

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20830

研究課題名(和文)骨細胞が放出するExosome中microRNAによる他臓器制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of circulating osteocyte-derived exosomes contain miRNAs which are enriched in exosomes from MLO-Y4 cells

研究代表者

佐藤 真理 (Sato, Mari)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40546488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：野生型マウスと骨細胞除去マウスの血清およびマウス骨細胞株MLO-Y4細胞とマウス骨髄ストローマ細胞株ST-2細胞の培養上清中からexosomal RNAを抽出した。これらのRNAを用いてmicro RNAアレイ解析ならびに次世代シーケンス解析を行った。その結果、骨細胞由来Exosomeに特異的に含有されると考えられる11種類のmicro RNAを同定した。

研究成果の概要(英文)：Signaling molecules produced by osteocytes have been proposed to act as soluble factors which contribute to bone remodeling as well as homeostasis of other organs. However, there have been no studies into the role of osteocyte-secreted exosomes. Here, we demonstrate that ablation of osteocytes in mice (osteocyte-less, OL) alters miRNA levels of plasma-circulating exosomes. To explore the function of osteocyte-secreted exosomes, we extracted exosomes derived from MLO-Y4 cells and examined their miRNA expression levels using miRNA array analysis and deep sequencing. Comparison of miRNA expression levels between plasma exosomes from OL mouse plasma and MLO-Y4-derived exosomes revealed that decreases in the miRNAs from exosomes circulating in OL mouse plasma may be caused by a decrease in leakage or secretion of exosomes from osteocytes. These results suggest that osteocytes secrete exosomes containing characterized miRNAs.

研究分野：骨代謝学

キーワード：Osteocyte Exosome micro RNA

1. 研究開始当初の背景

申請者は骨に埋め込まれた骨細胞が遠隔臓器である胸腺や白色脂肪を制御していることをこれまで明らかにしてきた。さらに、骨細胞が細胞外 Vesicle を放出しており、末梢血中にも骨細胞由来の Vesicle が観察されることが近年明らかとなってきている。骨細胞による遠隔臓器制御機構の一端として、骨細胞が放出する Exosome 中の micro RNA による他臓器制御機構を明らかにすべく、申請者は本研究計画を想起した。

2. 研究の目的

骨細胞は骨の細胞の 90%以上を占める細胞であり、胸腺や脂肪など遠隔他臓器への関与が示唆されているがその制御機構は明らかではない。本研究では骨細胞による遠隔他臓器制御機構の一端として、骨細胞が産生する exosome とそこに含まれる microRNA に着目した。骨細胞が血中に exosome を放出し、その exosome に含まれる microRNA が遠隔他臓器の細胞を制御している可能性を検証することを目的とし、骨細胞 exosome に特異的な microRNA の同定を目指した。

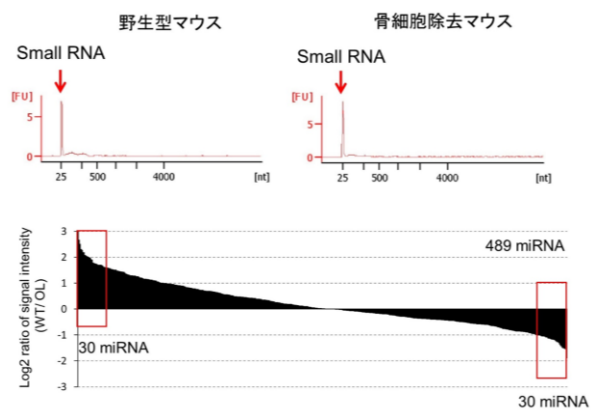
3. 研究の方法

野生型マウスと骨細胞除去マウス (Tatsumi et. al. Cell Metabolism: 2007) の血清から exosomal microRNA を抽出し、microRNA アレイ解析を行った。マウス骨細胞株 MLO-Y4 細胞とマウス骨髄ストローマ細胞株 ST-2 細胞の細胞内および培養上清中から exosomal RNA を抽出し microRNA アレイ解析を行った。MLO-Y4 細胞培養上清中の exosomal RNA に関してはさらに次世代シーケンス解析を行い、成熟型 micro RNA の定量を行った。これらのデータを比較、解析し骨細胞が血中に放出する exosome に特異的に含まれる microRNA の同定を行った。

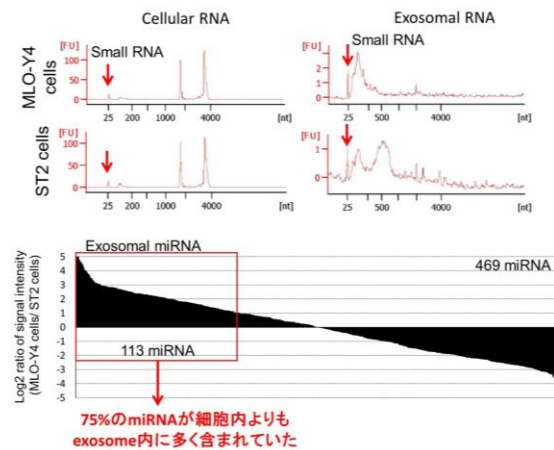
4. 研究成果

1) ・骨細胞特異的にジフテリアトキシンレセプターを過剰発現させたトランスジェニックマウス (DMP1-DTR-Tg) に 15 週齢でジフテリアトキシンを投与して全身の骨細胞を除去した“骨細胞除去マウス”を作製した。この骨細胞除去マウスおよび野生型マウスの血漿から、Total Exosome Isolation (Invitrogen)を用いて exosome を抽出し、mirVana™ miRNA Isolation Kit により RNA を抽出した。

・抽出した RNA を用いて、東レの microRNA 研究用 DNA チップによる 3D-Gene 解析にて各サンプルの Exosome に含まれる microRNA の網羅的解析を行い、骨細胞除去マウスで増加または減少している exosomal microRNA を 30 種類ずつ同定した。



2) ・MLO-Y4 または ST-2 の細胞培養上清中から抽出した exosomal microRNA のアレイ解析を行い、MLO-Y4 の exosome に 2 倍以上多く含まれる 113 種類の microRNA を同定した。  
 ・113 種類の microRNA の内 85 種類 (75%) は細胞内よりも exosome 内に多く含まれていた。

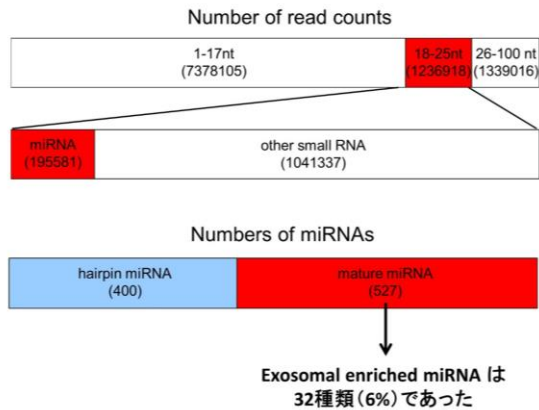


3) ・骨細胞除去マウスの血清中 exosome で減少しており、かつ MLO-Y4 が放出する exosome に多く含まれている microRNA を 21 種類同定した(下図：ピンク塗りつぶし)。

miR ID	Relative expression of miRNA (OL plasma exosome/WT plasma exosome) (log2 value)	Relative expression of miRNA (MLO-Y4 exosomes/ST2 exosomes) (log2 value)	Relative expression of miRNA (MLO-Y4 exosomes/MLO-Y4 cells) (log2 value)
mmu-miR-3473a	-1.90	4.58	3.02
mmu-miR-3473b	-1.52	4.64	3.79
mmu-miR-3473c	-1.51	5.66	3.77
mmu-miR-5128	-1.43	4.8	4.51
mmu-miR-6244	-1.27	2.8	2.20
mmu-miR-6239	-1.24	2.15	
mmu-miR-5132-5p	-1.13	2.42	2.63
mmu-miR-705	-1.10	2.94	4.05
mmu-miR-208a-5p	-1.09	n.d.	n.d.
mmu-miR-3104-5p	-1.07	2.71	3.19
mmu-miR-1224-5p	-1.05	5.34	5.80
mmu-miR-5621-5p	-1.03	2.26	2.29
mmu-miR-328-5p	-0.87	2.25	3.97
mmu-miR-5130	-0.87	1.5	3.58
mmu-miR-652-5p	-0.84	n.d.	n.d.
mmu-miR-5112	-0.76	n.d.	n.d.
mmu-miR-149-3p	-0.73	2.13	3.62
mmu-miR-346-3p	-0.71	1.72	2.51
mmu-miR-5109	-0.69	2.49	1.99
mmu-miR-3102-5p.2-5p	-0.68	1.18	2.66
mmu-miR-6370	-0.64	2.25	
mmu-miR-6240	-0.63	4.03	3.24
mmu-miR-486-3p	-0.62	2.2	0.94
mmu-miR-326-5p	-0.61	2.7	2.47
mmu-miR-6385	-0.60	n.d.	n.d.
mmu-miR-5105	-0.59	2.24	3.26
mmu-miR-615-5p	-0.59	1.12	
mmu-miR-6405	-0.58	n.d.	n.d.
mmu-miR-5126	-0.56	1.76	2.34
mmu-miR-5119	-0.52	n.d.	n.d.

4) ・MLO-Y4 細胞培養上清中から抽出した exosomal small RNA の次世代シーケンス解析により、mature microRNA は 527 種類同定された。

・527 種類の microRNA の内、exosome に多く含まれる microRNA は 32 種類同定された。



5) ・マウスの血清中 exosome で増加しており、かつ MLO-Y4 が放出する exosome に多く含まれている microRNA (6 種類) のうち Read counts が 30 以上のものは 6 種類であった。

・骨細胞除去マウスの血清中 exosome で減少しており、かつ MLO-Y4 が放出する exosome に多く含まれている microRNA (21 種類) のうち Read counts が 30 以上のものは 2 種類 (miR-3473b, miR-3473e) であった。

	miR ID	Relative expression of miRNA (OL plasma exosome/WT plasma exosome) (log2 value)	Read counts
Up-regulated	miR-29a-3p	1.51	832
	miR-16-5p	1.58	1050
	miR-92a-3p	2.08	13672
	miR-221-3p	1.77	5998
	miR-484	1.59	1745
	miR-451a	1.71	385
Down-regulated	miR-3473b	-1.52	48
	miR-3473e	-1.51	116

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Sato M, Suzuki T, Kawano M, Tamura M. Circulating osteocyte-derived exosomes contain miRNAs which are enriched in exosomes from MLO-Y4 cells Biomed Rep. 査読有 6(2):223-231. 2017 DOI: 10.3892/br.2016.824

[学会発表] (計 1 件)

佐藤真理, 田村正人  
骨細胞が産生する exosome に含まれる miRNA の解析  
第 34 回日本骨代謝学会学術集会・第 3 回アジア太平洋骨代謝学会議, 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)  
22 July, 2016  
[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 真理 (SATO, Mari)  
北海道大学・歯学研究科・助教  
研究者番号: 40546488

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

田村 正人 (TAMURA, Masato)  
北海道大学・歯学研究科・教授  
研究者番号：26462807

川野 光興 (KAWANO, Mitsuoki)  
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教  
研究者番号：26430187