

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462381

研究課題名(和文) マイクロRNAシステムによる包括的骨代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of role of miRNA in bone metabolism

研究代表者

福田 亨 (Fukuda, Toru)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：20301492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：microRNA(miRNA)は骨代謝調節に関わることがわかっているが、その詳細は明らかではない。我々はDEAD-box型RNAヘリカーゼのp68がmiRNAプロセッシング過程における重要な因子であることを明らかにしてきた。そこで、本研究ではmiRNAのプロセッシングに関与するp68の骨組織特異的遺伝子欠損マウスの作成し、骨組織におけるmiRNAの機能解明を試みた。また、骨芽細胞分化調節機能を有する新たなマイクロRNAを同定し機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs(miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate the expression of the target protein by inhibiting the translation or accelerating the degradation of the transcript through binding to the 3'-UTR of those target genes. MiRNAs are important regulators in various developmental, physiological and pathological conditions. Previous reports suggested that miRNAs are also intimately involved in the osteoblast and osteoclast differentiation. In this study, we identified miR-382 as an up-regulated miRNA during osteoblast differentiation. We discovered that miR-382 stimulates osteoblast differentiation by targeting Prps2 and Ddx3x.

研究分野：骨代謝学

キーワード：マイクロRNA

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、一生にわたり形成と破壊を繰り返している。近年の高齢化社会の進展に伴い、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の患者数は飛躍的に増加しているが、その病態の解明や創薬研究については進展していない。従って、骨代謝の分子メカニズムを解明し、その成果を臨床や創薬に還元することが社会的な急務となっている。

骨代謝は間葉系幹細胞を由来とする骨形成を担う骨芽細胞、単球マクロファージを由来とする骨吸収を担う破骨細胞および骨芽細胞に由来する骨細胞により調節されている。近年の分子生物学の進歩により、骨代謝研究は飛躍的に進展しており、骨代謝を担う各細胞群に対する種々のホルモンやサイトカイン類、転写因子等の重要性が明らかにされつつある。しかしながら、骨代謝には未解明な部分が多く、その全貌は未だに明らかとなっていない。

2. 研究の目的

miRNA は標的遺伝子の翻訳を調節することにより様々な生理現象に関与する非コード RNA の一種である。すでに我々は、骨代謝調節に特定の miRNA が重要であることを明らかにした。また、我々は、RNA ヘリカーゼ p68 が miRNA のプロセッシングを包括的に調節することを明らかにした。本研究では、特定の miRNA だけでなく、miRNA システム全体の骨代謝における生理的意義を明らかにすべく、我々が独自に作成した骨組織特異的 p68 欠損マウスの骨の解析を行う。また、これまでも骨代謝に関わる miRNA が報告されてきているが骨代謝に関係する因子の数を考慮すると、まだ同定されていない miRNA の存在が考えられる。そこで、骨代謝調節機能を有する新たな miRNA の同定を行う。これにより miRNA システムによる骨代謝調節機構の全貌を解明し、miRNA を標的とした骨粗鬆症の新たな治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

我々が樹立した p68 flox マウスを用い、骨組織特異的 Cre 発現マウスとの交配を行った。また、骨分化誘導をかけた培養細胞を用い、マイクロアレイにて発現が変動する miRNA の同定を行った。さらに MC3T3-E1 細胞を用い、同定した miRNA の性状解析解析をおこなうと共に *in silico* 解析にて標的遺伝子を探索した。

4. 研究成果

全身性の p68 遺伝子欠損マウスは胎生致死であることが判明している。そこで骨代謝に

おける p68 機能を解明するため、骨組織特異的 p68 遺伝子欠損マウスの作出を試みた。骨組織特異的 p68 遺伝子発現マウスの作出にあたり、骨組織に存在する細胞のうち、最も存在比率の高い骨細胞に着目した。骨細胞特異的 Cre 発現マウスとして DMP1-Cre 発現マウスを用い、我々が樹立に成功した p68 flox マウスと交配を行った。その結果、骨細胞特異的 p68 遺伝子欠損マウスの作出に成功した。

我々の過去の報告により、骨芽細胞においても miRNA が発現し、分化を制御していることが示唆されているが、詳細は不明である。そこで、マイクロアレイ法を用いて骨芽細胞分化時に発現が上昇する miRNA の検索を行ない、複数個の miRNA に成功した。そこで MC3T3-E1 細胞を用い、これら miRNA の骨芽細胞分化に対する作用を検討した。その結果、miR-382 において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活性の上昇を確認した(図1)。また、細胞の石灰化能に対する効果を検討したところ、miR-382 を過剰発現することで石灰化が更新することが明らかとなった(図2)。これらの結果から miR-382 は骨芽細胞分化を亢進させる機能があることが考えられた。

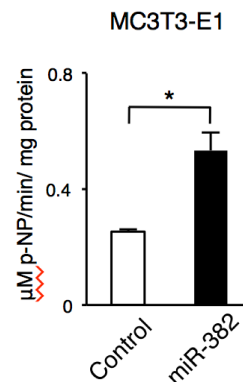


図1 骨芽細胞分化に対するmiR-382の効果

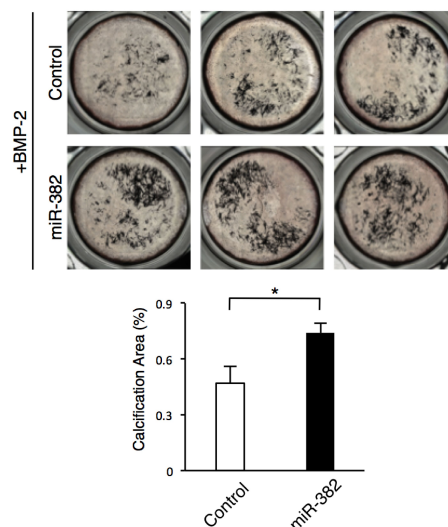


図2 細胞石灰化に対するmiR-382の効果

次に複数の miRNA データベースを用い、miR-382 が標的とする遺伝子の検索を行ったところ、各データベースに共通する数十種類の標的遺伝子候補が抽出された。MiR-382 を細胞に過剰発現し、各標的候補遺伝子のタンパク質レベルをウェスタンブロットにて確認したところ、Prps2 及び Ddx3x の 2 遺伝子について発現の低下が観察された (図 3)。

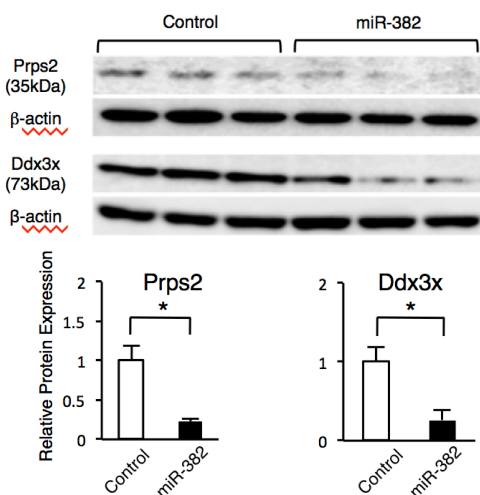


図3 miR-382によるPrps2及びDdx3xの発現抑制

Prps2、Ddx3x の各遺伝子が miR-382 の直接のターゲットであるか否かを確認するため、ルシフェラーゼ遺伝子直下にそれぞれの遺伝子 3' -UTR 中に存在する標的配列を接続したレポーターを作成した。レポーターを導入した培養細胞に miR-382 を過剰発現したところ、各レポーターのルシフェラーゼ活性の有意な低下が観察された (図 4)。これらの結果から、miR-382 は Prps2、Ddx3x を直接の標的とすることが明らかとなった。

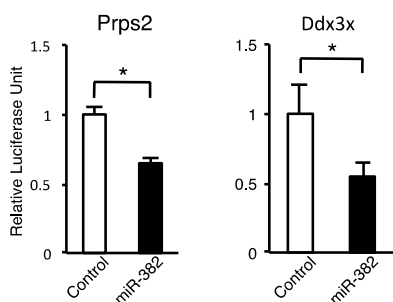


図4 miR-382によるルシフェラーゼ活性の低下

これら一連の研究から、miR-382 は骨芽細胞分化とともに発現が上昇し、Prps2 および Ddx3x を標的として発現を調節することにより、骨芽細胞分化を亢進する機能を有する miRNA であることを見出した。これまでの研究により miRNA は既知の様々な調節機構とともに多種多様な細胞の増殖や分化、発生など

に深く関与していることが明らかとなりつつある。今回の研究結果は骨にも同様 miRNA が関与した複雑な代謝調節系が存在することを示唆している。骨粗鬆症の病態を理解し、治療法や治療薬の開発を進める上でもこの代謝調節機構の解明及び理解の進展が期待される。

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 1 件)

1. **Fukuda T**, Ochi H, Sunamura S, Haiden A, Bando W, Inose H, Okawa A, Asou Y, **Takeda S**. MicroRNA-145 regulates osteoblastic differentiation by targeting the transcription factor Cbfb. **FEBS Lett.** (2015) 589(21): 3302-3308.

[学会発表](計 件)

[図書](計 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

<http://bone-organcrosstalk-tmd.u-tokyo.ac.jp/members.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

福田 亨 (FUKUDA, Toru)

東京医科歯科大学・大学院・助教

研究者番号：20301492

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

竹田 秀 (TAKEDA, Shu)

東京医科歯科大学・大学院・教授

研究者番号：30376727