

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 10日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890053

研究課題名（和文） 骨モデリングにおけるマイクロRNAの生理的意義の解明

研究課題名（英文） Physiological roles for microRNAs in bone remodeling

研究代表者

猪瀬 弘之（INOSE HIROYUKI）

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30615711

研究成果の概要（和文）：我々はタンパク質をコードしない小分子RNAに着目し、骨リモデリングにおける機能を検討した。その結果、mir-34が骨芽細胞分化を抑制すること、mir-34を骨芽細胞において欠損させることでその骨量が増加することを明らかにし、マイクロRNAが骨リモデリングの生理的調節因子であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We identified members of the miR-34 family as regulators of osteoblast proliferation and differentiation. Osteoblast-specific gain- and loss-of-function experiments revealed that miR-34 affected bone mass accrual. These results indicate that microRNA is a physiological regulatory factor of bone remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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・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。

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た。特に破骨細胞分化に関しては、骨芽細胞の発現するRANKL、M-CSFが必須であること、シグナル伝達因子TRAFや転写因子NFATc1、NF- κ Bなどにより調節を受けることなど画期的な知見が相次いで報告されている。また、骨形

成に関しては、転写因子 Runx2, Osterix が骨芽細胞の分化に必須であることが示されているものの、Runx2 は未熟骨芽細胞から成熟骨芽細胞に移行する際にはむしろ抑制的に働くなど未だ不明な点が多い。

一方、骨細胞に関する研究は未だ黎明期にある。骨細胞は骨組織の中で最も数が多く、重力などのメカノセンサー、石灰化の調節、マイクロダメージの感知・修復などの多彩な作用を示すと想定されているものの詳細は不明であり、その生理機能、及び調節については謎に包まれている。なかでも、骨芽細胞から骨細胞への分化制御機構に関する研究は、分化調節を再現する適当な細胞モデルが存在しないために、端緒にすらついていない。臨床的にも、破骨細胞研究に比して、骨芽細胞、骨細胞の研究の進展が遅延していることが、現状の骨粗鬆症の治療薬は骨吸収抑制薬が主体である一因とも考えられる。

そこで、我々は新たな視点から骨形成の分子機構を研究すべく、マイクロ RNA (以下 miRNA) に注目した。

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全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞特異的 miRNA トランスジェニックマウス及びノックアウトマウスを組織学的に解析することを通じて、骨リモデリングにおける miRNA の生理的意義の統合的理解を目指す。

3. 研究の方法

1. まず骨芽細胞分化の過程で発現が変動する miRNA をマイクロアレイにて同定した。更に、その全身における発現についてノザンブロット法にて検討した。

2. 1. にて同定した miRNA を 1 型コラーゲンのプロモーターを利用して骨芽細胞特異的に過剰発現するマウスを作成し、その骨量について骨形態計測法を用いて検討した。

3. 1. にて同定した miRNA を骨芽細胞特異的に欠損させたマウスを作成し、その骨量について骨形態計測法を用いて検討した。

4. 研究成果

1. マイクロアレイを用いて、骨芽細胞分化の過程で発現が増強する miRNA として、miR-34 を同定した。また、その発現は骨芽細胞において強発現していた。

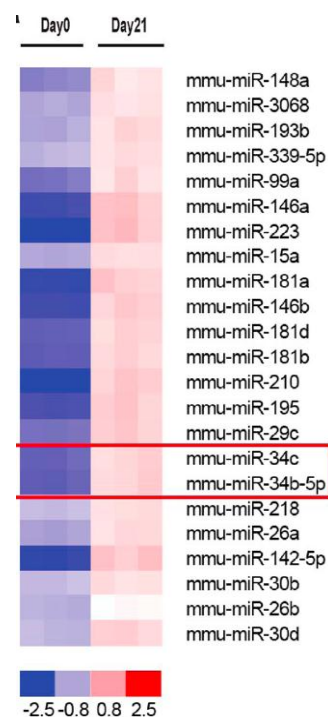


図1. 骨芽細胞分化とともに増加するmiRNA

2. 続いて、miR-34 を骨芽細胞特異的に発現するマウスを作成し、その骨量が骨形成の低下により有意に減少していることを見出した。

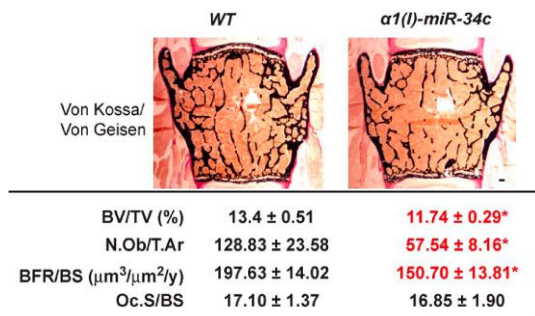


図2 骨芽細胞特異的miRNA過剰発現マウスの骨量は減少する口

3. 更に、miR-34 を骨芽細胞特異的に欠損するマウスを作成し、その骨量が有意に増加していることを見出した。

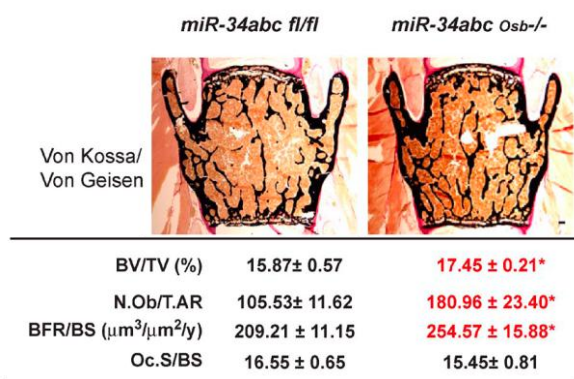


図3 骨芽細胞特異的miRNAノックアウトマウスの骨量は増加する口

4. また、miR-34 の骨芽細胞増殖における標的遺伝子を検索するために in silicoでの検索を行い、標的遺伝子の候補として、cyclin D1 を同定した。そして、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法にて miR-34 が cyclin D1 の 3' UTR 領域に結合することを確認した。

さらに、骨芽細胞において miR-34 を欠損させることにより、cyclin D1 の発現が増加することを確認した。

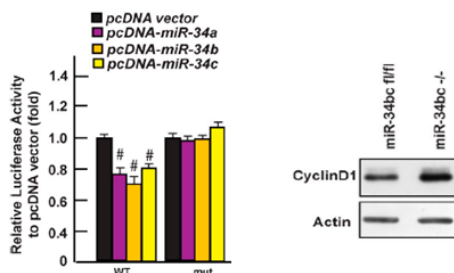


図4 miR-34の骨芽細胞分化における標的はCyclin D1である

5. 最後に、miR-34 の骨芽細胞分化における標的遺伝子を検索するために in silicoでの検索を行い、標的遺伝子の候補として、Satb2 を同定した。そして、ルシフェラーゼレポーターアッセイ法にて miR-34 が satb2 の 3' UTR 領域に結合することを確認した。

さらに、骨芽細胞において miR-34 を欠損させることにより、satb2 の発現が増加することを確認した。

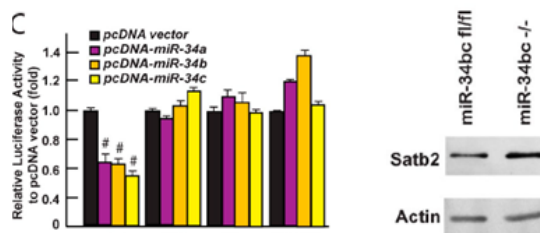


図5 miR-34の骨芽細胞分化における標的はCyclin D1である

以上の結果より、骨リモデリングのうち、特に骨形成において miRNA が重要な役割を果たしていることを見出した。

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 1 件)

JIANWEN WEI, YU SHI, LIFUA ZHENG, BIN ZHOU, HIROYUKI INOSE, JI WANG, EDWARD GUO, RUDOLF GROSSCHEDL, GERARD KARSENTY, miR-34s inhibit osteoblast proliferation and differentiation in the mouse by targeting SATB2. Journal of Cell Biology, 査読あり, Vol.197 No.4, p509-521, www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201201057

[学会発表] (計 1 件)

HIROYUKI INOSE, Regulation of osteoblast differentiation by microRNA. GCOE international research day, 2012/10/30, Tokyo medical and dental university.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪瀬 弘之 (INOSE HIROYUKI)
東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30615711

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：