

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22689042

研究課題名（和文） 骨組織におけるRNAヘリカーゼp68の機能解明

研究課題名（英文） Molecular analysis of p68 function in bone

研究代表者

福田 亨 (FUKUDA TORU)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20301492

研究成果の概要（和文）：RNAヘリカーゼの1種であるp68はmiRNA合成に関わるなど種々の生理作用を有している。しかし、骨組織でのp68の役割は明らかとなっていない。そこで、その機能解明のため、骨組織特異的p68ノックアウトマウスの作製を試みた。その結果、p68 flox マウスの作製に成功した。また、細胞を用いた実験系により、p68が骨芽細胞分化に影響を与えることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：p68 is one of the founding members of DEAD box family and an established RNA helicase. p68 functions in many cellular processes commonly dysregulated in cancer including processing of pre-mRNA and alternative splicing, cell proliferation, microRNA processing, and ribosome biogenesis. However, p68 function in bone tissue was remains unknown. In this study, we generate p68 flox mice for conditional gen targeting and cell-based assay showed that p68 affected osteoblast differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2012年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

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：骨代謝

### 1. 研究開始当初の背景

骨は運動・支持器官としての強度と血中カルシウム濃度の恒常性を保つため、一生涯にわたり形成と破壊を繰り返している。骨の形成は骨芽細胞、破壊（骨吸収）は破骨細胞が担っており、形成と破壊の絶妙なバランスによって骨組織の恒常性が維持されている。近年

の高齢化社会の進展に伴い、高齢者の生活の質（Quality Of Life: QOL）の向上と維持の面からも骨疾患に代表される運動機器疾患の制御と克服が社会的にも求められている。骨粗鬆症や関節リウマチ、変形性関節症等、正常な骨代謝の破綻を起因とする疾患は患者数が非常に多いにも関わらず、そのメカニ

ズムの解明や創薬研究についてはあまり進んでないのが現状である。このため、骨代謝の分子メカニズムを解明し、その成果を臨床応用することが社会的な急務となっている。

## 2. 研究の目的

骨代謝の調節は種々の転写因子やホルモン、サイトカインにより制御を受ける。microRNA (miRNA) は mRNA に結合し、タンパク質翻訳を抑制する 21~24 ヌクレオチドの non-coding RNA である。近年、骨組織中においても miRNA の発現が確認され、骨代謝に直接関わる細胞系での miRNA の機能が解明されつつある。一方、RNA ヘリカーゼは NTP を加水分解するエネルギーを利用して、二本鎖 RNA を巻き戻し、RNA の構造、RNA-タンパク質複合体構造を制御する活性を持つ酵素群である。p68 は DEAD ボックス型 RNA ヘリカーゼ群に属し、全身に渡って広範に発現している。p68 の機能は他のヘリカーゼ同様に mRNA スプライシング複合体であるスプライソゾームの構成分子としての機能の他、rRNA 生成や mRNA の輸送・分解に関与することが知られている。miRNA プロセッシングに関与するタンパク質複合体のうち、Drosha 複合体の構成因子として、p68 が含まれることが報告された。さらに、女性ホルモン的一种であるエストロゲンは閉経後における骨粗鬆症に代表されるように、骨代謝に重要な作用を及ぼしている。エストロゲンの生理作用はエストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) を介した標的遺伝子の転写制御により発揮される。最近では、破骨細胞特異的 ER $\alpha$  ノックアウトマウスの解析により、エストロゲンが Fas-FasL 系を介して破骨細胞のアポトーシスを制御していることが示されているが、骨代謝におけるエストロゲンの作用には未解明な部分が多い。興味深いこ

とに、p68 は ER $\alpha$  のコアクチベーターとして機能し、ER $\alpha$  による転写の活性化を促進することが明らかにされた。このことは p68 が ER $\alpha$  の転写活性を介し、骨代謝調節機能を有する可能性を示唆しているが、p68 の骨組織での機能についての報告は未だされていない。成体における p68 の機能解明には KO マウスが必要であるが、全身性 p68 KO マウスは胎生致死のため、成体での詳細な解析は不可能である。p68 の機能を詳細に解析する上でも致死性を回避した組織・細胞種特異的 KO マウスの作製は必須である。

## 3. 研究の方法

本研究では細胞種特異的 p68 ノックアウトマウスの骨組織を解析することにより、骨代謝における p68 の機能を解明することを目的としている。そこで本研究では 1) Cre-loxP システムによる細胞種特異的ノックアウトマウスを作製するための p68 flox マウスの樹立、2) 骨芽細胞特異的 Cre 発現マウスとの交配による骨芽細胞特異的ノックアウトマウスの作製と解析、3) 破骨細胞特異的 Cre 発現マウスとの交配による破骨細胞特異的ノックアウトマウスの作製と解析、を行う。最終的に各ノックアウトマウスの解析から得られた結果を比較・検討することで、骨組織における p68 の機能の解明を目指す。

## 4. 研究成果

p68 flox マウス作製のためのターゲティングベクターは、Exon2 から 5 を loxP 配列で挟んだ構造とし、BAC を用いた組み換えにより作成した。このターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、5 ラインの相同組み換え ES クローンを取得した。この 5 ラインのうち、2 ラインの ES 細胞を用いてキメラマウスの作出を行ったところ、両ラインにて 100%キメ

ラの獲得に成功した。また、p68 を組織特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスの作製するため、トランスジェニックマウス用のベクターの作製を行った。本ベクターの Cre リコンビナーゼ依存性発現を培養細胞系において確認したところ、Cre リコンビナーゼ共発現時のみ p68 を過剰発現させることができることを確認した。この作製したベクターを用い、マウス受精卵へのインジェクションを行ったところ、数匹の組織特異的 founder マウスの作出に成功した。

一方、培養細胞を用いた in vitro 実験系において p68 が骨芽細胞分化に影響を与えるかについて解析を行った。マウス線維芽細胞由来 MC3T3 -E1 細胞を用い、siRNA で p68 をノックダウンすると骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性が低下した (図 1)。さらに p68 と非常によく似た分子であり、RNA ヘリカーゼ活性を有する p72 についても同様の解析を行ったところ、p72 も骨芽細胞分化に影響を及ぼすことを明らかにした。これらの結果より、p68 および p72 が骨芽細胞分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

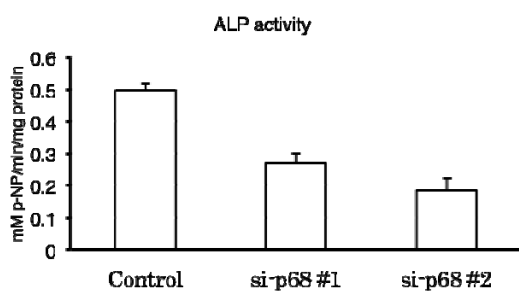


図1. p68ノックダウンで見られる骨芽細胞分化の低下

## 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 8 件)

- ① Fujita K, Iwasaki M, Ochi H, Fukuda T, Ma C, Miyamoto T, Takitani K, Negishi-Koga T, Sunamura S, Kodama T, Takayanagi H, Tamai H, Kato S, Arai H, Shinomiya K, Itoh H, Okawa A, Takeda S. Vitamin E decreases bone mass by stimulating osteoclast fusion. *Nat Med.* (2012) 18(4): 589-594. (査読有り)
- ② Shin M, Ohte S, Fukuda T, Sasanuma H, Yoneyama K, Kokabu S, Miyamoto A, Tsukamoto S, Hohjoh H, Jimi E, Katagiri T. Identification of a novel bone morphogenetic protein (BMP)-inducible transcript, BMP-inducible transcript-1, by utilizing the conserved BMP-responsive elements in the Id genes. *J Bone Miner Metab.* (2012) 31(1): 34-43 (査読有り)
- ③ Ohte S, Kokabu S, Iemura S, Sasanuma H, Yoneyama K, Shin M, Suzuki S, Fukuda T, Nakamura Y, Jimi E, Natsume T, Katagiri T. Identification and functional analysis of Zranb2 as a novel Smad-binding protein that suppresses BMP signaling. *J Cell Biochem.* (2012) 113(3): 808-814. (査読有り)
- ④ 福田亨、竹田秀 microRNA で骨代謝を制御する *細胞工学* (2011) 30: 243-247 (査読なし)
- ⑤ Takahashi S, Watanabe T, Okada M,

Inoue K, Ueda T, Takada I, Watabe T, Yamamoto Y, Fukuda T, Nakamura T, Akimoto C, Fujimura T, Hoshino M, Imai Y, Metzger D, Miyazono K, Minami Y, Chambon P, Kitamura T, Matsumoto T, \*Kato S. Noncanonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor growth in a mouse model of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2011) 108: 4938-4943 (査読有り)

⑥ Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Shin M, Yoneyama K, Murata E, Kanomata K, Nojima J, Ono Y, Yoda T, Fukuda T, \*Katagiri T. Suppression of BMP-Smad signaling axis-induced osteoblastic differentiation by small C-terminal domain phosphatase 1, a Smad phosphatase. *Mol Endocrinol*. (2011) 253:474-481 (査読有り)

⑦ Fukuda T, Kokabu S, Ohte S, Sasanuma H, Kanomata K, Yoneyama K, Kato H, Akita M, Oda H, Katagiri T. Canonical Wnts and BMPs cooperatively induce osteoblastic differentiation through a GSK3beta-dependent and beta-catenin-independent mechanism. *Differentiation* (2010) 80:46-52 (査読有り)

⑧ 福田亨、竹田秀 食欲を抑制する神経ペプチドと骨代謝 *細胞工学* (2010) 30:243-247 (査読なし)

[学会発表] (計2件)

① 福田亨 骨組織におけるマイクロ RNA 生理機能の解明 第4回非コード RNA 作用マシナリー領域会議 2012年8月22日 西鉄グランドホテル (福岡県)

② 福田亨 miRNA145 による骨芽細胞調節機構の解明 第3回非コードRNA作用マシナリー領域会議 2011年11月25日 東京大学 (東京都)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 亨 (FUKUDA TORU)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 20301492