The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Osteoblast-derived vesicles induce a switch from bone-formation to bone-resorption in vivo
Author(s)	Uenaka, Maki
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/89466
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	上中　麻希
論文題名 Title	Osteoblast-derived vesicles induce a switch from bone-formation to bone-resorption in vivo （骨芽細胞由来の細胞外小胞は骨形成期から骨吸収期への相転換に関与する）

論文内容の要旨(Abstract of Thesis)

〔目　的(Purpose)〕

骨は全身の様々な場所において絶えず新しく造りかえられ、骨形態の維持、ミネラルバランスの維持、造血の場の提供など様々な役割を果たしている。この骨の代謝は「リモデリング」という一連の流れを繰り返し、その恒常性を維持している。リモデリングは数週間に渡る破骨細胞による骨吸収の後、数カ月をかけて骨芽細胞による骨形成が行われる。これまで骨吸収期から骨形成期へのシグナルはこれまで様々な分子が同定されてきたが、数カ月続く骨形成期がどのように完了し、次の骨吸収期へどのような因子が関与しているのか未だ不明な点が多い。本研究では骨芽細胞の動態観察から骨形成期を制御するメカニズムの解明を目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

骨芽細胞をECFPで標識したトランスジェニックマウス（Col2.3-ECFP）の頭頂部を多光子励起顕微鏡で生きたまま観察した。結果、成熟骨芽細胞は小胞を放出し、近傍の成熟骨芽細胞が小胞を取り込む様子が観察された。骨芽細胞間で小胞を介したコミュニケーションが存在することが明らかとなった。次に培養骨芽細胞から小胞を回収し、分化段階にある培養骨芽細胞に投与したところ、骨芽細胞分化のマスター遺伝子である*Runx2*の発現低下を認め、石灰化に必要なアルカリフォスファターゼ活性が抑制された。また小胞の投与を受けた骨芽細胞は破骨細胞分化誘導に必須である*Rank1*の発現上昇を認め、破骨前駆細胞との共培養において、成熟破骨細胞への分化を促進した。また、マウス頭頂骨に作成した両側骨欠損の片側に小胞を含んだハイドロゲル、反対側にPBSを含んだハイドロゲルを投与したところ、小胞投与群では優位に治癒が遷延した。以上より骨芽細胞由来の小胞は、取り込んだ骨芽細胞の分化を抑制し、破骨細胞分化誘導能を上昇させた。

次にそのメカニズムを解明するため、骨芽細胞由来細胞外小胞に含まれるmiRNAを網羅的に解析した。発現量の多かったmiRNAのうちmiR-143-3pを骨芽細胞に強発現させたところ、小胞投与と同様に骨芽細胞の分化抑制、破骨細胞分化誘導能の上昇を認めた。miR-143-3pの骨芽細胞における作用のターゲット遺伝子として、Runx2の安定と機能に寄与する遺伝子である*Cbfb*に着目し、ルシフェラーゼアッセイを用いてそのmRNAとの結合を確認した。siRNAによる*Cbfb*のノックダウンでは、miR-143-3pの機能と同様に*Runx2*と*Sp7*の発現が抑制された。また小胞を投与した骨芽細胞では*Cbfb*の発現が優位に低かった。また、内在性のmiR-143-3pを標識することで、骨芽細胞由来の小胞にmiR-143-3pが含まれていることを確認し、その小胞が別の骨芽細胞に取り込まれたことを共焦点顕微鏡で確認した。以上より、骨芽細胞由来の小胞にはmiR-143-3pが含まれており、レシピエント細胞の*Cbfb*の発現を抑制することで、骨芽細胞分化を抑制していることが示唆された。次にmiR-143の骨代謝への影響を知るため、miR-143/145の骨芽細胞特異的欠損マウスを作成し骨形態計測を行なった。結果ノックアウトマウスにおいて、定常状態では骨量増加および骨形成マーカーの上昇がみられ、副甲状腺ホルモン投与による高骨代謝回転下では骨吸収パラメーターの減少を認めた。これらの結果は小胞が骨芽細胞分化抑制、破骨細胞分化促進に働くの矛盾しない結果であった。さらにノックアウトマウス由来の培養骨芽細胞からmiR-143欠損小胞を回収し、骨芽細胞に対する効果を検証した結果、miR-143欠損小胞は、野生型小胞による*Runx2*の発現抑制、*Rank1*の発現促進作用をキャンセルした。またマウス頭蓋骨欠損モデルにおいて、miR-143欠損小胞は、野生型小胞投与においてみられた治癒遷延をキャセンルした。以上よりmiR-143を含む骨芽細胞由来小胞は骨芽細胞の分化抑制、破骨細胞分化促進に寄与することが示された。

〔総　括(Conclusion)〕

骨芽細胞間の細胞外小胞を介したコミュニケーションは、骨形成を抑制し、破骨細胞分化を促進することで、骨形成期から次期骨吸収期への制御因子となり得ることを示した。そのメカニズムとして、小胞に含まれるmiR-143が寄与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　上中　麻希

		（職）	氏　　名	
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	石井 優	印
	副　査	大阪大学教授	竹田 潔	印
	副　査	大阪大学教授	河原 行郎	印

論文審査の結果の要旨

骨は骨吸収と骨形成を繰り返し「骨代謝」を行うことで骨格の維持やミネラルバランスの調整など重要な役割を果たしている。これまで骨吸収期から骨形成期へのシグナルはこれまで様々な分子が同定されてきたが、骨形成期から骨吸収期への制御機構については未だ不明な点が多い。本研究ではこの制御機構を解明するため、骨芽細胞のレポーターマウス頭頂骨の生体イメージングを行なった。結果、細胞外小胞を介した骨芽細胞間のコミュニケーションが存在することが明らかとなった。培養骨芽細胞より単離した細胞外小胞は、骨芽細胞に取り込まれることで、骨芽細胞の分化を抑制し、破骨細胞分化を促進した。またそのメカニズムとして小胞に含まれるmiR-143が寄与することが、miRNAの網羅的解析およびノックアウトマウスを用いた解析より示唆された。本研究により、細胞外小胞を介した骨芽細胞間ネットワークが、骨形成期から骨吸収期への制御因子として働くことが示唆された。

以上の研究は、博士（医学）の学位授与に値する。