

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32669

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791565

研究課題名(和文)マイクロRNAによる骨代謝制御の分子機構の解明

研究課題名(英文)The effect of micro RNA in bone remodeling.

研究代表者

越智 広樹(Ochi, Hiroki)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・助教

研究者番号：30582283

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)：本研究ではmiRNAに注目し、骨芽細胞分化ならびに骨細胞分化におけるmiRNAの影響を検討した。骨芽細胞分化において発現が増加するmiRNAを過剰発現すると、骨芽細胞分化が促進された。本miRNAの標的遺伝子を数種同定し、これらを骨芽細胞でノックダウンすると、骨芽細胞分化が促進された。さらに本miRNAをin vivoの異所性骨化モデルに投与すると、対照群と比較して有意な石灰化の促進が観察された。また、骨細胞特異的GFP発現マウスを用いて、骨細胞単離後、骨細胞特異的に発現するmRNAならびにmiRNAを次世代シーケンスを用いて同定した。現在骨細胞における機能解析を実施している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the miRNA, and examined the effect of miRNA in osteoblast and osteocyte differentiation. When miRNA was overexpressed in osteoblast, its differentiation was accelerated. Next, we identified the target genes of this miRNA by in silico analysis. The protein expression of these target genes were decreased by miRNA over-expression. When these target genes were knocked down by siRNA in osteoblast, osteoblast differentiation was promoted. Moreover, the miRNA induced calcification of collagen sponge in mouse heterotopic ossification model. On the other hand, we isolated the osteocyte and osteoblast from osteocyte specific GFP expression mice by using the FACS. We performed next generation sequencing to evaluate the expression of mRNA and miRNA in GFP positive cell (osteocyte). In osteocyte, we identified the some mRNA and miRNA which were higher or lower than osteoblast. We are progressing the evaluation of physiological function of these mRNA and miRNA in osteocyte.

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・軟骨代謝学 マイクロRNA 骨細胞 骨芽細胞

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た。すなわち破骨細胞分化において、骨芽細胞が発現する RANKL、M-CSF が必須であることや、シグナル伝達因子 TRAF6 や転写因子 NFATc1、NF- κ B が重要であることなど画期的な知見が相次いで報告されている。しかし、骨芽細胞に関しては転写因子 Runx2、Osterix がその分化に必須であることが示されているものの未だ不明な点が多い。加えて、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 900 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、骨芽細胞における miRNA は骨芽細胞分化に重要な役割を果たしていると考えられ、新たな骨代謝性疾患の治療ターゲットとなる可能性を秘めている。また同時に、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

本研究では、骨代謝調節機構における miRNA の役割を解明するために、特に骨芽細胞および骨細胞に注目し、骨芽細胞ならびに骨細胞特異的に発現する miRNA を同定する。さらに、その生理的意義を解明する共に、骨芽細胞から骨細胞分化機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

遺伝子工学的手法により、骨細胞を標識した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。さらに同定された miRNA を骨芽細胞、骨細胞の細胞株で過剰発現あるいはノックダウンし、生理的機能を解析する。また、同定された miRNA の標的遺伝子の同定、機能解析を実施する。

4. 研究成果

1) 骨芽細胞分化を正に調節する miRNA の標的遺伝子の同定と機能解析

申請者は、すでに骨芽細胞様細胞株の分化後に発現が増加する miRNA を同定しており、本 miRNA を骨芽細胞様細胞株ならびに初代骨芽細胞において過剰発現すると骨芽細胞分化が促進されることを明らかにした。そこで本研究では本 miRNA の標的遺伝子を同定するとともに、その機能解析を実施した。

まず、*in silico* において、データベース上で標的遺伝子候補を検索し、数種類の遺伝子を標的遺伝子の候補として選択した。これらのうち PCR 法を用いて、骨ならびに骨芽細胞様細胞株で発現が認められたものを最終的に標的遺伝子とした。

miRNA の過剰発現を行うと、これらの候補遺伝子は mRNA レベルでは変化が無いものの、タンパクレベルで発現が抑制されることが明らかとなった。一方、候補遺伝子を siRNA を用いてノックダウンすると、一部の遺伝子で骨芽細胞分化が促進された。

2) *in vivo* における miRNA の骨形成促進効果の評価

申請者が同定した骨芽細胞分化を正に制御する miRNA が *in vivo* においても同様な効果を示すか確認するために、マウス背側に BMP2 を少量含有したコラーゲンスポンジを埋没し、miRNA の有無による骨形成を評価した。14 日間観察後、コラーゲンスポンジを抽出し組織切片を作成、von kossa 染色により石灰化の度合いを比較評価した。その結果、miRNA を添加した群で、有意に石灰化の促進が認められた。この結果は、本 miRNA は生体

においても骨形成促進効果を有することを示しており、骨形成促進薬としての可能性を示唆するものである（現在論文投稿中）。

3) 次世代シーケンサーを用いた骨細胞に特異的に発現する mRNA および miRNA の同定

骨細胞のマーカージン遺伝子である 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）。

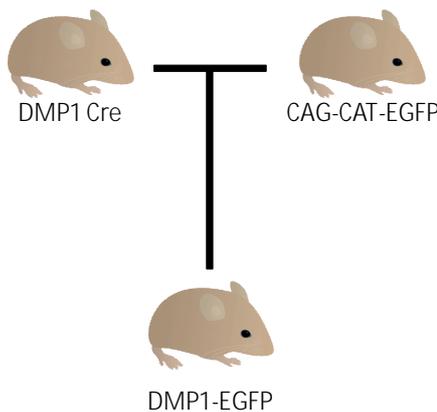


図1 骨細胞特異的GFP発現マウス作成

本マウスから骨細胞および骨芽細胞を酵素処理により分離し、FACS を用いて GFP 陽性骨細胞と骨芽細胞を単離した（図 2）。



GFP陽性骨細胞

FACSによるGFP陽性骨細胞のソーティング

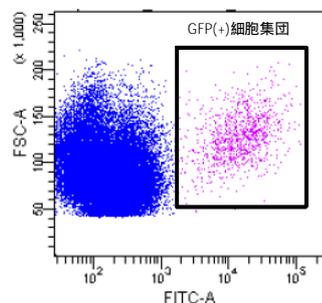


図2 FACSを用いたGFP陽性骨細胞の単離

単離した骨細胞ならびに骨芽細胞から total RNA を抽出し、Real Time PCR により、骨細胞および骨芽細胞が発現するマーカー

遺伝子の発現量を確認した。その結果、GFP 陽性細胞の分画では、骨細胞で発現する遺伝子が高発現しており、一方で GFP 陰性細胞分画では骨芽細胞マーカーの発現が高かった（図 3）。

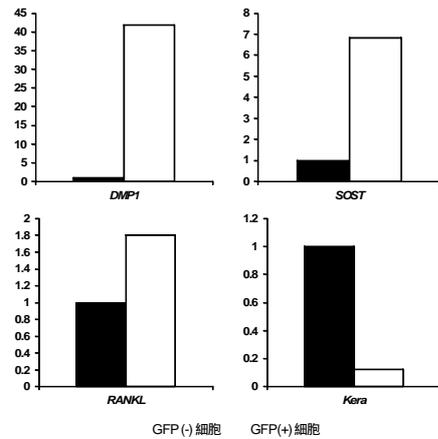


図3 骨細胞マーカー遺伝子のmRNA発現

マーカー遺伝子の発現を確認したサンプルを用いて、次世代シーケンサーにおいて、mRNA-sequence および miRNA-sequence を実施した（図 4）。

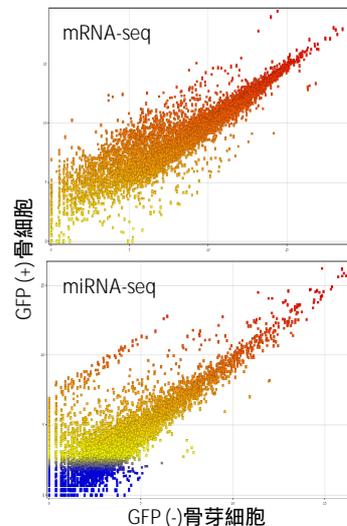


図4 次世代シーケンスを用いた mRNA, miRNA の発現解析

この結果より、骨細胞で発現が高値を示した遺伝子が約 200 種類、低値を示した遺伝子が約 500 種類確認された。一方、miRNA-seq では、骨細胞で高値を示したものが約 300 種類、低値を示したものが約 600 種類抽出された。現在、より詳細な解析を実施し、遺伝子や miRNA の数を更に絞り、発現解析や機能解析を実施している。

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 11 件)

1. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Enterococci Isolated from Dogs and Cats Subjected to Differing Antibiotic Pressures.
Kataoka Y, Ito C, Sasaki A, Ishii M, Yamashiro S, Harada K, Ochi H, Sawada T. *J Vet Med Sci.* 2013 75(6):749-53

2. Clinical efficacy of autogenous cancellous bone and fibroblast growth factor 2 combined with frozen allografts in femoral nonunion fractures.
Akagi H, Ochi H, Kannno N, Iwata M, Ichinohe T, Harada Y, Nezu Y, Yogo T, Tagawa M, Hara Y. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2013 Mar 15;26(2):123-9.

3. An analysis of skeletal development in osteoblast- and chondrocyte-specific Runx2 knockout mice.
Takarada T, Hinoi E, Nakazato R, Ochi H, Xu C, Tsuchikane A, Takeda S, Karsenty G, Abe T, Kiyonari H, Yoneda Y. *J Bone Miner Res.* 2013 Oct;28(10):2064-9. doi: 10.1002/jbmr.1945.

4. Initial Responses of Articular Tissues in a Murine High-Fat Diet-Induced Osteoarthritis Model: Pivotal Role of the IPFP as a Cytokine Fountain.
Iwata M, Ochi H, Hara Y, Tagawa M, Koga D, Okawa A, Asou Y. *PLoS One.* 2013 Apr 12;8(4):e60706. Print 2013.

5. Variations in Gene and Protein Expression in Canine Chondrodystrophic Nucleus Pulposus Cells following Long-Term Three-Dimensional Culture.
Iwata M, Ochi H, Asou Y, Haro H, Aikawa T, Harada Y, Nezu Y, Yogo T, Tagawa M, Hara Y. *PLoS One.* 2013 May 2;8(5):e63120. doi: 10.1371/journal.pone.0063120.

6. Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations.
Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, Shibata S, Yoshida Y, Gu Z, Kimura A, Ma C, Xu C, Bando W, Fujita K, Shinomiya K, Hirai T, Asou Y, Enomoto M, Okano H, Okawa A, Itoh H. *Nature.* 2013 May 23;497(7450):490-3. doi: 10.1038/nature12115.

7. Hydroxyapatite/poly-L-lactide acid screws have better biocompatibility and femoral burr hole closure than does poly-L-lactide acid alone.
Akagi H, Iwata M, Ichinohe T, Amimoto H, Hayashi Y, Kannno N, Ochi H, Fujita Y, Harada Y, Tagawa M, Hara Y. *J Biomater Appl.*

2014 Feb;28(6):954-62. doi: 10.1177/0885328213487754. Epub 2013 May 15.

8. Sirt6 regulates postnatal growth plate differentiation and proliferation via Ihh signaling.

Piao J, Tsuji K, Ochi H, Iwata M, Koga D, Okawa A, Morita S, Takeda S, Asou Y. *Sci Rep.* 2013 Oct 23;3:3022. doi: 10.1038/srep03022.

9. The Role of Individual Domains and the Significance of Shedding of ATP6AP2/(pro)renin Receptor in Vacuolar H(+)-ATPase Biogenesis.

Kinouchi K, Ichihara A, Sano M, Sun-Wada GH, Wada Y, Ochi H, Fukuda T, Bokuda K, Kurosawa H, Yoshida N, Takeda S, Fukuda K, Itoh H. *PLoS One.* 2013 Nov 4;8(11):e78603. doi: 10.1371/journal.pone.0078603.

10. Runx2 haploinsufficiency ameliorates the development of ossification of the posterior longitudinal ligament.

Iwasaki M, Piao J, Kimura A, Sato S, Inose H, Ochi H, Asou Y, Shinomiya K, Okawa A, Takeda S. *PLoS One.* 2012;7(8):e43372. Epub 2012 Aug 21.

11. Procyanidin B3 prevents articular cartilage degeneration and heterotopic cartilage formation in a mouse surgical osteoarthritis model.

Aini H, Ochi H, Iwata M, Okawa A, Koga D, Okazaki M, Sano A, Asou Y. *PLoS One.* 2012;7(5):e37728. Epub 2012 May 22.

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

越智 広樹 (Ochi Hiroki)

日本獣医生命科学大学 助教

研究者番号：30582283

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：