

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19268

研究課題名（和文）骨基質小胞中microRNAによる骨代謝調節機構の解明と効率的歯牙移動への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of bone metabolism regulation by microRNA in MVs and its application to efficient tooth movement

研究代表者

中尾 裕子（Nakao, Yuko）

広島大学・医系科学研究科（歯）・研究員

研究者番号：50806685

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：miR-125bの骨代謝への関与を調べるため、骨芽細胞特異的miR-125b過剰発現（Tg）マウスおよび野生型（WT）マウスの頭頂骨細胞由来細胞を培養したところ、Tgマウス由来基質小胞はWTマウス由来基質小胞と比較してmiR-125bレベルが高かったが、骨芽細胞分化および石灰化には影響しなかった。また、両マウスを用いた骨折モデル実験では、仮骨形成（骨折後2週）に差はみられず、その後、破骨細胞数の減少を伴う仮骨吸収遅延が認められた。以上の結果から、骨芽細胞由来miR-125bの骨基質内レベルは破骨細胞形成に関与して骨折治癒過程に影響することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

補綴前処置のために矯正歯科治療を希望する患者は増加している。しかし、それらの患者の中には、骨粗鬆症や歯周病など骨代謝のバランス崩壊による骨溶解を伴う疾患を持つ者も多い。超高齢化にともない、今後一層その規模は拡大していくことが予想される。本研究では、骨芽細胞形成におけるmiR-125bの影響を明らかにすることでmiR-125bの骨リモデリングにおける機能を解明することを目的とした。また、基質小胞を媒体としたmiRNAのDDSの確立を行うと共に、骨代謝疾患に対する基質小胞を介したmiR-125bの治療薬としての可能性を検討することで、安全で効率的な新規矯正歯科治療法の確立を目指した。

研究成果の概要（英文）：To evaluate the involvement of miR-125b on bone metabolism, calvarial cells were collected from osteoblast-specific miR-125b-overexpressing (Tg) mice and wild-type (WT) mice and cultured. The level of miR-125b in Tg-derived matrix vesicles (MVs) was higher than that in WT-derived MVs, but there were no differences in the osteoblast differentiation and the matrix mineralization in both genotypes. In the bone fracture model, there was no difference in the callus formation (2 weeks after the fracture), but the callus resorption was a delay with decreased osteoclast numbers in Tg mice. Taken together with these results, it is suggested that the levels of miR-125b in the bone matrix may affect the process of bone healing by altering osteoclastogenesis.

研究分野：歯科

キーワード：miR-125b miRNA 骨芽細胞分化 基質小胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

補綴前処置や歯周病予防のために矯正歯科治療を希望する患者は増加している。しかしながら、それらの患者の中には、骨粗鬆症や、歯周病など骨代謝のバランス崩壊による骨溶解を伴う疾患を持つ者も多い。超高齢化にともない、今後一層その規模は拡大していくことが予想され、対応策や治療法の確立が急務である。

骨代謝は骨芽細胞、骨細胞と破骨細胞によって相互に調節されており、骨疾患の治療においてこれら細胞間コミュニケーションを理解することは極めて重要である。近年、miRNA などのノンコーディング RNA が特定遺伝子の発現制御を行うことで、様々な生物学的プロセスを制御することが分かってきた。少なくとも一部の miRNA はエクソソームなどの微小胞に内包され、標的細胞に送達された後、特定遺伝子の発現を制御することが報告されている (Front Biosci, 4, 2012)。私たちは、骨芽細胞などの細胞膜から放出される微小胞 (基質小胞) に多数の miRNA が内包されることを突き止め、そのうち miR-125b が選択的に破骨細胞の形成を抑制することを見出した (Minamizaki et al, Commun Biol, 2020)。骨芽細胞で miR-125b を高発現するトランスジェニック (miR-125b^{obl}) マウスを作製し、miR-125b^{obl} マウスと同腹の WT の頭蓋、椎骨、大腿骨、脛骨を μ CT で解析したところ、WT マウスと比較し、miR-125b^{obl} の骨量が著しく増加していることが判明した (Minamizaki et al, Commun Biol, 2020)。miR-125b^{obl} マウスは WT と体躯、体重に差はなく、性差も確認できなかった。これらの結果から、我々は、基質小胞をカーゴとして骨基質に放出された miR-125b が介在する骨芽細胞 - 破骨細胞の新規細胞間コミュニケーション機構を推定するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞形成における miR-125b の影響を明らかにすることで miR-125b の骨リモデリングにおける機能を解明することを目的とした。また、miR-125b^{obl}/Venus マウスを用いて基質小胞を媒体とした miRNA の DDS の確立を行うと共に、骨代謝疾患に対する基質小胞を介した miR-125b の治療薬としての可能性を検討することで、安全で効率的な新規矯正歯科治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) miR-125b^{obl}/Coll1a1-Cre/Lyn-Venus マウスおよび miR-125b^{obl}/Coll1a1-Cre/Lyn-Venus 不死化細胞の作製および解析

これまでヘテロマウスで維持していた miR-125b^{obl} マウス、Coll1a1-Cre マウス (骨芽細胞特異的に Cre を発現するマウス)、および R26R-Lyn-Venus マウス (Cre 特異的に組換え反応が起こると細胞膜に蛍光タンパク質 Venus が局在するマウス) のホモ個体を作製し、これら 3 系統を交配して、miR-125b^{obl}/Coll1a1-Cre/Lyn-Venus および Coll1a1-Cre/Lyn-Venus マウス (いずれもホモ接合型) を作製した。

これらのレポーターマウス (3~5 日齢) より頭蓋冠を採取し、コラゲナーゼ/EDTA で連続的に消化して頭蓋冠細胞 (骨原生細胞) を回収した。この初代細胞をアスコルビン酸含有骨分化誘導培地にて培養し、アルカリフォスファターゼ (ALP) /von Kossa 染色により骨芽細胞分化能および石灰化能を検討した。

頭蓋冠細胞に Lenti-SV40 および Lenti-GFP (コントロール) をポリブレン法でトランスフェクションし、継代を繰り返して不死化細胞を選択後、クローニングを行った。不死化細胞を培養して基質小胞を超遠心法にて回収し、細胞および基質小胞での miR-125b レベルを確認した。

(2) WT マウスおよび miR-125b^{Obl} マウス由来骨髄間葉系細胞 (MSCs) の解析

WT マウスおよび miR-125b^{Obl} マウスの脛骨および大腿骨骨髄より MSCs を回収して上記骨分化誘導培地にて培養し、ALP/von Kossa 染色により骨芽細胞分化能および石灰化能を検討した。また、miR-125b レベルについて確認した。

(3) 骨粗鬆症歯牙移動モデルマウスの作製 (中止)

WT マウスおよび卵巣摘出による骨粗鬆症モデルマウスに、上顎切歯部と第一大臼歯 (M1) 間に Ni-Ti クローズドコイルスプリングを装着し、10gf の矯正力で M1 の牽引を行うことを計画したが、コイル装着が困難であった。また、代替え方法 (フロスに変更等) をいくつか (フロスに変更等) 実施したもののどれも確実な保定が困難であったため、実験を (4) に変更した。

(4) 骨折モデルマウスの作製および解析

麻酔下、WT マウスおよび miR-125b^{Obl} マウス (ヘテロマウス、10 週齢雄) の右大腿骨骨髄腔に遠位端から脊椎針を埋め込んだのち、大腿骨骨幹を歯科用ディスクカッターで切断して骨折モデルを作製した。骨折後 2・4・6・8 週における経過を骨形態学および組織学的に解析した。

4. 研究成果

(1) miR-125b^{Obl}/Col1a1-Cre/Lyn-Venus マウスおよび miR-125b^{Obl}/ Col1a1-Cre/Lyn-Venus 不死化細胞の作製および解析

初代培養 (不死化前) の miR-125b^{Obl}/Col1a1-Cre/Lyn-Venus 細胞および Col1a1-Cre/Lyn-Venus 細胞は ALP/von Kossa 染色において差がみられず、miR-125b の有無が骨芽細胞分化および石灰化に影響しないことが示唆された。

また、不死化細胞の miR-125b レベルは、細胞質では Col1a1-Cre/Lyn-Venus 細胞に比較して miR-125b^{Obl}/Col1a1-Cre/Lyn-Venus 細胞で高くなっていたものの、回収した基質小胞では両者同レベルであり、不死化 miR-125b^{Obl}/Col1a1-Cre/Lyn-Venus 細胞より miR-125b リッチな基質小胞を回収することができなかった。

(2) WT マウスおよび miR-125b^{Obl} マウス由来 MSCs の解析

miR-125b^{Obl} および WT マウス由来 MSCs の骨形成能や ALP 活性、ALPL および ANXA5 の発現レベルに差は認められなかった。一方、miR-125b^{Obl} 由来基質小胞では、WT と比較して高い miR-125b の発現レベルを示した。

(3) 骨粗鬆症歯牙移動モデルマウスの作製 (中止)

「3. 研究の方法」で記載の通り、実験を (4) に変更した。

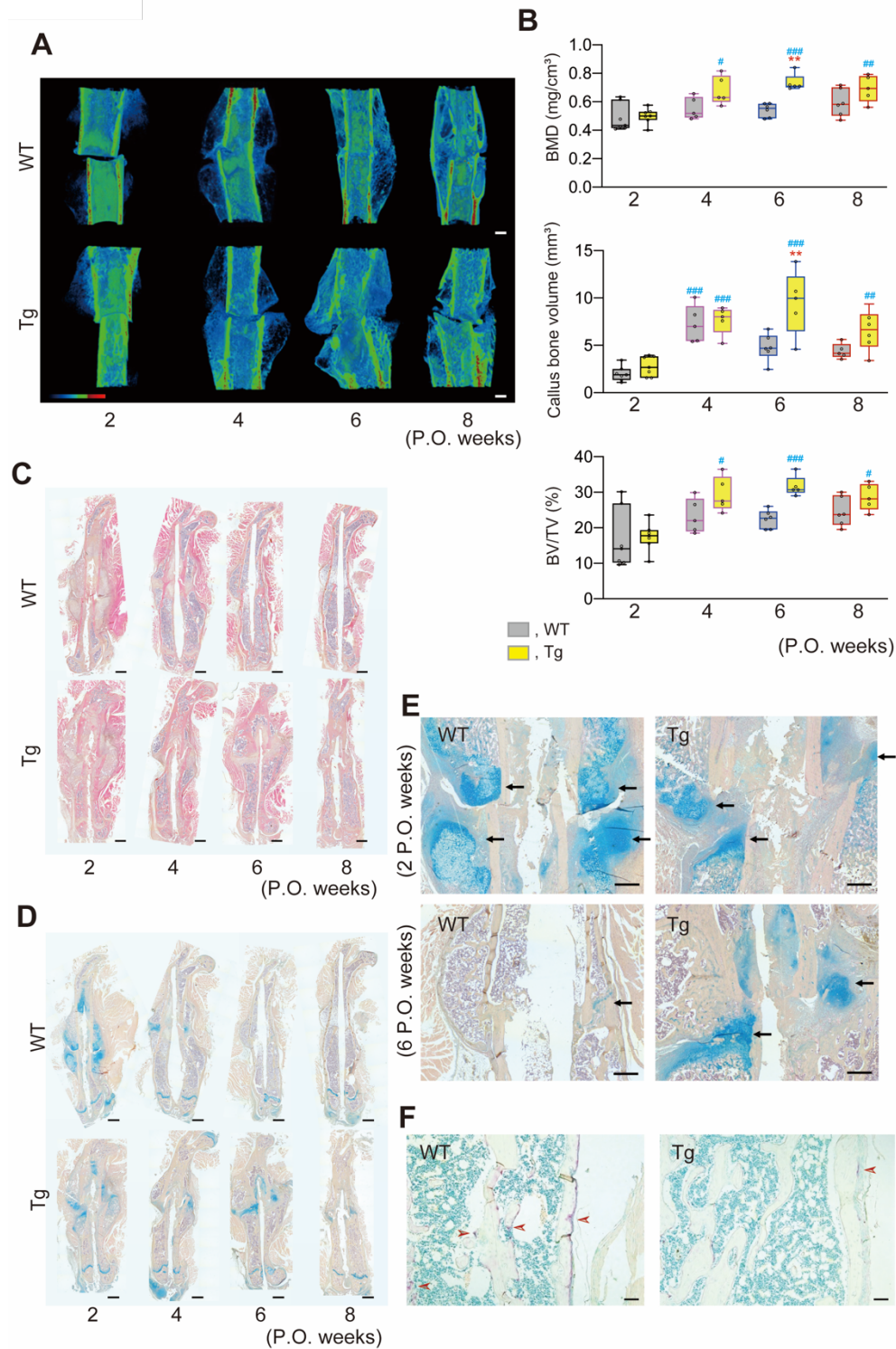
(4) 骨折モデルマウスの作製および解析

術後 2 週で両ジェノタイプとも仮骨形成が開始していた (図 A)。その後、WT マウスでは術後 6 週で仮骨吸収に伴う仮骨量の減少がみられ、8 週で治癒している個体が認められた。一方、miR-125b^{Obl} マウスでは 6 週以降も仮骨量が多く、術後 8 週でも骨折治癒はみられなかったことから、仮骨吸収の遅延が示唆された (図 A, B)。

組織学的解析においても、WT マウスでは一過性にできた軟骨や結合組織が術後 6 週で既に

骨に置換されていたが、miR-125b^{obl}マウスでは軟骨部分の豊富な仮骨の残存が認められた（図C,D,E）。また、miR-125b^{obl}マウスでは仮骨表面の破骨細胞の減少が認められた（図F）。このことから、骨芽細胞由来 miR-125b が過剰になると、骨折治癒に遅延が認められることが明らかとなった。

以上のとおり、本研究において、骨芽細胞由来 miR-125b の骨基質内レベルが骨折治癒過程に大きく影響することが明らかとなった。



A : μ CT 画像（3次元）。B : μ CT 解析。上から骨密度（BMD）、仮骨量、骨量/組織量。C : HE 染色。D : アルシアンブルー染色（弱拡大）。E : アルシアンブルー染色（強拡大）。矢印, 軟骨。F : TRAP 染色。矢頭, TRAP 陽性多核細胞（破骨細胞）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minamizaki Tomoko, Nakao Yuko, Irie Yasumasa, Ahmed Faisal, Itoh Shota, Sarmin Nushrat, Yoshioka Hiroataka, Nobukiyo Asako, Fujimoto Chise, Niida Shumpei, Sotomaru Yusuke, Tanimoto Kotaro, Kozai Katsuyuki, Sugiyama Toshie, Bonnelye Edith, Takei Yuichiro, Yoshiko Yuji	4. 巻 3
2. 論文標題 The matrix vesicle cargo miR-125b accumulates in the bone matrix, inhibiting bone resorption in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0754-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------	---------