

様式 C-19

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 4 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009～2011

課題番号：21700715

研究課題名（和文）

骨芽細胞分化制御における microRNA の関与とその応用

研究課題名（英文）

Involvement of microRNA in osteoblast differentiation, and its application

研究代表者

伊藤 智広 (ITOHI TOMOHIRO)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：30435854

研究成果の概要(和文):本研究において、骨芽細胞を BMP-2 刺激することで9種類の microRNA (以下 miRNA)の発現が変動することを突き止めた。それらのうち、miRNA-141/-200a が Dlx5 を、miRNA-208 が Ets1 を、miRNA-370 が BMP-2 および Ets1 をそれぞれ標的遺伝子としていることを明らかにした。以上のことから骨芽細胞の分化には miRNA が密接に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文): In this study, we found that the expression levels of 9 miRNAs (log ratio, 1.5<) were distinct between BMP-2- treated and nontreated cells. Among these, we showed that Dlx5, Ets1 BMP-2 and Ets1 genes were regulated by miR-141/-200a, miR-208, and miR-370, respectively. The above-mentioned results strongly suggests that miRNAs has been closely involved in BMP-2-induced osteoblast differentiation.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学・食品機能学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：加齢・老化、microRNA、骨芽細胞、分化

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA(以下 miRNA)や siRNA などの短い RNA が発生・分化やクロマチンのメチル化、発ガンなど、様々な生理現象に関与することが明らかになり、その報告数は年々増加している。本研究では、骨代謝における miRNA による制御機構についての報告が少ないことから、マウス頭蓋骨由来前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞を用いて強力な骨分化誘導因子である Bone morphogenetic protein-2 (以下 BMP-2)刺激によって変動する miRNA 発

現および分化制御機構について明らかにすることを考えた。国内外の骨芽細胞分化に関わる miRNA 発現解析については Brandi らの研究グループが前駆脂肪幹細胞から骨芽細胞の分化に miRNA-26a が Smad1 の発現を調節していること¹⁾を、また、岡崎らの研究グループがマウス間葉系幹細胞を用いた BMP-4 刺激後の骨芽細胞分化において miRNA-125b が骨芽細胞の増殖に関与することを其々報告している。²⁾ これら報告から研究成果より骨芽細胞分化には miRNA が密接に関与してい

ることが示唆されている。1) Luizi et al. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *J. Bone Miner. Res.* 23(2): 287-95 (2008). 2) Mizuno et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 368(2):267-72 (2008).

2. 研究の目的

(1) 本研究課題では、miRNA 対 mRNA の関係は「多対多」であることから、BMP-2 刺激により発現変動した miRNA が制御している標的遺伝子は数種あると推測されることから、さらにこれら miRNA の標的遺伝子とその骨芽細胞分化制御メカニズムを明らかにする。

(2) 近年、miRNA はリンパ腫診断マーカー、アポトーシス阻害遺伝子の抑制など医療分野において注目され、最近では国立がんセンター研究所の落谷らが血中の miRNA で肝臓がんの診断が可能であることを報告している。このように miRNA は診断マーカーや治療薬としての機能性を有していることから、骨代謝における miRNA 機能の解明は本分野においてこれまでにない RNAi 創薬開発など治療への応用研究へ展開できることから、RNAi 創薬の可能性を推察する。また、現在の骨芽細胞の分化は骨形成マーカーである ALPase 活性、オステオポンチンなどの骨基質タンパク、I 型コラーゲンなどを用いて評価されているが検出感度、分化及び石灰化確認の長期培養などの問題がある。しかし、miRNA を分化バイオマーカーとして用いることで検出感度の上昇、評価期間の短縮、ランニングコストの軽減が期待でき、現行法と比較して優位性が認められることから骨粗鬆症に対する医薬・機能性食品開発に向けた化合物の迅速評価系のスクリーニングマーカーとなりうるか検討する。

3. 研究の方法

(1) BMP-2 刺激により発現変動した miRNA の標的遺伝子の同定

① 発現が低下した miRNA については、Precursor miRNA (Ambion 社の修飾 miRNA である Pre-miR™) を、発現が上昇した miRNA に対してはその miRNA に対するアンチセンス鎖をそれぞれマウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞にそれぞれリポソーム法により細胞に導入した。導入細胞における BMP-2 誘導骨芽細胞分化への影響については、導入細胞を BMP-2 により刺激し、アルカリホスファターゼ (以下 ALP) 活性および Alizarin Red 染色

による石灰化を分化マーカーとして導入 miRNA の骨芽細胞分化への関与を評価した。

② 変動 miRNA の標的遺伝子の同定

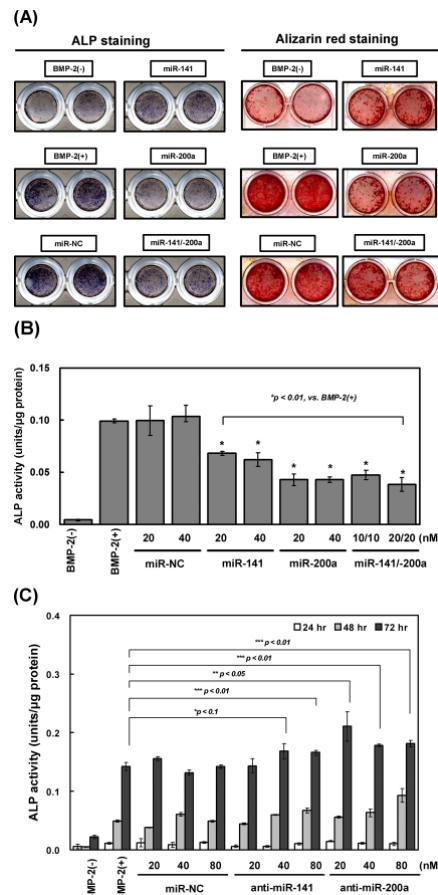
BMP-2 刺激により変動した miRNA の標的遺伝子を Sangar miRbase および TargetScan6.1 などのバイオインフォマティクスを駆使し推測後、Western Blot 法および Real time-PCR 法によりタンパクおよび mRNA 発現レベルについて検証した。

次に、miRNA による mRNA 翻訳制御及び分解は miRNA が標的遺伝子の 3' -非翻訳領域に結合することが必須であることから、推定した標的遺伝子の 3' -非翻訳領域 (以下 UTR: untranslated region) を含むまたは含まない pGL3control ベクターを用い、センサーベクターを作製し、Luciferase reporter assay により標的遺伝子を決定した。

4. 研究成果

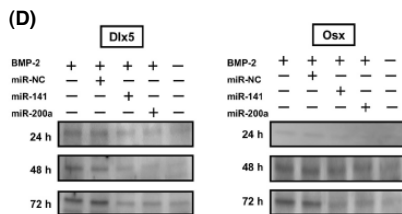
(1) miR-141/-200a による Dlx5 (Distal-less homeobox 5) 発現制御

マウス頭蓋骨由来前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞に強力な骨分化誘導因子である BMP-2 刺激すると miR-141/-200a の発現は有意に低下した。そこで、Precursor miRNA-141 または -200a、miR-141/-200a を細胞に導入したところ、骨芽細胞分化の指標である ALP 活性や石灰化の指標である Alizarin Red 染色像は有意に低下した (図 A および B)。

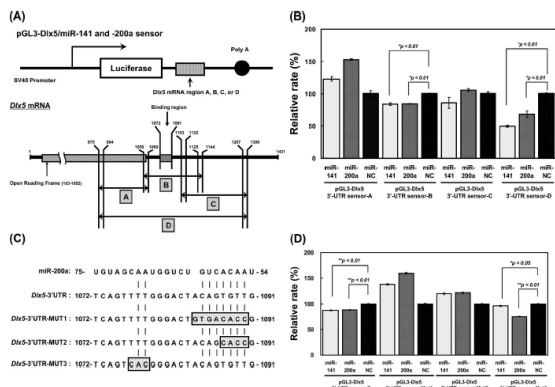


その一方、miR-141/-200a それぞれのアンチセンスインヒビターを細胞に導入したところ ALP 活性は有意に上昇した (図 C)。以上のことから、BMP-2 刺激による骨芽細胞の分化には miR-141/-200a の発現低下が重要であることが示唆された。

次に miR-141/-200a の標的遺伝子を同定するために Sangar miRbase および TargetScan6.1 などのバイオインフォマティクス解析したところ、骨芽細胞分化に深く関与している *Dlx5* が候補遺伝子として推定された。そこでウエスタンブロッティング法により miR-141/-200a 導入細胞の *Dlx5* タンパク発現レベルを検討したところ、導入することにより発現が有意に低下した。また、*Dlx5* により発現制御される下流分子である *Osterix* の発現も同様に低下した (図 D)。



さらに、*Dlx5* が標的候補遺伝子であるということと同定するために、*Dlx5* mRNA の 3' - UTR における miR-141/-200a の結合領域をクローニングし、pGL-3 control vector に組み込んだセンサーベクターを作製後、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。その結果、結合領域を含んだベクターを組み込んだ細胞ではルシフェラーゼの活性が有意に低下した。また、このルシフェラーゼ活性の低下は変異を結合領域に入れると回復した。以上のことから miR-141/-200a の標的候補遺伝子は *Dlx5* であると結論づけた (図 E ~ H)。

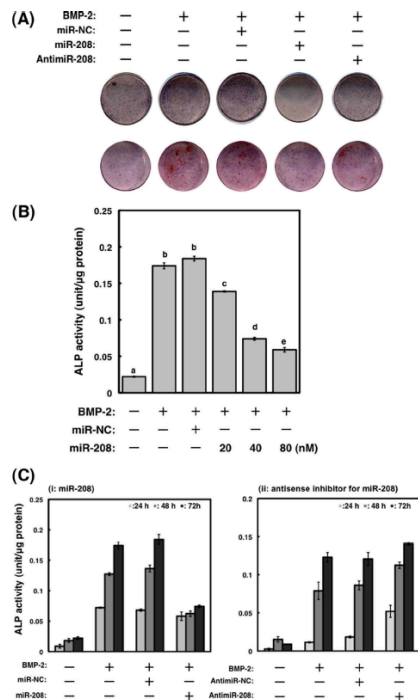


(2) miR-208によるEts1 (V-ets

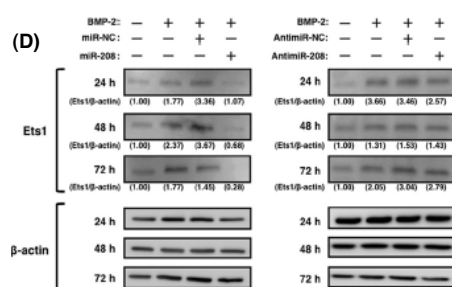
erythroblastosis virus E26 oncogenehomolog

1) 発現制御

(1) と同様に MC3T3-E1 細胞に BMP-2 刺激すると miR-208 の発現は有意に低下した。そこで、Precursor miRNA-208 を細胞に導入したところ、骨芽細胞分化の指標である ALP 活性や石灰化の指標である Alizarin Red 染色像は有意に低下した (図 A および B)。一方、miR-208 のアンチセンスインヒビターを細胞に導入したところ ALP 活性は通常レベルと同等であった。(図 C)。以上のことから、BMP-2 刺激による骨芽細胞の分化には miR-141/-200a の発現低下が重要であることが示唆された。



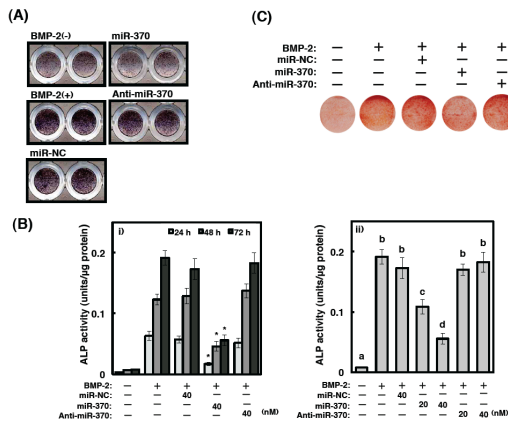
次に miR-208 の標的遺伝子を同定するために Sangar miRbase および TargetScan6.1 などのバイオインフォマティクス解析したところ、骨芽細胞分化に深く関与している転写因子の一つである *Ets1* が候補遺伝子として推定された。そこでウエスタンブロッティング法により miR-208 導入細胞の *Ets1* タンパク発現レベルを検討したところ、導入することにより発現が有意に低下した。一方、miR-208 のアンチセンスインヒビターを導入した細胞では *Ets1* のタンパク発現は BMP-2 刺激細胞の発現レベルと同等であった (図 D)。



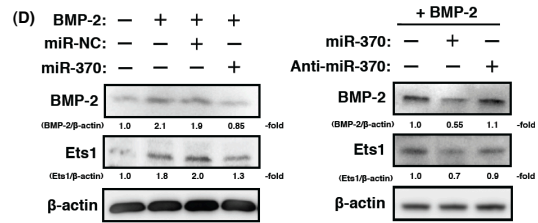
さらに、Ets1 が標的候補遺伝子であるということと同定するために、Ets1 mRNA の 3' - UTR における miR-208 の結合領域をクローニングし、pGL-3 control vector に組み込んだセンサーベクターを (1) と同様に作製後、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。その結果、結合領域を含んだベクターを組み込んだ細胞ではルシフェラーゼの活性が有意に低下した。また、このルシフェラーゼ活性の低下は変異を結合領域に入れると回復した。以上のことから miR-208 の標的候補遺伝子は Ets1 であると結論づけた。

(3) miR-370 による BMP-2 及び Ets1 発現制御

前述 (1) 及び (2) 同様、MC3T3-E1 細胞に BMP-2 刺激すると miR-370 の発現は分化初期段階において有意に低下した。そこで、Precursor miRNA-370 を細胞に導入したところ、骨芽細胞分化の指標である ALP 活性や石灰化の指標である Alizarin Red 染色像は有意に低下した。一方、miR-370 それぞれのアンチセンスインヒビターを細胞に導入したところ ALP 活性は有意に上昇した (図 A~C)。以上のことから、BMP-2 刺激による骨芽細胞の分化には miR-370 の発現低下が重要であることが示唆された。

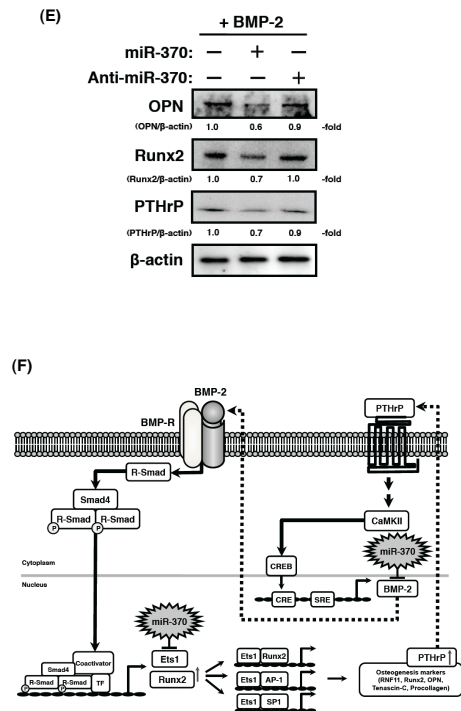


次に miR-370 の標的遺伝子を同定するために Sangar miRbase および TargetScan6.1 などのバイオインフォマティクス解析したところ、骨芽細胞分化を強く誘導するタンパク BMP-2 と転写因子 Ets1 が候補遺伝子としてそれぞれ推定された。そこでウエスタンブロッティング法により miR-208 導入細胞の BMP-2 および Ets1 のタンパク発現レベルをそれぞれ検討したところ、導入することによりいずれのタンパクとも発現が有意に低下した (図 D)。



また、miRNA-370 を導入した細胞では Ets1 の下流因子である osteopontin, RUNX2, PTHrP の発現も低下した (図 E)。

BMP-2 および Ets1 が標的候補遺伝子であるということと同定するために、BMP-2 または Ets1 mRNA の 3' - UTR における miR-370 の結合領域をクローニングし、pGL-3 control vector に組み込んだセンサーベクターを (1), (2) と同様に作製後、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。その結果、結合領域を含んだベクターを組み込んだ細胞ではルシフェラーゼの活性が有意に低下した。また、このルシフェラーゼ活性の低下は変異を結合領域に入れると回復した。以上のことから miR-370 の標的候補遺伝子は BMP-2 と Ets1 であると結論づけた。また、下流因子の変動や CRE レポーターアッセイの結果から BMP-2-Ets1-PTHrP feed-forward loop を miRNA が効率よく制御していることを推察した (図 F)。



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 3 件)

① Tomohiro Itoh, Masashi Ando, Yasuyuki Tsukamasa, Yukihiro Akao. Expression of BMP-2 and Ets1 in BMP-2-stimulated mouse pre-osteoblast differentiation is regulated by microRNA-370 FEBS Lett., in press 査読有

② Tomohiro Itoh, Takeda Shu, Yukihiro Akao. MicroRNA-208 Modulates BMP-2-stimulated Mouse Pre-osteoblast Differentiation by Direct Targeting V-ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog 1. J. Biol. Chem., 285(36), 27745-27752 (2010). 査読有

③ Tomohiro Itoh, Yoshinori Nozawa, Yukihiro Akao. MicroRNA-141 and -200a are involved in bonemorphogenetic protein-2-induced Mouse Pre-osteoblast Differentiation by Targeting distal-less homeobox 5. J. Biol. Chem., 284(29), 19272-19279 (2009). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 伊藤智広、安藤正史、塚正泰之、赤尾幸博、microRNA-370 による BMP-2 誘導マウス前駆骨芽細胞分化調節、日本薬学会 第 132 年会、2012 年 3 月、札幌

② 伊藤智広、竹田秀、赤尾幸博、microRNA-208 による BMP-2 誘導マウス前駆骨芽細胞分化調節 2010 年度日本分子生物・日本生化学会合同大会、2010 年 12 月、神戸

③ 伊藤智広、骨芽細胞分化における microRNA の役割、岐阜大学大学院先端創薬シンポジウム、2010 年 11 月、岐阜

④ 伊藤智広、大口健司、野澤義則、赤尾幸博、BMP-2 誘導マウス前駆骨芽細胞の分化調節に関わる microRNA の同定、2009 年度日本農芸化学会、2009 年 3 月、福岡

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：間葉系細胞の分化調節剤およびこれを用いた医薬、並びに間葉系細胞への分化調節

作用を有する物質のスクリーニング方法

発明者：伊藤智広、赤尾幸博、村瀬博宣

権利者：岐阜大学、シーシーアイ株式会社

種類：特許

番号：特願 2011-234162

出願年月日：平成 23 年 10 月 25 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 智広 (ITOH TOMOHIRO)

近畿大学 農学部

研究者番号：30435854

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし