

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16H05538

研究課題名（和文）Cdk6が制御するmicroRNAの探索による骨代謝機構の解明と再生医療への応用

研究課題名（英文）Identification of microRNAs controlled by Cdk6 for understanding of bone metabolism system and their application for regenerative medicine

研究代表者

小笠原 徹（OGASAWARA, Toru）

東京大学・保健・健康推進本部・講師

研究者番号：20359623

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨代謝メカニズムの解明は、口腔外科学分野において非常に重要な課題である。本研究は研究代表者のこれまでの研究成果の発展形として、Cdk6に制御されるmicroRNAの中で骨代謝・骨格形成において重要な機能を有するものを網羅的に探索することによって、骨代謝制御メカニズムのさらなる理解を深めるとともに、その結果を利用した新規骨再生治療法開発に向けた基礎的検討を行うことを目的として企画された。研究成果の概要としては、遺伝子操作マウスを主な解析対象として、microRNAシーケンスなどの網羅的解析を行うことで、Cdk6に制御されると同時に骨芽細胞分化に関与するmicroRNAを複数同定することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、Cdk6によって制御されるとともに骨代謝において重要な機能を果たす複数のmicroRNAと、それらのmicroRNAのターゲット分子が同定された。これらの研究成果は過去に報告のない新たな知見であり、今回同定されたmicroRNAとターゲット分子に関して詳細な解析を行うことによって、現時点では治療法が見つからない骨系統疾患や難治性骨折などの新規治療法開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate microRNAs controlled by Cdk6 to clarify the mechanism(s) of bone metabolism. DNA microarray analysis, CHIP-sequencing analysis, RNA-sequencing analysis, micro RNA array analysis and microRNA-sequencing analysis revealed that Cdk6 regulates several microRNAs which are important in bone metabolism. In conclusion, this study identified microRNAs controlled by Cdk6 which regulate bone metabolism and other important biological processes.

研究分野：口腔外科学

キーワード：micro RNA 細胞周期 骨代謝 発生・分化 再生医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨再生が必要な疾患を主要な治療対象とする口腔外科学分野において、「いかに安全・効率的に骨を再生させるか」という問題はきわめて重要である。しかし、従来行われてきた骨再生治療法には薬剤関連顎骨壊死や効果の不確実性など、いくつかの欠点が指摘されている。

われわれは、それらの欠点を解消する新たな治療法を開発するためには、生体内で自然に起こる骨形成・骨修復機転を再現・促進するという観点が重要であると考え、骨代謝における microRNA の機能に着目した。microRNA は 20~25 塩基対から成る機能性 non-coding RNA であり、増殖・分化・アポトーシスなど広範な生物学的プロセスにおいて重要な機能を有することが証明されているだけでなく、近年、骨代謝・骨格形成においても、その重要性が報告されるようになってきていた。また、われわれの研究グループは細胞周期制御分子 Cyclin-dependent kinase 6 (Cdk6) の骨代謝分野における重要性を世界に先駆けて報告してきたという背景があり、骨系統細胞において、細胞周期制御分子 Cdk6 により制御を受ける microRNA の同定ならびにそれらの機能解析が重要課題であると認識するに至った。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、網羅的手法による解析を主要なツールとして、骨系統細胞において Cdk6 に制御される microRNA の同定と機能解析を行うことで、新たな視点から骨代謝制御メカニズムを解明し、骨再生医学への応用可能性を検討することを目的として企画・遂行された。

3. 研究の方法

(1) Cdk6 ノックアウトマウスおよび野生型マウス由来の骨系統細胞を利用して、in vitro において Cdk6 欠損によって変動する遺伝子群を網羅的にスクリーニングした。

(2) Cdk6 ノックアウトマウスおよび野生型マウス由来の骨系統細胞を利用して、in vitro において Cdk6 によって制御される microRNA を網羅的にスクリーニングした。

(3) 上記(1)および(2)の結果より選択された microRNA と骨形成の関連を検討することで、骨代謝メカニズムの解明および新規骨再生治療法開発に向けた基礎的検討を行った。

なお、これらの実験に当たっては、DNA マイクロアレイ、ChIP-seq 法、miRNA アレイ、small RNA シーケンス(microRNA シーケンス)、RNA シーケンスなどの網羅的な手法を主な解析方法とした。

4. 研究成果

(1) まず、Cdk6 ノックアウトマウス(Malumbres, Barbacid et al. Cell 2004) および野生型マウス由来のプライマリー骨系統細胞を用いた DNA マイクロアレイと RNA シーケンス(RNA-seq) を複数セット行い、Cdk6 欠損によって様々な遺伝子発現が変化することを確認した。

次に上記細胞を用いて、骨系統細胞において、Cdk6 が単独あるいは他の分子と複合体を形成してゲノムに結合している部位の同定を目的として、抗 Cdk6 抗体によるクロマチン免疫沈降(ChIP)と次世代シーケンサーによる超高速シーケンス(クロマチン免疫沈降シーケンス: ChIP-seq)を実施した。ChIP-seq の結果、Cdk6 が単独あるいは他の分子と複合体を形成して結合していると想定されるエンリッチ領域として、通常培養時では約 14000 の領域を、分化刺激培養時では約 8000 の領域をそれぞれ検出した。これらのエンリッチ領域には様々な microRNA の転写開始点から 10kb 以内に位置するものが数多く含まれていた。さらに、Cdk6 ノックアウトマウスおよび野生型マウス由来のプライマリー骨芽細胞を用いて、発生・分化と幹細胞に関わる miRNA を対象とした microRNA アレイ(miScript miRNA PCR Array を利用)を実施し、Cdk6 欠損に対応して骨芽細胞内で発現変動する可能性のある microRNA を検索した。DNA マイクロアレイ、RNA-seq、microRNA アレイで得られたデータとクロマチン免疫沈降シーケンスの結果をバイオインフォマティクス解析に供し、既知の報告やシグナルネットワークも考慮して、Cdk6 に制御されると同時に骨系統細胞分化に関与する可能性のある microRNA 群の選択を進めた。

(2) われわれは、Bone Morphogenetic Protein (BMP) が骨芽細胞において Cdk6 の発現・機能制御機構において重要な役割を果たしていることを報告している(Ogasawara et al. Mol Cell Biol 2004)が、この BMP に着目し、BMP 刺激に対応して骨芽細胞内でその発現が変動する microRNA の同定を試みた。本項目については、BMP 処理を行ったマウス骨芽細胞からトータル RNA を抽出し、その RNA を用いて(1)と同様に microRNA アレイを行った(コントロールには BMP 未処理のマウス骨芽細胞を用いた)。microRNA アレイの結果、約 100 個の解析候補分子が選択されたため、そのデータと前年度までに施行した microRNA アレイおよびクロマチン免疫沈降シーケンスの結果をバイオインフォマティクス解析に供し、既知の報告やシグナルネットワークも考慮して、さらに microRNA 群の絞込みを進めた。

(3) Cdk6 ノックアウトマウスおよび野生型マウス由来のプライマリー骨芽細胞を用いて small RNA シーケンスを実施し、20~25 塩基対の smallRNA に注目して、Cdk6 欠損に対応して発現変動する可能性のある microRNA を網羅的に検索した。

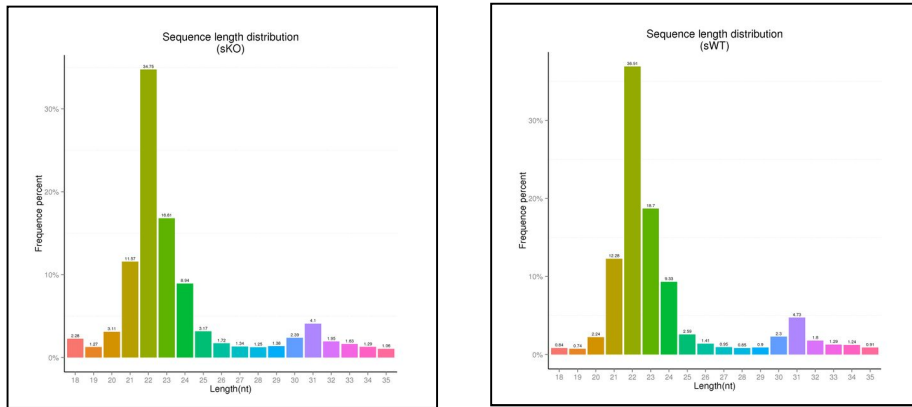


図 1. 検出された smallRNA の分布状況
(左側: Cdk6 ノックアウトマウス 右側: 野生型マウス)

これらの smallRNA をクロモソームにマッピングし、その分布状況を確認した (図 2)、また、transcripts per million (TPM) 正規化を行った (図 3)。

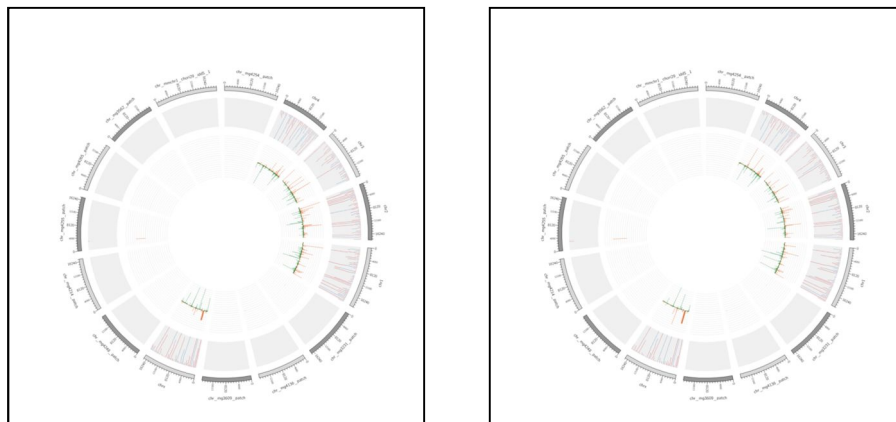


図 2. 各クロモソームにおける smallRNA の分布状況
(左側: Cdk6 ノックアウトマウス 右側: 野生型マウス)

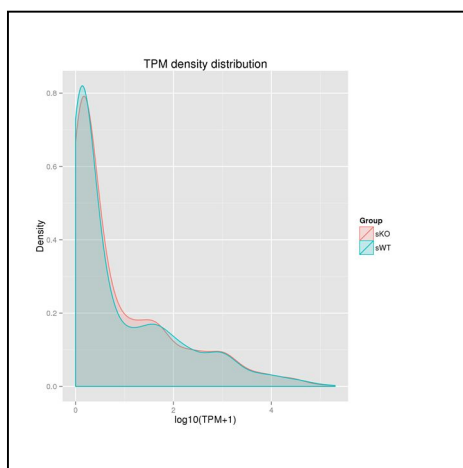


図 3. TPM 正規化

(4) Cdk6 欠損によって miRNA の発現プロファイルがどのように変化するかを解析する目的で、クラスター解析を行った。その結果、Cdk6 ノックアウトマウスで特異的に発現している miRNA が 159 種類、野生型マウスで特異的に発現している miRNA が 152 種類、Cdk6 ノックアウトマウスと野生型マウスの両方で共通して発現している miRNA が 711 種類であることが明らかとなった。また、新規 miRNA が検出された割合に関しては、Cdk6 ノックアウトマウス由来細胞においても野生型マウス由来細胞においても全体の 0.1% 程度であった。解析を進め、Cdk6 ノックアウトマウスでは、野生型と比較して発現上昇している miRNA が 20 種類、逆に発現が低下している miRNA は 35 種類存在することが明らかとなった。

これまでの解析結果を統合して、Cdk6 欠損によって発現が上昇する miRNA としては mmu-miR-199a-3p など、Cdk6 欠損によって発現が低下する miRNA としては mmu-miR-140-3p な

ど、合計 10 種の miRNA を最終解析対象として選択し、それらの miRNA の機能解析を実施した。

(5) Gene Ontology (GO) Enrichment Analysis を行い、Cdk6 によって制御される miRNA のターゲット遺伝子候補を予測した。赤のグラフは biological process (生物学的プロセス)、青のグラフは cellular component (細胞の構成要素)、緑のグラフは molecular function (分子機能) に、それぞれ関与する遺伝子群である。

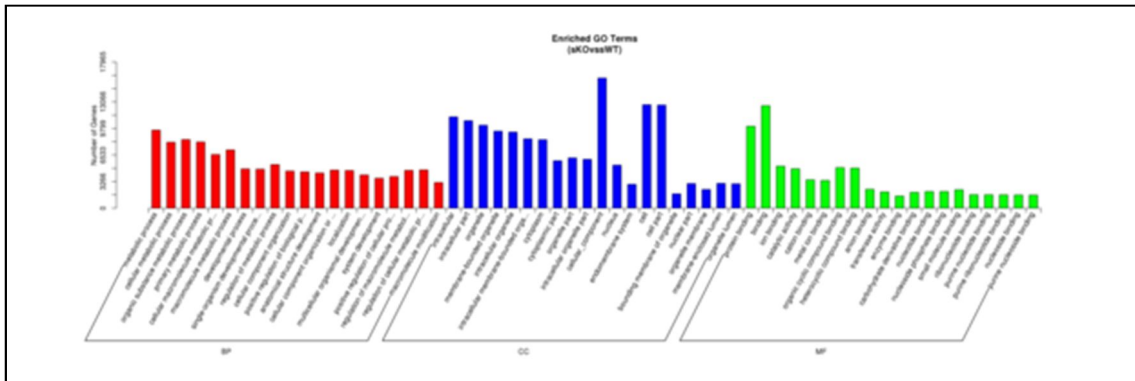
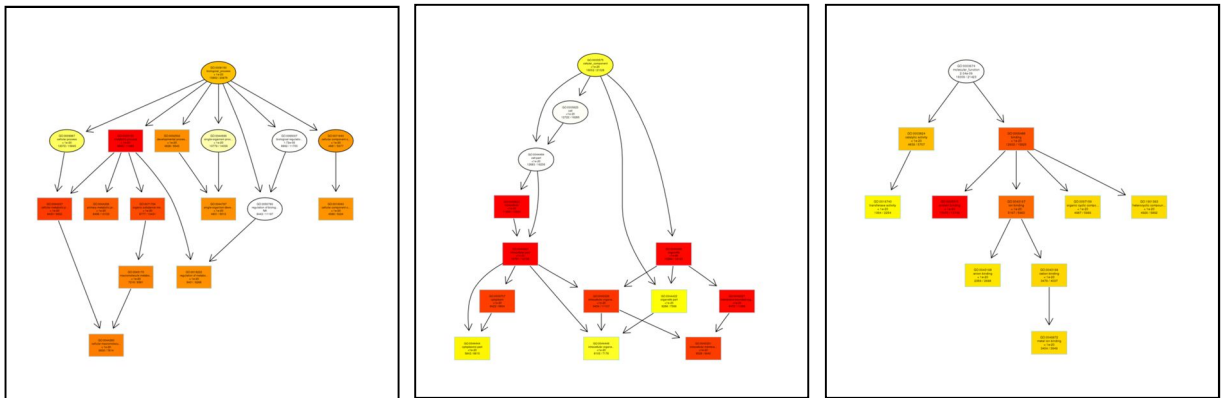


図 4. ターゲット遺伝子候補のヒストグラム

これら三つのプロセスに関する Directed Acyclic Graph (DAG : 有向非巡回グラフ) を示す。



biological process

cellular component

molecular function

図 5. ターゲット遺伝子候補の DAG

(6) KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway Analysis を実施した結果、ターゲット遺伝子は MAPK シグナル伝達経路、インスリンシグナル経路、ユビキチン分解系、Rap1 シグナル伝達経路などの代謝経路に関与していることが示唆された。左に MAPK シグナル伝達経路の代謝マップを示す。

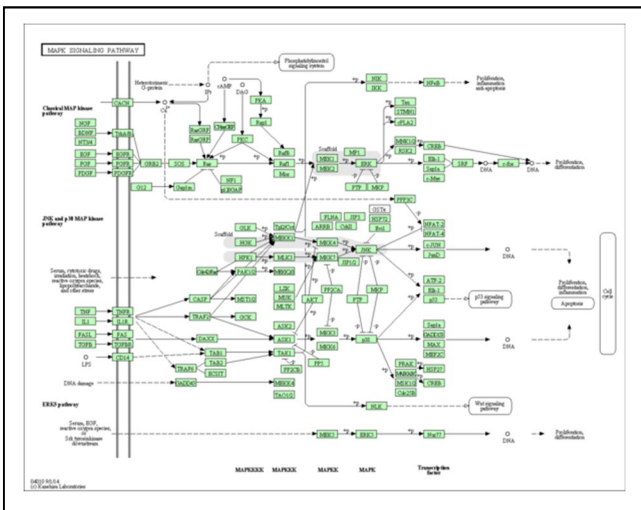


図 6. MAPK シグナル伝達経路の代謝マップ

以上の結果から、Cdk6 は骨系統細胞分化に関連する複数の重要な miRNA を制御することが明らかとなった。さらに、Cdk6 によって制御される miRNA は多様な細胞プロセスに関わる遺伝子をターゲットとすることが示唆された。今後は、本研究の成果を発展させて骨代謝メカニズムの解明を深めるとともに、再生医学への臨床応用に繋げるべく研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogasawara T, Ko EC, Yu J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Application of Stem Cells in the Oral and Maxillofacial Region.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells Int.	6. 最初と最後の頁 2421453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/2421453.	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 該当する

1. 著者名 Kitano VJ et al.	4. 巻 133
2. 論文標題 LDL uptake-dependent phosphatidylethanolamine translocation to the cell surface promotes fusion of osteoclast-like cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs243840.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.243840.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小笠原 徹
2. 発表標題 Nanogは間葉系細胞の骨軟骨分化において重要である.
3. 学会等名 第74回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小笠原 徹
2. 発表標題 ホメオボックス転写因子Nanogは間葉系細胞の骨軟骨分化において重要である.
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小笠原 徹
2. 発表標題 CyclinD1はNanogが有する間葉系細胞骨軟骨分化能促進効果のバランスを制御する.
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学医学部附属病院口腔顎顔面外科・矯正歯科ホームページ http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/</p>

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
研究分担者	森 良之 (MORI Yoshiyuki) (70251296)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	筑田 博隆 (CHIKUDA Hirotaka) (30345219)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	
研究分担者	緒方 直史 (OGATA Naoshi) (10361495)	帝京大学・医学部・教授 (32643)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	阿部 雅修 (ABE Masanobu) (10392333)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	羽毛田 慈之 (HAKEDA Yoshiyuki) (90164772)	明海大学・歯学部・教授 (32404)	
研究分担者	茂呂 徹 (MORO Toru) (20302698)	東京大学・医学部附属病院・特任教授 (12601)	
研究分担者	藤原 夕子 (FUJIHARA Yuko) (50466744)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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