

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861298

研究課題名(和文) 骨粗鬆症及び骨折の新規治療標的としてのマイクロRNAに関する検討

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic approaches for osteoporosis and osteoporotic fractures by targeting microRNA.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：初代培養骨芽細胞の分化におけるmiRNAの発現について網羅的に検討し、これまでに骨芽細胞分化において報告のないmiRNA-2137の発現が変動することを見出した。そこで、骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1及び初代培養骨芽細胞に対してmiRNA-2137を過剰発現すると、その分化は促進され、逆にノックダウンすることにより、その分化は抑制された。更に、マウス骨髄除去モデルにおいて、骨髄内にmiRNA-2137を注入することにより、有意な新生骨形成の増加を認めた。以上より、miRNAによる骨芽細胞分化の新たな調節機構が明らかとなり、臨床的にも骨形成促進薬としてのmiRNAの可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent progress in bone biology has revealed the precise molecular mechanism behind bone remodeling. However, there are numerous issues yet to be understood.

To this end, we have devoted a considerable amount of time in the studies of the regulation of bone remodeling by microRNA, even while research in the field of microRNA is relatively new.

In this study, we found that the expression of miR-2137 is upregulated during osteoblast differentiation by microarray analysis. Overexpression of miR-2137 promoted osteoblast differentiation in both MC3T3-E1 cells and the primary mouse osteoblast. On the contrary, knockdown of miR-2137 inhibited osteoblast differentiation. Moreover, administration of miR-2137 into bone marrow accelerated bone regeneration after bone marrow ablation in vivo. These results indicate that modulating expression of miRNA can lead to new therapeutic approaches in the treatment for osteoporosis and osteoporotic fractures.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 骨粗鬆症 骨形成

1. 研究開始当初の背景

人間の骨量は骨形成を担う骨芽細胞及び骨吸収を担う破骨細胞の代謝を調整する機構(リモデリング)により維持される。近年の分子生物学の発展により、骨リモデリングの分子レベルでの理解が進んだが、不明な点も多く残されている。そこで、申請者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)に注目してきた。

本研究では、これまでの知見の蓄積を生かして、骨粗鬆症や骨折といった疾患における治療標的としての miRNA について検討し、それら疾患における新たな治療戦略を構築することを目的とする。

2. 研究の目的

これまでに申請者らは、骨芽細胞に特定の miRNA を過剰発現することで骨芽細胞の分化が抑制されること、逆に miRNA の発現を抑制することで骨芽細胞分化が促進されること、さらに骨芽細胞特異的に miRNA を過剰発現したトランスジェニックマウスの骨量が著明に減少することを見出した(Inose et al, Proc Natl Acad Sci U S A 2009)。また、最近では骨芽細胞特異的に miRNA を欠損したノックアウトマウスの骨量が有意に増加することを見出した(Wei et al, J Cell Biol 2012)。

そこで、本研究では、マウス骨形成モデルである骨髄除去マウスを作成し、そのマウスにおいて骨形成に重要であると考えられる miRNA の発現を局所で制御することにより、miRNA による骨形成への影響について検討する。

3. 研究の方法

骨芽細胞分化の過程において発現する新規 miRNA の同定

マウス頭蓋冠由来の初代培養骨芽細胞に対して BMP2 を投与し、その分化の過程において発現が変動する miRNA についてマイクロアレイにて網羅的に検討する。

miRNA の機能解析(in vitro)

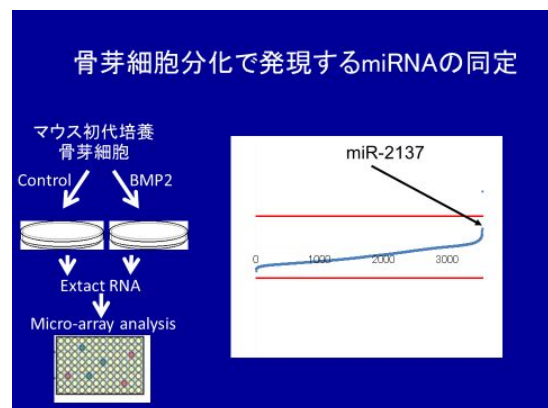
In vitro において、骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)にて同定した miRNA を過剰発現およびノックダウンし、アルカリフォスファターゼ活性、リアルタイム PCR 法を用いて miRNA の機能解析を行う。続いて、web 上の検索プログラム(target scan, pictar 等)を用いて同定された miRNA の標的候補遺伝子を in silico で検索する。更に、得られた標的候補遺伝子の発現をそれら細胞においてリアルタイム PCR 法及び western blotting 法により mRNA レベル、蛋白レベルで確認することで in vitro での真の標的遺伝子を同定する。

miRNA の機能解析(in vivo)

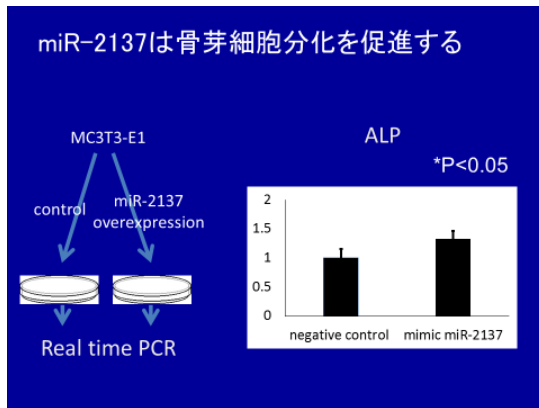
同定された miRNA をマウス骨髄除去モデルの骨髄に局所投与し、miRNA の骨形成過程に与える影響についてマイクロ CT にて検討する。

4. 研究成果

マイクロアレイでの網羅的な解析により、これまでに骨芽細胞分化において報告のない miRNA-2137 の発現が骨芽細胞分化とともに変動することを見出した。

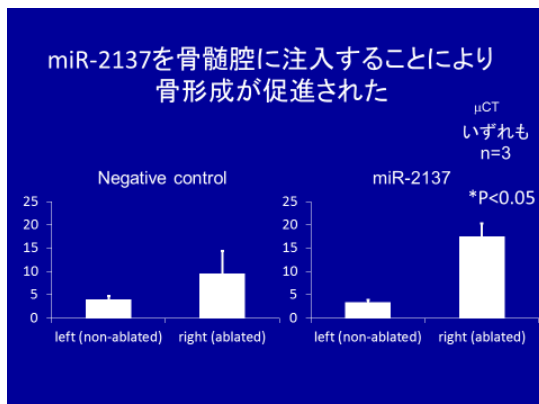


そこで、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 及び初代培養骨芽細胞に対して miRNA-2137 を過剰発現することにより、その分化は促進された。逆に、MC3T3-E1 に対して miRNA-2137 の発現をノックダウンすることにより、その分化は抑制された。



また、qPCR 法により、実際に骨芽細胞において miRNA-2137 が発現していることを確認した。

更に、マウス骨髄除去モデルにおいて、骨髄内に miRNA-2137 を注入することにより、negative control 群と比較して新生骨形成の有意な増加が認められた。



以上より、miRNA による骨芽細胞分化の新たな調節機構が明らかとなり、臨床的にも骨形成促進薬としての miRNA の可能性が考えられた。

また、miR-2137 の骨芽細胞分化における標的因子については in silico での解析により SLC12A5、PSD といった遺伝子が候補として考えられた。それら遺伝子の miR-2137 による調節についてはレポーターアッセイ及び Western blotting にて現在解析中であり、今後学会等にて報告していく予定である。

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 7 件)
英文

Inose H (corresponding author), Araya N, Kato T, Saito M, Sumiya S, Yamada T, Yoshii T, Kawabata S, Okawa A. A spinal deformity caused by hyper IgE syndrome. J Neurosurg Spine. 2014 Aug;21(2):292-5. 査読有

Ukegawa D, Kawabata S, Sakaki K, Ishii S, Tomizawa S, Inose H, Yoshii T, Kato T, Enomoto M, Okawa A. Efficacy of biphasic transcranial electric stimulation in intraoperative motor evoked potential monitoring for cervical compression myelopathy. Spine (Phila Pa 1976). 2014 Feb 1;39(3):E159-65. 査読有

Yoshii T, Yamada T, Hirai T, Taniyama T, Kato T, Enomoto M, Inose H, Sumiya S, Kawabata S, Shinomiya K, Okawa A. Dynamic changes in spinal cord compression by cervical ossification of the posterior longitudinal ligament evaluated by kinematic computed tomography myelography. Spine (Phila Pa 1976). 2014 Jan 15;39(2):113-9. 査読有

Inose H (corresponding author), Sasaki K, Kawabata S, Yoshii T, Kato T, Saito M, Okawa A. Combined surgical and radiosurgical treatment for a symptomatic cervical metastasis in a case of malignant paraganglioma: a case report. BMC Res Notes. 2013 Dec 1;6:494. doi: 10.1186/1756-0500-6-494. 査読有

Yoshii T, Yuasa M, Sotome S, Yamada T, Sakaki K, Hirai T, Taniyama T, Inose H, Kato T, Arai Y, Kawabata

S, Tomizawa S, Enomoto M, Shinomiya K, Okawa A. Porous/dense composite hydroxyapatite for anterior cervical discectomy and fusion. Spine (Phila Pa 1976). 2013 May 1;38(10):833-40. 査読有

Egawa S, Yoshii T, Sakaki K, Inose H, Kato T, Kawabata S, Tomizawa S, Okawa A. Dural closure for the treatment of superficial siderosis. J Neurosurg Spine. 2013 Apr;18(4):388-93. 査読有

和文

猪瀬弘之、山田剛史、牛尾修太、吉井俊貴、加藤剛、川端茂徳、大川淳. 脊椎固定術を施行した骨粗鬆症患者における、週一回投与型 PTH 製剤と連日投与型 PTH 製剤の骨癒合及び骨リモデリングへの影響についての比較検討.

Osteoporosis japan. 2014 22 (3):542-545. 査読無

〔学会発表〕(計9件)

Inose H, Investigation of predicting factors for nonunion after spinal fusion surgery、WCO-IOF-OSCEO, 2015/03/27, Milan(Italy).

猪瀬弘之、脊椎固定術における骨癒合遷延予測因子としての骨リモデリング率の提案、第34回日本骨形態計測学会、2015/06/13、北海道

齊藤正徳、猪瀬弘之、後縦靭帯骨化症(OPLL)の進展・発生に関する遺伝子の検索. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会、2014/10/09、鹿児島

猪瀬弘之、マイクロRNAを標的とした閉経後骨粗鬆症の新規治療法の開発、神澤財団第16回講演会、2014/05/30、東京

Inose H, Bone remodeling ratio (BRR) as a predicting factor for non-union after spinal fusion. The 87 th Annual

Meeting of the Japanese Orthopaedic Association、2014/05/24、Kobe

猪瀬弘之、脊椎固定術後の骨癒合率改善に向けて、第43回日本脊椎脊髄病学会、2014/04/17、京都

齊藤正徳、猪瀬弘之、後縦靭帯骨化症の発生、進展に関する遺伝子の検索. 第43回日本脊椎脊髄病学会、2014/04/17、京都

齊藤正徳、猪瀬弘之、後縦靭帯骨化症(OPLL)の進展・発生に関する遺伝子の検索. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会、2013/10/18、千葉

齊藤正徳、猪瀬弘之、加藤剛、吉井俊貴、山田剛史、谷山崇、角谷智、榎本光裕、早乙女進一、川端茂徳、大川淳: 後縦靭帯骨化症の発生、進展に関する遺伝子の検索. 第42回脊椎脊髄病学会、2013/04/19、沖縄

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪瀬弘之 (Hiroyuki Inose)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30615711