした KO1 細胞の発現レベルと比較して有意に増加していた。MIR125B-5p 発現量を回復させると、上昇した骨芽細胞分化遺伝子が減少し、MIR125B-5p の直接標的遺伝子である Cbfb の発現レベルも低下した。さらに、MIR125B-5p mimic をトランスフェクトすると、コントロールの NC mimic と比較して、骨芽細胞の石灰化が阻害された。したがって、*Mir125b-1* 由来の MIR125B-5p は、骨芽細胞分化を抑制することが強く示唆された。

【考察・結論】

私は、CRISPR-Cas9 System を用いて、マウス骨髄間質細胞株 ST2 細胞から *Mir125b-1* および *Mir125b-2* ノックアウト細胞を樹立し、*Mir125b-1* 遺伝子から生成される MIR125B-5p が骨芽細胞分化の制御に主要な役割を果たしていることを実証した。