

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791657

研究課題名(和文) マイクロRNAによる骨髄間葉系幹細胞の分化の運命付けに関する統合的研究

研究課題名(英文) The integrated search of mesenchymal stem cell fate determination of differentiation controlled by micro RNAs

研究代表者

水野 洋介 (Mizuno, Yosuke)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30406532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、骨芽細胞分化に重要な役割を持つ転写因子Osterixによって転写制御を受けるマイクロRNAを同定することができた。このマイクロRNAは、骨芽細胞分化を促進する遺伝子を標的として抑制し、またそのマイクロRNA自体の転写がOsterixにより抑制的に制御されていることが分かった。さらにこのマイクロRNAが骨芽細胞分化を負に制御することも明らかとなった。従って、本研究により、骨髄間葉系幹細胞において骨芽細胞の方向性に影響を与えるマイクロRNAを明らかにすることができた。これにより、骨粗鬆症や肥満を含む成人病の発症過程におけるmiRNA関与機構の解明が一段と明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified a microRNA which are transcriptionally regulated by the transcription factor Osterix that have critical roles for osteoblast differentiation. We identified that this microRNA targets the genes which promote osteoblast differentiation and inhibit their function, and transcription of this microRNA itself is negatively regulated by Osterix. Moreover, we also found that this microRNA negatively regulates osteoblast differentiation. Therefore, in this study we found a microRNA that could regulate the fate of mesenchymal stem cells for osteoblast differentiation. This finding further contributes the understanding of pathogenic mechanisms with microRNAs to the life-style diseases such as osteoporosis and obesity.

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

キーワード：骨・軟骨代謝学 非コードRNA 転写制御 細胞分化 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

申請者らは miR-125b がマウス骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を抑制する事を示し、骨芽細胞分化へのマイクロ RNA (miRNA) の関与を世界で初めて明らかにした (Mizuno et al. BBRC 2008)。これを皮切りに他の miRNA が骨芽細胞分化を抑制する事を示す様々な報告がなされてきた。申請者らはさらに miR-210 が骨芽細胞分化を促進する事を示した (Mizuno et al. FEBS Lett 2009)。培養細胞下では TGF- β シグナルが骨芽細胞分化を抑制することが知られていたが、miR-210 は TGF- β /アクチビン受容体を抑制することで、骨芽細胞分化を促進する事を示した。

骨髄間葉系幹細胞は骨芽細胞の他にも脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などに分化する。これらの様々な分化への miRNA の関与について、2007 年には 50 報以上、2008 年以降では年間 100 報を超える論文発表があり、年々増加している。このように世界中で活発に研究が行われていることから、間葉系幹細胞分化における miRNA の重要性は明らかである。骨粗鬆症や肥満などの間葉系幹細胞が関連する成人病に対する治療開発の観点からも、miRNA による細胞分化制御機構の全容を解明することは急務である。

具体的には、現時点で以下のような問題が未解決なままである。

(1) miRNA の分化への関与についての個々の報告では、脂肪細胞や骨芽細胞などのうちの、特定の一方方向への分化の抑制または促進に関する観点にとどまっている。miRNA による他の方向への分化制御を考慮に入れた説明がない。

(2) これまでの研究では、単に分化に関与

する miRNA とその標的遺伝子の解明が中心である。“miRNA 自体が分化時にどのように発現制御を受けているのか”という観点を含めた、miRNA による分化方向の決定づけの機構に関する一連の流れを総合的に理解する研究がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、前述の問題を解明するために、特にヒトとマウスの骨髄間葉系幹細胞の脂肪細胞分化、骨芽細胞分化に焦点を当てて、各方向への分化で重要な役割を持つ PPAR γ 、C/EBP β 、Smad1、Runx2、Osterix などの転写因子 (以下、脂肪細胞・骨芽細胞キー転写因子) が、特定の miRNA の発現を制御することを明らかにする。

3. 研究の方法

miRNA による骨髄間葉系幹細胞の分化方向性決定づけに関する一連のメカニズムを総合的に理解するため、ヒトとマウスの間葉系幹細胞を用い、大きく分けて以下の 3 つのアプローチをとる。

(1) 脂肪細胞・骨芽細胞キー転写因子によって発現調節を受ける miRNA の同定と機能解析。

(2) 上記で同定された miRNA の標的遺伝子とその機能解析。

4. 研究成果

マウス骨髄間葉系幹細胞 ST2 において、骨芽細胞分化の鍵転写因子の一つである Osterix を RNA 干渉法によりノックダウンして得られた RNA サンプルを用いてマイクロ RNA 発現アレイ解析を行った結果、Osterix をノックダウンすることで miR-X が発現上昇する事が見い出された。定量的 RT-PCR 解析により、miR-X およびその前駆体 RNA の発現変動が発現アレイで検出された方向性と合

致することが確認された。また ST2 を骨芽細胞分化誘導して経時的にサンプリングし、miR-X の分化時における発現パターンを定量的 RT-PCR 解析によりモニタリングしたところ、miR-X は細胞継代後分化誘導を行わない培養条件で発現が次第に上昇してくるが、骨芽細胞分化誘導を行った場合には、その上昇の度合いが大きく抑制されることが明らかとなった。

さらに、miR-X 前駆体 RNA のゲノムプロモーター領域をレポーターベクターに挿入し、Osterix の siRNA と共に ST2 細胞に導入してレポーター活性 (転写活性) を定量した。その結果、Osterix 発現を siRNA で抑制すると、miR-X 前駆体の転写活性が増加することが分かった。

一方、公共データベース検索により、骨芽細胞分化を促進する 2 つの遺伝子が miR-X の抑制標的候補として挙げられている事が明らかとなった。また、この内の 1 つについては、脂肪細胞分化を抑制する機能を持つことが報告されているものであった。これらの標的配列部分をレポーターベクターに挿入し、miR-X とともに ST2 細胞に導入したところ、miR-X が対象配列を特異的に抑制する事が明らかとなった。

これらのことから、miR-X は骨芽細胞分化を促進する遺伝子を抑制するマイクロ RNA であるが、その miR-X 自体は骨芽細胞鍵転写因子 Osterix により負の制御を受ける事が分かった。また、このマイクロ RNA の標的遺伝子の一つは脂肪細胞分化を抑制する機能を持つことから、このマイクロ RNA は脂肪細胞分化に対しては正の調節機能を持つ可能性が示唆された。

従って、本研究により、骨髄間葉系幹細胞において骨芽細胞と脂肪細胞分化の方向性に影響を与えるマイクロ RNA を明らかにすることができた。このマイクロ RNA は、脂肪細胞分化を抑制する特定の遺伝子

の機能を抑制し、細胞を脂肪細胞分化しやすくし、それにより骨芽細胞分化を抑制する機能を持つことが分かった。これにより、骨粗鬆症や肥満を含む成人病の発症過程における miRNA 関与機構の解明が一段と明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Masayoshi Kamon, Miyuki Katano, Keiko Hiraki-Kamon, Tomoaki Hishida, Yutaka Nakachi, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki, Ayumu Suzuki, Masataka Hirasaki, Atsushi Ueda, Masazumi Nishimoto, Hidemasa Kato, Akihiko Okuda. Identification of Ccr4-Not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* Epub ahead of print, 2013, 査読あり
2. Tomoaki Hishida, Yuriko Nozaki, Yutaka Nakachi, Yosuke Mizuno, Hiroyoshi Iseki, Miyuki Katano, Masayoshi Kamon, Masataka Hirasaki, Masazumi Nishimoto, Yasushi Okazaki, Akihiko Okuda. Sirt1, p53, and p38 (MAPK) Are Crucial Regulators of Detrimental Phenotypes of Embryonic Stem Cells with Max Expression Ablation. *Stem Cells*. Vol. 30, No. 8, 2012, pp. 1634-1644, 査読あり
3. Tomoaki Hishida, Yuriko Nozaki, Yutaka Nakachi, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki, Masatsugu Ema, Satoru Takahashi, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda. Indefinite

Self-Renewal of ESCs through Myc/Max
Transcriptional
Complex-Independent Mechanisms.
Cell Stem Cell. Vol. 9, No. 1, 2011,
pp. 37-49, 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

1. 水野 洋介、仲地 豊、徳澤 佳美、兼先
- 八塚 由紀子、岡崎 康司. 間葉系幹
細胞分化を調節するキー転写因子によ
る、マイクロ RNA を介した細胞分化制
御. **第 36 回日本分子生物学会年会**.
(2013.12.2-5) 神戸市
2. 水野 洋介、仲地 豊、徳澤 佳美、
八塚 由紀子、岡崎 康司. 脂肪・骨
芽細胞分化を制御する非コード RNA の
探索. **NGS 現場の会第三回研究会**.
(2013.9.3-4) 神戸市
3. Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi,
Yoshimi Tokuzawa, Yukiko
Kanesaki-Yatsuka, Yasushi Okazaki.
Regulation of Adipocyte/Osteoblast
Differentiation by microRNAs That
Are Controlled by Master Regulatory
Transcription Factors. **Keystone
Symposia 2013, RNA Silencing**.
(2013.3.18-24) Whistler, Canada
4. 水野 洋介、仲地 豊、徳澤 佳美、兼
先-八塚 由紀子、岡崎 康司. 間葉系
幹細胞分化のマスターレギュレーター
転写因子による、マイクロ RNA を介し
た細胞分化制御. **第 35 回日本分子生
物学会年会** (2012.12.14-17) 神戸市
5. Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi,
Yoshimi Tokuzawa, Yukiko Yatsuka,
Yasushi Okazaki. Regulation of

differentiation via microRNAs
controlled by master regulator
transcription factors during
adipocyte/osteoblast differentiation.
生命医薬情報学連合大会.
(2012.10.16-18) 東京都

6. 水野 洋介、仲地 豊、徳澤 佳美、八
塚 由紀子、岡崎 康司. 間葉系幹細胞
分化のマスターレギュレーター転写因子
による、マイクロ RNA を介した細胞分化
制御. **第 14 回日本 RNA 学会年会**
(2012.7.17-19) 仙台市
7. Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi, Yoshimi
Tokuzawa, Yukiko Kanesaki-Yatsuka,
Yasushi Okazaki. Regulation of
differentiation via microRNAs
controlled by master regulator
transcription factors during
adipocyte/osteoblast differentiation.
第 34 回日本分子生物学会年会
(2011.12.12-16) 横浜市
8. Yosuke Mizuno, Yutaka Nakachi, Yoshimi
Tokuzawa, Yukiko Yatsuka, Yasushi
Okazaki. The regulation of miRNA
transcription by transcription
factors involved in differentiation of
mesenchymal stem cells. **RNA2011**
(2011.6.14-18) 京都市

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

出願状況

なし

取得状況

なし

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

水野 洋介 (MIZUNO, Yosuke)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30406532

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし