

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591936

研究課題名（和文） マイクロRNAによる骨芽細胞・骨細胞分化調節機構の解明

研究課題名（英文） uncovering the molecular mechanism of regulation of bone remodeling by micro RNA

研究代表者

早乙女 進一（SOTOME SHINICHI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員

研究者番号：20401391

研究成果の概要（和文）：

我々は、タンパク質をコードしない miRNA の骨代謝における生理的意義の解明と試みた。まず、骨芽細胞における miRNA を網羅的に解析し、骨芽細胞分化に伴って発現が変動する miRNA を多数同定した。続いて、同定した一つの miR-206 について、骨芽細胞特異的に miR-206 を発現するトランスジェニックマウスを作成し、miR-206 がコネクシン43 蛋白の発現調節を介して、骨芽細胞分化を抑制することを明らかにした。こうして、miRNA が骨代謝の生理的な調節因子であることを世界に先駆けて提唱した。

研究成果の概要（英文）：

We tried to address the role of miRNAs, a well-known non-coding RNAs, as a physiological regulator of bone remodeling. Through comprehensive analyses, we identified multiple miRNAs whose expression was altered during osteoblastic differentiation. Subsequently, we focused on miR-206 and demonstrated that miR-206 suppresses osteoblastic differentiation by regulating connexin 43 protein expression. Thus, we uncovered that miRNA is a physiological regulator of bone remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1500000	450000	1950000
2010年度	1000000	300000	1300000
2011年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、人間のかかる疾患のうち、もっとも頻度が高く、今後社会の高齢化に伴い、さらに増加が見込まれているが、骨粗鬆症の発症機序については未だ不明な点が多い。

我々は新たな視点から骨形成の分子機構を研究すべく、miRNA に注目した。

miRNA はタンパク質をコードしない non-coding RNA の一種であり、現在までにヒトで600個程度存在することが報告されている。miRNA は細胞の分化、生存、増殖、ウイルス感染さらに発ガンなどの様々な生命現象に関与し、その生理的な意義は大きい。一般に miRNA は標的となる遺伝子のメッセ

ンジャーRNA に結合し、その翻訳を抑制することで標的遺伝子の機能を抑制する重要な機能性分子であり、転写因子と並んで遺伝子発現調節の中心的な役割を担っていると考えられている。しかしながら、miRNA の骨代謝における意義は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では分子生物学的な手法を用いて、骨リモデリングにおける miRNA の生理的意義の統合的な理解を目指した。

3. 研究の方法

(1)骨芽細胞における miRNA の発現の解析

骨芽細胞株 C2C12 を BMP2 で処理し、RNA を採取した。得られた RNA から cDNA を合成し、miRNA に対するマイクロアレイを用いて、miRNA の発現を網羅的に解析した。

(2)miR-206 の骨芽細胞分化に対する影響の検討

骨芽細胞に miR-206 をトランスフェクションし、骨芽細胞分化への影響をアルカリフォスファターゼ活性の測定およびリアルタイム PCR 法を用いた骨芽細胞マーカー遺伝子発現の発現により検討した。さらに、miR-206 の標的遺伝子を in silico および、in vivo で検討した。

(3)骨芽細胞特異的 miRNA トランスジェニックマウスの解析

miR-206 トランスジェニックマウスの骨代謝動態を骨形態計測法を用いて組織学的に解析した。

(4)骨細胞において発現する miRNA の同定
骨芽細胞および骨細胞から得た RNA を用いて、マイクロアレイによる網羅的な miRNA の発現解析を行い、両者での相違を比較することで、骨細胞分において特異的に発現し、機能発現に重要であると推定される miRNA の同定を試みた。

4. 研究成果

我々は、C2C12 細胞を用いて BMP による miRNA の発現の変動を網羅的に解析した。その中で、発現が最も変動したマイクロ RNA206 に注目した。初代培養骨芽細胞においてマイクロ RNA206 の発現は分化の進行に伴って次第に減少した。また、マイクロ RNA206 の過剰発現により骨芽細胞分化が抑制された。

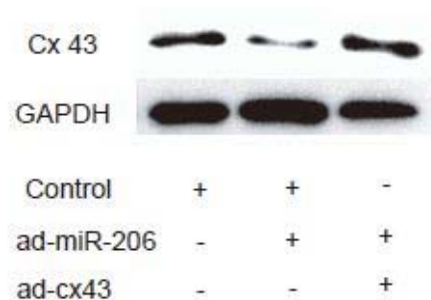
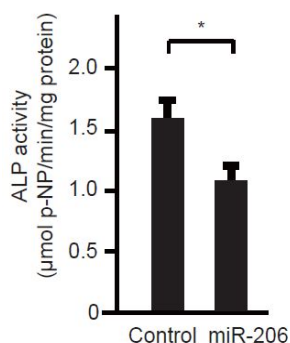


図1 miR-206 強制発現による骨芽細胞分化の抑制

さらに、データベースを用いた検索により in silico でのマイクロ RNA206 の標的遺伝子候補としてコネキシン 43 を見出し、実際に骨芽細胞を用いて in vitro でもマイクロ RNA206 の過剰発現により標的遺伝子の発現が減少することを確認した (図2)。また、コネキシン 43 の発現を正常化させることで miR-206 による骨芽細胞分化の異常が改善することを明らかにした。

図2 :miR-206 によるコネキシン 43 蛋白の発現の低下

さらにマイクロ RNA206 を発現するトランスジェニックマウスを作成し、骨形態計測法による解析をおこなった。すると、miR-206 トランスジェニックマウスでは骨芽細胞の分化が低下し、骨量が減少することを明らかにした (図3)。



図3 骨特異的 miR-206 トランスジェニックマウスの組織学的解析

左 コントロールマウス 右 miR-206 トランスジェニックマウス

こうしてマイクロ RNA が個体レベルで骨芽細胞分化の調節因子であることを明らかにした。

また、骨細胞で発現する miRNA を網羅的に解析するため、個体から骨細胞を単離同定すべく、骨細胞特異的に蛍光を発光するマウスを作成し、個体から骨細胞を蛍光を用いて単離同定することに成功した。

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 9 件)

① Sugata Y, Sotome S, Yuasa M, Hirano M, Shinomiya K, Okawa A,
Effects of the systemic administration of alendronate on bone formation in a porous hydroxyapatite/collagen composite and resorption by osteoclasts in a bone defect model in rabbits.

The Journal of bone and joint surgery. British volume 2011 Apr;93(4):510-6

② Yamada T, Yoshii T, Sotome S, Yuasa M, Kato T, Arai Y, Kawabata S, Tomizawa S, Sakaki K, Hirai T, Shinomiya K, Okawa A, Hybrid Grafting using Bone Marrow Aspirate combined with Porous beta-Tricalcium Phosphate and Trepine Bone for Lumbar Posterolateral Spinal Fusion: A Prospective, Comparative Study -Versus Local Bone Grafting-, Spine 2012 Feb;37(3):E174-9.

③ Maehara H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, Shinomiya K, Okawa A Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). Journal of orthopaedic research 2010 May;28(5):677-86.

④ Yoshii T, Sotome S, Torigoe I, Maehara H, Sugata Y, Yamada T, Shinomiya K, Okawa A Isolation of osteogenic progenitor cells from trabecular bone for bone tissue engineering. Tissue engineering. Part A 2010 Mar;16(3):933-42.

⑤ Kawasaki Y, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Maehara H, Sugata Y, Hirano M, Mochizuki N, Shinomiya K, Okawa A Effects of gamma-ray irradiation on mechanical properties, osteoconductivity, and absorption of porous hydroxyapatite/collagen. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2010 Jan;92(1):161-7.

⑥ Kusano K, Enomoto M, Hirai T, Tsoulfas P, Sotome S, Shinomiya K, Okawa A Transplanted neural progenitor cells expressing mutant NT3 promote myelination and partial hindlimb recovery in the chronic phase after spinal cord injury. Biochem Biophys Res Commun 2010 Mar 19;393(4):812-7

⑦ Toshitaka Yoshii, Shinichi Sotome, Ichiro Torigoe, Akio Tsuchiya, Hidetsugu Maehara, Shizuko Ichinose, Kenichi Shinomiya Fresh Bone Marrow Introduction into Porous Scaffolds Using

a Simple Low-Pressure Loading Method for Effective Osteogenesis in a Rabbit Model JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH 27:1-7, 2009

⑧ Torigoe I, Sotome S, Tsuchiya A, Yoshii T, Maehara H, Sugata Y, Ichinose S, Shinomiya K, Okawa A. Bone Regeneration with Autologous Plasma, Bone Marrow Stromal Cells, and Porous beta-Tricalcium Phosphate in Nonhuman Primates. Tissue Eng Part A. 15(7):1489-1499, 2009

⑨ Inose, H., Ochi, H., Kimura, A., Fujita, K., Xu, R., Sato, S., Iwasaki, M., Sunamura, S., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Saito, K., Nakamura, T., Siomi, H., Ito, H., Arai, Y., Shinomiya, K.-i., and Takeda, S. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 106:20794-20799, 2009

〔学会発表〕(計 2 件)

① Inose, Arai, Takeda ら The Regulation of Osteoblast Differentiation by MicroRNA American Society for Bone and Mineral Research Annual meeting 2008/9/15 モントリオール カナダ

② Fujita, Arai, Takeda ら Regulation of osteoblast differentiation by microRNA 206. 第 26 回内藤コンファレンスオステオバイオロジー 2009 年 11 月 5 日 兵庫県淡路市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2 件)

名称: 骨移植片製造装置

発明者: 四宮謙一、早乙女進一

権利者: 四宮謙一、早乙女進一

種類:

番号: 特許第 4545015 号

出願年月日: 2010 年 7 月 9 日

国内外の別: 国内

名称: リン酸カルシウム含有複合多孔体及びその製造方法

発明者: 西村祐介、四宮謙一、早乙女進一

権利者: 西村祐介、四宮謙一、早乙女進一

種類:

番号: 特許第 4925315 号

出願年月日: 2012 年 2 月 17 日

国内外の別: 国内

○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
<http://www.tmd.ac.jp/med/orth/sub/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早乙女 進一 (SOTOME SHINICHI)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座教員
研究者番号：20401391

(2) 研究分担者

大川 淳 (Okawa Atsushi) 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：30251507
山内 裕樹 (Yamauchi Yuki) 東京医科歯科大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70422483

(3) 連携研究者

竹田 秀 (Takeda Shu) 慶應義塾大学・医学部 特任准教授
研究者番号：30376727

