

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21040

研究課題名（和文）miR-125bが担う骨代謝機能の解析と矯正歯科治療への応用の可能性

研究課題名（英文）Analysis of the bone metabolic function of miR-125b and its potential application in orthodontic treatment

研究代表者

小笠原 伯宏（Ogasawara, Tomohiro）

広島大学・病院（歯）・歯科診療医

研究者番号：20964125

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規作用機序に基づく骨代謝制御治療薬へとつながる知見を得るために、異なる経路で骨芽細胞と破骨細胞両方の分化を制御しているmiR-125bの骨代謝における生理的意義を解明することを目的とした。初年度では、交配により骨芽細胞特異的miR-125b-1欠損マウス(miR-125b-1fl/fl;Col1a1-Cre/mice)の作製を進めた。次年度では、得られたmiR-125b-1fl/fl;Col1a1-Creマウスの成長を観察し、生後12週齢で屠殺しサンプルとして大腿骨及び脛骨を回収した。脛骨をマイクロCTにて撮影し骨の表現型の確認を行なった。大腿骨よりRNAを抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞が分泌する基質小胞中に含まれるmiR-125bは破骨細胞の分化を抑制するが、内在性のmiR-125bは間葉系細胞や骨髄ストローマの骨芽細胞分化を抑制するといった報告もあり、miR-125bは多様な機能を持つと推定される。本研究では、Col1a1を発現する細胞でのみmiR-125b-1を欠損させたが、現状の結果では骨の表現型に影響は認めなかった。miR-125bの骨代謝における機能を解明することは歯槽骨の吸収と添加を繰り返す歯の移動において重要な知見であり、また新規作用機序に基づく骨代謝制御治療薬へとつながる知見でもあることから、社会的にも必要な意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the physiological significance of miR-125b in bone metabolism, which regulates the differentiation of both osteoblasts and osteoclasts via distinct pathways, in order to gain insight into novel mechanism of bone metabolism regulating therapeutics. In the first year, osteoblast-specific miR-125b-1-deficient mice (miR-125b-1fl/fl; Col1a1-Cre/mice) were generated by crossbreeding. In the following year, the growth of the miR-125b-1fl/fl;Col1a1-Cre mice was monitored and the femur and tibia were slaughtered at 12 weeks of age and collected. The tibiae were taken by micro-CT to confirm the bone phenotype. RNA was extracted from the femur.

研究分野：骨代謝

キーワード：マイクロRNA miR-125b 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は遺伝子発現の下方制御を介して様々な場面の細胞活動に関与するが、少なくとも一部はエクソソームを介して受容細胞の遺伝子発現を調節する (Nat Cell Biol, 2007)。本研究課題の研究協力者は、骨芽細胞由来の細胞外分泌小胞の 1 つである基質小胞が破骨細胞形成を阻害し、その作用は基質小胞に内包されるマイクロ RNA、とりわけ miR-125b が介在することを発見した (Commun Biol, 2020)。一方、miR-125b は間葉系幹細胞ないしは骨髄ストローマの骨芽細胞分化を早期に抑制するとの報告が複数 (Biochimie, 2014; Cell Physiol Biochem, 2017) あり、骨粗鬆症との関連も示唆されている (J Bone Miner Res, 2014)。以上から miR-125b は多様な機能を持つと推定されるが、この miR-125b が介在する骨代謝制御機構の全容は未だ解明に至っていない。

2. 研究の目的

別々の経路で破骨細胞と骨芽細胞の両方の分化を制御している miR-125b の骨における生理的意義を明らかにすることを目的とした。これは歯槽骨の吸収と添加をくり返す歯科矯正学的な歯の移動において重要な知見となり、新たな作用機序に基づく骨代謝制御治療薬の開発へとつながると考えている。

3. 研究の方法

miR-125b は、2 つの遺伝子座から (マウスでは 9 番および 16 番染色体に由来する miR-125b-1 と miR-125b-2) 独立して発現する (<http://www.mirbase.org/>) ため、本研究代表者らはそれぞれのノックアウトマウス (KO マウス) を作製した。miR-125b-2 KO マウスでは骨での表現型は認めなかった。miR-125b-1 KO マウスは発生初期段階で発生が停止したため、骨の表現型解析が行えなかった。そこで、胎生致死を回避するために miR-125b-1 コンディショナルノックアウトマウスを用いることとした。

まず、骨芽細胞特異的 miR-125b-1 欠損マウス (miR-125b-1^{fl/fl}; Col1a1-Cre/mice) を Cre/loxP システムを利用してマウスを作製する。成長を観察し、成体と考えられる 12 週齢時に大腿骨を含む各種臓器及び頭頂骨より回収した骨芽細胞を回収し、RNA を抽出後 miR-125b 発現レベルの確認を行う。回収した脛骨をマイクロ CT にて撮影後、脱灰切片、非脱灰切片を作製し骨形態計測を行う。生体での表現型を解析したのちに、マウス長管骨より骨髄細胞を回収し、骨芽細胞分化及び骨形成能の検討及び miR-125b ミミックを用いたレスキュー実験を行い、細胞レベルでの表現型の解析を行う。

4. 研究成果

(1) 初年度に miR-125b-1^{fl/fl}; Col1a1-Cre/マウスの交配を開始したが、妊娠兆候が得られなかった。そこで凍結受精卵より新たな Col1a1-Cre マウスを確保し、再度交配を開始したところ、次年度にようやく目的の miR-125b-1^{fl/fl}; Col1a1-Cre/マウスを得ることが可能となった。4 週齢で尻尾から DNA を回収し、PCR、電気泳動にて遺伝子型を確認したところ、予定通りの遺伝子の欠損を確認できた。

(2) miR-125b-1^{fl/fl}; Col1a1-Cre/マウスの成長を成体と考えられる 12 週齢まで観察したが、正常に出生、発育した。12 週齢で屠殺し、大腿骨、脛骨を含む各種臓器を回収した。骨での表現型の有無を確認するために、脛骨をマイクロ CT にて撮影し、骨形態計測を行なった。海綿骨及び

皮質骨の解析において、骨密度を含む各種パラメータにおいて、自然型マウス（WT マウス）と比較して統計的に有意な差は認めなかった（図1）。

(3) 現在大腿骨から回収したRNA を用いて miR-125b の発現量を確認している段階である。ここで仮に統計的に有意な差が認められなかった際には、骨芽細胞特異的に miR-125b-1 を欠損させても生体レベルでは骨に統計学的に有意な表現型は見られないと考え、より全身的に Cre リコンビナーゼを発現する ERT2-Cre マウスと miR-

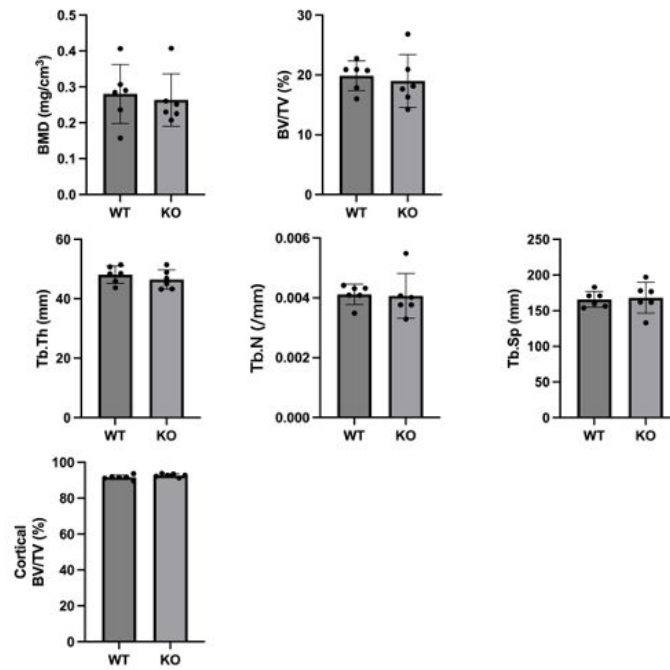


図1 脛骨のμCT解析パラメータ

125b-1^{fl/fl} マウスを交配することで miR-125b-1 欠損マウス (miR-125b-1^{fl/fl};ERT2-Cre/mice) を作製し、胎生致死を回避した上で全身的な miR-125b-1 を欠損させた状態の骨の表現型の解析を行うことが必要となる可能性がある。当初は研究開始までの初見から、骨においては miR-125b-2 よりも miR-125b-1 が優位に機能すると推察しており、骨芽細胞特異的に miR-125b-1 を欠損させることで何らかの表現型がみられると考えていたが、実際には WT マウスと比較しても表現型に変化がない可能性があり、生体内の恒常性維持機構が働いている可能性が考えられる。

上記のように miR-125b の担う骨制御機能の全容については未だ解明されていないため、今後も研究を継続し、その生理的意義を明らかにすることは学術的に大変意義があると考えている。研究成果をさらに得たのちに学会発表および論文作成を進めていく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------