

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10396

研究課題名(和文) 腱細胞培養系を用いた新規マイクロRNAの同定と腱細胞分化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of novel microRNA and elucidation of tenocyte differentiation mechanism using tenocyte culture system

研究代表者

林 正徳 (Hayashi, Masanori)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：20624703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、マイクロRNA(miRNA)が細胞の分化において重要な役割を担っていることが報告されているが、腱細胞に特異的なmiRNAは未だ同定されていない。本研究では先行研究において確立した腱細胞培養系を用い、腱細胞分化を制御する新規miRNAの同定および機能解析を行った。その結果、分化誘導直後に発現量が低下するmiR-675-3pが腱細胞分化を促進する作用を持ち、その標的遺伝子候補として検出されたMef2aとMef2cの発現を抑制していることが明らかとなった。本研究結果からmiR-675-3pがMef2aとMef2cの発現を抑制することにより、腱細胞分化を正に制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, microRNAs(miRNAs) have been emerged as important regulators in cell differentiation. However, miRNAs which regulate tenocyte differentiation have not been identified. In this study, we used a tenocyte culture system established in our previous study to identify and characterize new miRNAs that control tenocyte differentiation. Our study revealed that miR-675-3p, the expression of which decreases immediately after induction of differentiation, has the effect of promoting differentiation of tenocytes, suppressing the expression of Mef2a and Mef2c detected as its target gene. Our results suggest that miR-675-3p suppresses the expression of Mef2a and Mef2c, whereby controlling tenocyte differentiation.

研究分野：整形外科

キーワード：腱細胞 マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

手指の屈筋腱 zone2 損傷は No mand's land と称され治療成績は不良であった。その後、縫合後早期運動療法の導入、腱の自己治癒能力 (intrinsic healing) の証明、抗張力に優れた腱縫合法の開発、そして腱・腱鞘間の摩擦力の解明などの基礎研究により、その成績は向上してきた。しかし、これら最新の方法を取り入れた我々の成績においても、依然として 15% に成績不良例があり、術後に数週間複雑な後療法を要した。そこで屈筋腱 zone2 損傷治療成績向上のブレイクスルーを得るには、従来の生体力学的ではない新たなアプローチとして腱細胞の分化メカニズムを分子生物学レベルで解明し治療に応用する方法が模索されるべきである。

2008 年以降、骨、軟骨、筋肉など腱以外の間葉系組織に特異的なマイクロ RNA (miRNA) があいついで同定され、miRNA がそれらの組織における細胞の分化・増殖をコントロールしていることが明らかにされた。他組織と同様、miRNA が腱細胞の分化・増殖に重要な役割を果たしていることが予想されるが、腱細胞に特異的な miRNA は未だ同定されていない。

以上の背景より、我々は *in vitro* で腱細胞の分化を観察できる培養系の確立と同培養系を用いた新規 miRNA の同定を目的とした先行研究を行い、以下の結果を得た。

(1) マウス筋芽細胞株 (C2C12) を無血清下で培養し、GDF8 (Myostatin) による刺激を加えることにより腱細胞分化マーカーである Tenomodulin の発現が上昇し腱細胞分化が誘導された (図 1)。

(2) Myostatin 下流のシグナル伝達経路の中から、Smad2/3 を介したシグナル伝達経路が腱細胞の分化に最も重要であることを明らかにした (図 2)。

(3) 本培養系を用いてマイクロアレイによる腱細胞分化に關与する miRNA のプロファイリングを行った結果、計 8 つの miRNA の発現が分化誘導後 5 日目に上昇していることを確認し、複数の miRNA の標的遺伝子候補として Smad7 と Tubulin polymerization-promoting protein 3 (Tpp3) を同定した。

マウス筋芽細胞株 C2C12 は腱前駆細胞に特異的な転写因子である Scleraxis を発現していること、発生学および解剖学的にも同細胞から腱細胞への分化は生体内でも十分起こりうる現象であることなどから、先行研究において我々の確立した培養系は腱細胞分化を観察する上で有用であると考えた。また Myostatin は筋芽細胞から筋細胞への分化を抑制するサイトカインであることは知られていたが、先行研究の結果、Smad2/3 シグナルを介して筋芽細胞から腱細胞への分化を促進する作用を持つことが明らかとなったことから、Smad2/3 シグナルの抑制作用

を持つ Smad7 が miRNA により抑制され、腱細胞への分化が促進される機序の存在が示唆された (図 3)。また Tpp3 は腱のエピテリオンや腱鞘滑膜の未分化な細胞に発現している可能性があり、C2C12 においても発現が確認されていることから、miRNA の標的遺伝子であると同時に腱の治療過程において組織修復に関わる腱前駆細胞の新たなマーカーとなる可能性が示唆された。

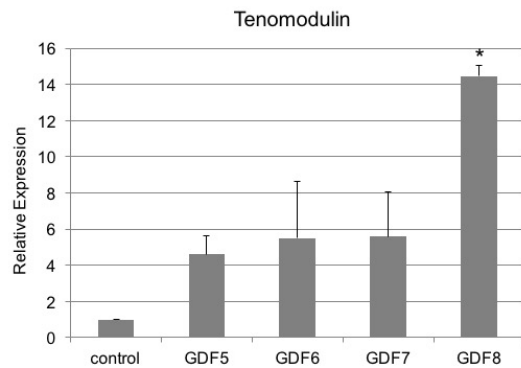


図 1 GDF8 (Myostatin) は Tenomodulin の発現を最も効率的に促進する

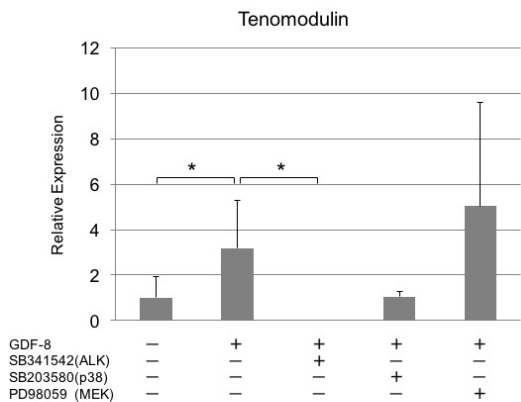


図 2 Smad2/3 を介したシグナルの抑制により Tenomodulin の発現は抑制される

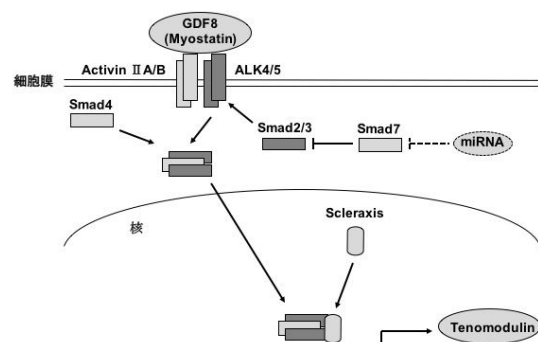


図 3 Smad2/3 を介した細胞内シグナル伝達

## 2. 研究の目的

本研究は、先行研究で確立した培養系を用い腱細胞の分化に特異的に作用する新規のマイクロ RNA を同定し、その機能を解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 先行研究で検出した miRNA の機能解析

腱細胞分化誘導後 5 日目に発現が上昇した miRNA のうち Smad7 と Tppp3 を標的遺伝子とする可能性がある miR-214, miR-322, miR-34b-5p, miR-181b の発現量の変化をリアルタイム PCR にて確認した。また標的遺伝子の発現量の変化についてもリアルタイム PCR とウェスタンブロットングを用いて確認した。さらに、miRNA の mimic と inhibitor を細胞内に導入し標的遺伝子に対する抑制効果と細胞の分化に与える影響を調べた。

#### Tppp3 の腱細胞分化における機能解析

C2C12 に Tppp3 に対する siRNA を導入し、リアルタイム PCR による腱細胞マーカーの定量を行った。

#### 腱細胞分化誘導直後に発現が変化する miRNA の検出とその機能解析

C2C12 を Myostatin で刺激し、24 時間後に RNA を回収、マイクロアレイによりコントロールと比較し発現量が大きく異なる miRNA を検出した。発現量の変化の再現性についてはリアルタイム PCR にて確認した。また、データベース上の標的予測のプログラム ( miRanda, DIANA MicroT Analyzer, TargetScan ) を用いて、腱細胞の分化を制御する可能性がある標的遺伝子を同定した。さらに、検出された miRNA の mimic と inhibitor を細胞内に導入し標的遺伝子に対する抑制効果と細胞の分化に与える影響を調べた。

### 4. 研究成果

リアルタイム PCR による miRNA の発現解析では、miR-214 のみが Myostatin による刺激時に増加することが確認された。しかし、リアルタイム PCR、ウェスタンブロットによる腱細胞分化誘導前後での標的遺伝子の定量では、Myostatin による刺激の有無で miR-214 の標的遺伝子候補である Smad7 の発現量の変化が認められなかった。一方、miR-214 の mimic と inhibitor を用いた実験においては、miR-214 が腱細胞分化を促進させる作用があることが確認できたが、Smad7 の発現量の変化は検出できなかった。データベース上の標的予測プログラムによる解析では、miR-214 の標的遺伝子候補として他にもいくつかの遺伝子が検出されたが、今回の研究ではそれらについて検討できておらず、今後それらについても調べていく必要がある。

miR-322 の標的遺伝子候補として同定された Tppp3 については、Myostatin による腱細胞分化誘導時に siRNA を用いてノックダウンをした結果、Tenomodulin の発現の低下が確認された。このことから、Tppp3 は miR-322 の標的遺伝子である可能性は低いものの、腱細胞分化を促進する働きがあることが示唆された。同蛋白については、今後引き続き腱細胞分化における機能の解析を進めてい

く予定である。

Myostatin による腱細胞分化誘導 24 時間後に発現が変化する miRNA について、マイクロアレイによる解析を行った結果、Myostatin で刺激した細胞ではコントロールと比較して miR-206, miR-675-3p, miR-351 の 3 つの miRNA の発現が優位に低下していた。これらの miRNA について、リアルタイム PCR による発現量の解析を行ったところ、miR-206, miR-675-3p でマイクロアレイ解析と同様に発現低下が観察された ( 図 4 )。さらに、miR-675-3p, miR-206-3p それぞれの mimic を導入した結果、miR-675-3p において Tenomodulin の発現が増加した ( 図 5 )。また、miR-675-3p の inhibitor の導入では、逆に Tenomodulin の発現が低下した。標的予測のプログラムを用いた解析により miR-675-3p の標的遺伝子の候補として Myocyte enhancer factor ( Mef ) 2a と Mef2c が検出され、mimic 導入時に両遺伝子の mRNA レベルにおける発現が抑制されることが明らかとなった ( 図 6 )。

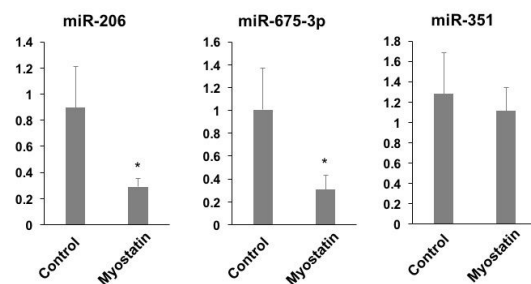


図4 腱細胞分化誘導後のmiRNA 発現量

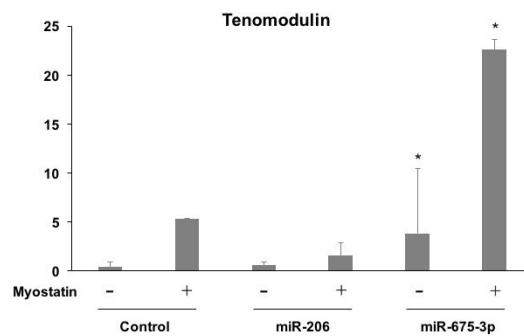


図5 miRNA mimic導入によるTenomodulinの発現量変化

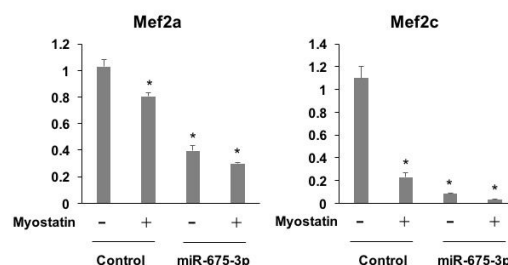


図6 miR-675-3p mimic導入による予測標的遺伝子の発現量変化

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

大石 歩、林 正徳、植村一貴、小松雅俊、  
内山茂晴、齋藤直人、加藤博之 腱細胞分化  
に特異的な miRNA の同定、第 30 回日本整形  
外科学会基礎学術集会、2015.

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 正徳 (HAYASHI, Masanori)  
信州大学・学術研究院医学系・助教  
研究者番号：20624703

(2)研究分担者

内山 茂晴 (UCHIYAMA, Shigeharu)  
信州大学・学術研究院医学系・准教授  
研究者番号：10242679

加藤 博之 (KATO, Hiroyuki)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号：40204490

植村 一貴 (UEMURA, Kazutaka)  
信州大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号：50624706