

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 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890178

研究課題名（和文）

マイクロ RNA による骨細胞分化調節機構の解明

研究課題名（英文）

The effect of microRNA in osteocyte differentiation.

研究代表者

越智 広樹（OCHI HIROKI）

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30582283

研究成果の概要（和文）：骨細胞は、骨組織中に最も多く存在する細胞であり、骨細胞の機能不全は骨粗鬆症を引き起こすことが知られている。しかしながら、骨細胞の生理的機能ならびに調節機構に関しては未だ不明であり、中でも骨細胞の分化機構に関しては全く明らかとなっていない。本研究では、まず骨細胞特異的に GFP を発現するマウスを作成し、本マウスを用いて骨細胞の単離方法を確立した。フローサイトメトリーを用いて単離された GFP 陽性細胞は、骨細胞に特異的マーカーの mRNA を高発現している一方、骨芽細胞マーカーの発現は低かった。本検討で確立されたマウスおよび骨細胞単離方法を用いて、骨細胞ならびに骨芽細胞に特異的に発現する miRNA を同定し、機能解析を実施する。

研究成果の概要（英文）：Osteocyte is one of the most major cell in the bone, and dysfunction of osteocytes induce the osteoporosis. However, the physiological function and regulation mechanism of osteocyte are not completely known. Especially, there is no information about the mechanism of osteocyte differentiation. In this study, we focused on the microRNA, and examined the effect of microRNA in osteocyte differentiation. Firstly, we produced the osteocyte specific GFP expression mice. And, we isolated the osteocyte from these mice by using the FACS. The GFP positive cells expressed the marker gene of osteocyte higher than GFP negative cells, and osteoblast marker gene expression was lower. This result has been showed that GFP positive cell is osteocyte. We can use these mice and the osteocyte isolation method to analyze the expression of miRNA in osteocyte.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,130,000	339,000	1,469,000
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：骨細胞、骨芽細胞、マイクロ RNA

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。

成長後の骨の代謝は、主に骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞そして骨芽細胞に由来する骨細胞によって調節されている。近年の分子生物学の進歩は、骨芽細胞及び破骨細胞に関する研究を飛躍的に進展させ、骨粗鬆症治療の進歩に多大な貢献をも

たらしめた。
しかしながら一方、骨細胞に関する研究は未だ黎明期にある。骨細胞は骨芽細胞から分化し、骨組織の中で最も数が多いことが知られており、これまでに重力のメカノセンサー、石灰化の調節、マイクロダメージの感知・修復などの作用を示すことが示唆されているものの、詳細は不明であり、その生理的機能ならびに調節機構に関しては謎に包まれている。中でも骨芽細胞から骨細胞への分化調節機構に関しては全く明らかとなっておらず、これらの全容の解明には、新たな視点からのアプローチが必要であると考えられる。そこで、申請者らはマイクロ RNA(miRNA) に着目した。

miRNA は、タンパク質をコードしない non-coding RNA の一種であり、細胞の分化、増殖、発ガンなど様々な生命現象に関与しており、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。これまでに、骨代謝における miRNA の作用に関しては不明であったことから、申請者らは、miRNA による骨芽細胞分化の調節機構に注目して研究を進めてきた。骨芽細胞分化に伴いその発現が変動する miRNA 群を網羅的解析により多数同定後、そのうちの miR-206 に注目し、miR-206 が未分化骨芽細胞で発現し、骨芽細胞分化を抑制することを見出した。さらに、miR-206 を骨芽細胞特異的に過剰発現するマウスを作製し、解析した結果、骨量が著明に減少することを見出した。このように、miRNA が in vivo での骨芽細胞分化の生理的な制御因子であることを世界で初めて明らかにした(越智、竹田ら Proc Natl Acad Sci U S A. 2009)。

以上のような背景より、骨芽細胞から終末分化した骨細胞においても miRNA が重要な生理的意義を有していることは容易に推測することは可能であるが、骨細胞における miRNA の発現、生理的意義に関しては全く不明である。

2. 研究の目的

骨細胞の分化調節機構ならびに生理的機能は未だ不明な部分が多いが、これらを解明するために新たな視点として miRNA に着目した。本研究では、骨細胞特異的に発現する miRNA の同定と、その生理的意義を解明することで骨細胞の分化調節機構を解明する。

3. 研究の方法

遺伝子工学的手法を用いて、骨細胞を標識したマウスを作成し、このマウスを用いて骨細胞ならびに骨芽細胞をそれぞれ単離する。単離した細胞から Total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて骨細胞およ

び骨芽細胞特異的に発現する miRNA を同定する。

4. 研究成果

(1) 骨細胞特異的 Green Fluorescent Protein (GFP) 発現マウスの作成

本検討ではまず、in vivo において骨細胞を visualize することおよび、骨細胞を単離する際に、細胞を標識することを目的として、骨細胞特異的に GFP を発現するマウスを作成した。

骨細胞のマーカー遺伝子である DMP1 のプロモーター下流に Cre 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスと、レポーターマウスである、CAG-CAT-EGFP トランスジェニックマウスとを交配することにより骨細胞特異的に GFP を発現するマウスを作成した(図1)。

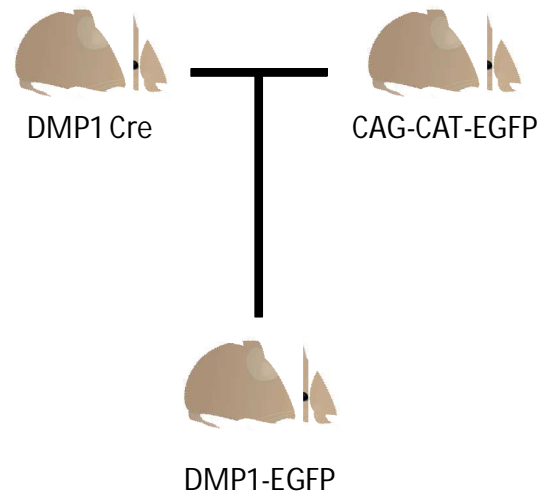


図1 骨細胞特異的GFP発現マウス作成

(2) 骨細胞単離方法の検討

骨細胞の単離には、従来から酵素処理による細胞分散方法が用いられてきた。本方法は、酵素(コラゲナーゼとトリプシン)を用いて、繰り返し骨を酵素処理し、各フラクションごとに細胞を回収し培養する。しかしながら本方法では骨細胞の回収率ならびに生存率が低いことに加え、骨芽細胞のコンタミネーションが必ず生じることが問題であり、より効率的かつ骨細胞のみを単離する方法の考案が必須であった。

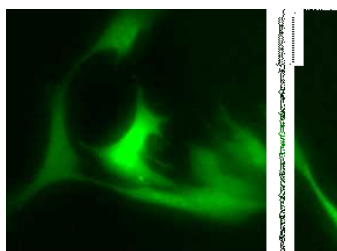
そこで本検討では、前述のとおり作成した、骨細胞特異的に GFP を発現するマウスを用いて、骨細胞単離条件ならびに単離方法を検討した。

骨細胞の単離には、マウス頭蓋骨ならびに四肢の長骨を用いて、これまでに報告され

ているコラゲナーゼとトリプシンによる酵素処理法を一部改変して実施した。実際には、酵素の種類ならびに酵素処理時間を詳細に検討し、回収率ならびに生存率の最も良い条件を以降の実験で使用した。

酵素処理により得られた細胞集団を、FACSを用いたフローサイトメトリーを行い、GFPを標識としてGFP陽性細胞、すなわち骨細胞の単離を行った(図2)。フローサイトメトリーを用いることにより、GFP陽性細胞を確実にソーティングすることが可能であり、この方法を用いることで、従来問題となっていた骨芽細胞のコンタミネーションを防ぐことが可能であると考えられた。

GFP陽性骨細胞



FACSによるGFP陽性骨細胞のソーティング

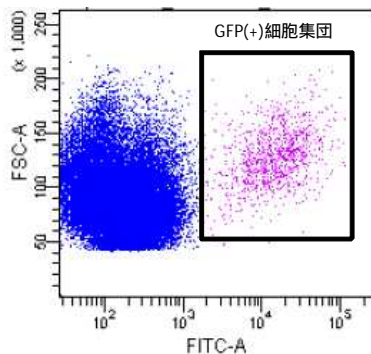


図2 FACSを用いたGFP陽性骨細胞の単離

(3) 単離骨細胞における骨細胞マーカー遺伝子発現

(2)の方法を用いて単離した骨細胞から、total RNAを抽出し逆転写後、Real time PCRによって、骨細胞のマーカーと考えられている遺伝子の発現を解析し、GFP非陽性細胞と比較検討した。

骨細胞のマーカー遺伝子であるDMP1およびSOSTのmRNA発現は、GFP陽性細胞において顕著な増加が認められた。また、これまで破骨細胞分化に必須であるRANKLは、骨芽細胞が主な産生細胞であると考えられていたが、近年骨細胞での産生が重要であるという報告がなされた(Nakashima T. et al., Nat Med 2011)。このことから、本検討においてもRANKLの

mRNA発現を比較検討したところ、GFP陽性細胞において上昇が確認された。一方、骨芽細胞のマーカーであるKeraの発現量は、GFP陽性細胞で顕著に減少していることが明らかとなった。このことから、GFP陽性細胞は骨細胞リッチな細胞集団であることが示され、また、骨芽細胞のコンタミネーションは最小限であると考えられた(図3)。

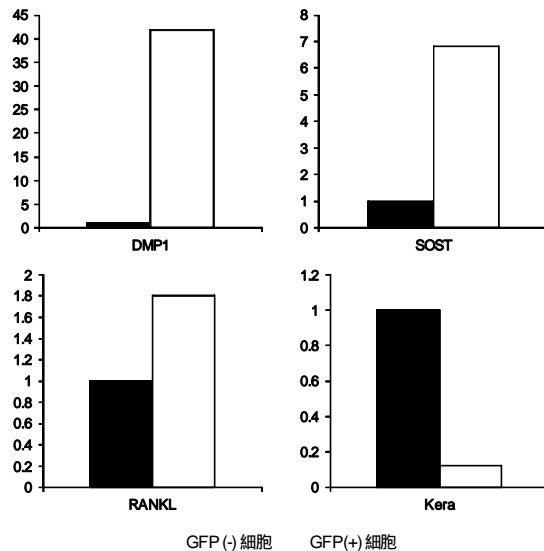


図3 骨細胞マーカー遺伝子のmRNA発現

(4) 次世代シーケンサーを用いた骨細胞特異的に発現するmiRNAの同定

骨細胞は骨芽細胞が終末分化した細胞である。骨芽細胞から骨細胞への分化機構を解明するために、骨芽細胞および骨細胞それぞれに発現する新規miRNAを含むmiRNA発現を次世代シーケンサーを用いて同定する。現在、前述の方法と同様に骨芽細胞特異的にGFPを発現するマウスを作成し、それぞれのマウスから採取した、骨細胞、骨芽細胞からtotal RNAを抽出し、次世代シーケンサーによる発現解析中である。

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4件)

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 Mar 4;18(4):589-94. 査読あり

Hinoi E, Ochi H, Takarada T, Nakatani

E, Iezaki T, Nakajima H, Fujita H, Takahata Y, Hidano S, Kobayashi T, Takeda S, Yoneda Y.

Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia.

J Bone Miner Res. 2012 Apr;27(4):938-49.

査読あり

Ochi H, Hara Y, Asou Y, Harada Y, Nezu Y, Yogo T, Shinomiya K, Tagawa M.

Effects of long-term administration of carprofen on healing of a tibial osteotomy in dogs.

Am J Vet Res. 2011 May;72(5):634-41.

査読あり

Itoh H, Hara Y, Tagawa M, Kato T, Ochi H, Koga D, Okawa A, Shinomiya K, Asou Y., Runx2 expression correlates with the degree of disc aging: a comparison between Magnetic Resonance Imaging and Runx2 expression. Am J Vet Res. in press
査読あり

〔学会発表〕(計1件)

越智広樹、ビタミンEは破骨細胞融合を促進し骨量減少を引き起こす、第13回骨粗鬆症学会 骨ドック・検診分科会、2011.11.4、神戸

〔図書〕(計2件)

越智広樹、竹田秀、医薬ジャーナル社、Clinical Calcium; 特集 骨・関節疾患の動物モデルⅠ.骨粗鬆症 8.骨粗鬆症研究のための遺伝子改変マウス、2011、p74-80

越智広樹、竹田秀、メディカルレビュー社、O.l.i.v.e. 骨代謝と生活習慣病の連関; 腸由来セロトニン合成の薬理的阻害が骨粗鬆症の骨同化治療に使用できる可能性、2011、p30-34

〔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

越智 広樹 (OCHI HIROKI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 30582283