

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11848

研究課題名(和文) 硬組織微小環境におけるコラーゲン発現調節に関する非コードRNA、転写因子機能解析

研究課題名(英文) Analysis of non-code RNAs and transcription factors for the regulation of collagen gene expression in the microenvironment of the hard tissues.

研究代表者

吉岡 秀克 (Yoshioka, Hidekatsu)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：00222430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨や歯の硬組織にはハイドロキシアパタイトと共にコラーゲンが存在し細胞の微小環境を形成している。本研究では転写レベルに加えて転写後の調節について解析した。その結果、骨芽細胞において、コラーゲン線維のコアを形成するV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖のmRNAの3' UTRにマイクロRNA(miR)のmiR-29bが結合し、発現を抑制していることを見出した。また、長鎖非コード(lnc)RNAがI型コラーゲンの発現調節に関与することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コラーゲンは体タンパクの約30%を占め、特に硬組織の主成分であり、コラーゲン遺伝子からコラーゲン線維形成までのメカニズムを解明することは極めて重要である。コラーゲンは骨や歯の強度に直接関与するものであり、高齢化社会を迎え、骨粗鬆症や歯牙の劣化や喪失等が医療において問題視されるなかで、本研究はこれらの再生医療につながる研究である。

研究成果の概要(英文)：Collagens are major constituents of microenvironment of the hard tissues such as the bone and the dentin. Type I collagen with other minor type of collagens forms the collagen fibrils to perform cell proliferation and migration of the osteoblasts and the odontoblasts. The gene expression is regulated in the many steps. We have mainly investigated the transcriptional regulation of the collagen genes. In the present study, we examined translational gene regulation. Non-coding-protein RNAs, microRNA, long non-coding RNA, and circular RNA, regulate the gene expression. MicroRNAs are approximately 20-25 nucleotides in length and act as negative regulators of target genes. The results showed that miR-29b regulates the Col5a1 gene expression through binding to the 3' UTR in the osteoblasts. lncRNAs, which are several hundred nucleotides in length, are also regulate the gene expression. The expression of type I collagen was thought to be regulated by a couple of lncRNAs.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：コラーゲン発現 非コードRNA マイクロRNA 長鎖非コードRNA 硬組織 細胞外マトリックス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

硬組織はハイドロキシアパタイト及び有機物質のコラーゲン、非コラーゲン物質のプロテオグリカン等より成る。これらの物質は骨芽細胞や象牙芽細胞の分化や再生等の微小環境(ニッチ)として重要である。中でもコラーゲンは硬組織の“鉄筋コンクリート”に例えられ、複数コラーゲン分子が高分子会合体を作っている。コラーゲンは体タンパク質の約30%を占め、骨、象牙質ではI型コラーゲンが量的に最も多く(メジャーコラーゲン分子)存在するが、コラーゲン線維はこのI型分子だけでなく、量的に少ないマイナーコラーゲン分子であるV型等のコラーゲン分子種が架橋し会合体を形成し、コラーゲン線維を形成している。

私たちは現在まで、長年、コラーゲンの発現について解析を行ってきた。その一次構造を決定し、主に骨、象牙質、軟骨に発現するコラーゲン遺伝子を中心に、その発現や機能に関する知見を報告してきた。特にV/XI型コラーゲンに属する α 鎖の遺伝子発現調節機構に関し、 $\alpha 1(V)$ 、 $\alpha 3(V)$ 、 $\alpha 1(XI)$ 鎖遺伝子のプロモーター領域にはCBF/NF- κ Bが結合して、正に調節していることを証明した。この転写因子はI型コラーゲン遺伝子の転写にも関与しており、コラーゲン線維形成に必須であることを示した。

骨芽細胞や象牙芽細胞は間葉系細胞より分化する。Sp7/Osterixは骨芽細胞分化の特異的に働く転写因子である。私たちはこの転写因子が $\alpha 2(I)$ 、 $\alpha 1(V)$ 、 $\alpha 3(V)$ 鎖遺伝子のプロモーター領域に存在するSp1結合部位の1箇所に結合することを見だし、特異的転写因子による遺伝子の調節を証明した。

2. 研究の目的

遺伝子が発現して蛋白を生成しそれが機能するまで多くの調節ステップが存在する。上記したように私たちはコラーゲン遺伝子がコラーゲンタンパクを生成するまでの過程において、転写調節における解析を行ってきた。今回、本研究においては転写後の調節を解析するため非コードRNAに注目した。非コードRNAにはマイクロRNA(miR)、長鎖非コード(lnc)RNA、環状(circ)RNAが存在する。マイクロRNA(miR)は約20-25塩基よりmRNAと塩基対を形成し、転写後の遺伝子の発現を調節していることが知られている。一方、長鎖非コード(lnc)RNAは数100塩基より成るRNAであり、環状(circ)RNAは線状でなく環状になったRNAであり、同様に発現調節に関与することが知られている。本研究では硬組織の微小環境を形づくるコラーゲンの発現調節について、転写因子による転写調節に加え、転写後の因子の関与について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1)培養細胞: マウス線維芽細胞(NIH-3T3)、マウス骨芽細胞(MC3T3-E1)、ヒト骨芽細胞(Saos-2)細胞株を用いた。骨芽細胞の分化には β -グリセロールを用い、7日間、或いは21日間培養した。
- (2)網羅的遺伝子発現解析: 上記3種類の細胞株に発現する長鎖非コード(lnc)RNA、及びマウス線維芽細胞(NIH-3T3)に発現する環状(circ)RNAを網羅的に調べた。
- (3)リアルタイムRT-PCR法: 各種遺伝子のmRNAの定量を行った。
- (4)ウェスタン・ブロット法: V型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖のタンパクの発現量を調べた。
- (5)強制発現実験: 長鎖非コード(lnc)RNAを細胞に導入し、コラーゲン、オステオカルシン、アルカリホスファターゼの発現量を調べた。
- (6)siRNAによる発現抑制実験: 各種長鎖非コード(lnc)RNAに対するsiRNAを細胞に導入し、遺伝子発現の抑制を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロ RNA(miR)によるコラーゲン発現調節機構の解析

V型コラーゲンは骨や歯の硬組織にマイナーコラーゲンとして存在し、コラーゲンの線維の直径の調節に関与している。私たちは現在まで miR-29b が V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の発現を mRNA レベルで抑制していることを見出した。引き続き、当期間内にはタンパクレベルでの変化を解析した。骨芽細胞(NIH-3T3)に miR-29b を強制発現させると V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖は減少し、逆に miR-29b の siRNA を導入すると増加した(図1)。今までとの結果を合わせ、論文を作成した(Zhang JJ et al, Connective Tissue Res, 2018)。コラーゲン $\alpha 1(V)$ 鎖の発現には転写因子のみならず、マイクロ RNA(miR)である miR-29b が関与していることを証明した。

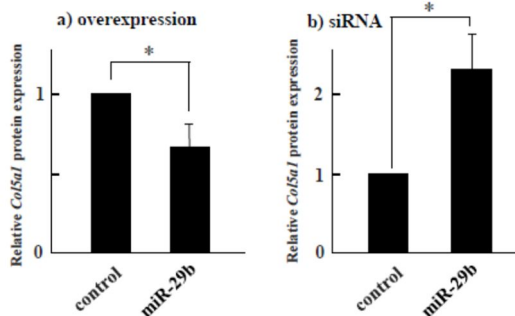


図1：コラーゲン $\alpha 1(V)$ 鎖の発現 (* $p < 0.05$)

(2) 骨芽細胞における長鎖非コード(lnc)RNAの発現

非コード RNA である長鎖非コード(lnc)RNAの硬組織環境におけるコラーゲンの発現調節を解析するために、まず、マウス骨芽細胞(MC3T3-E1細胞)における長鎖非コード(lnc)RNAの発現を網羅的に調べた。89種類の長鎖非コード(lnc)RNAを調べた結果、非硬組織の線維芽細胞(NIH-3T3細胞)に比し、発現が2倍以上増加しているものが12種類、逆に半分以下に減少しているものが35種類であった。その中で、増加がみられた7種類について解析を進めた。骨芽細胞を β -グリセロールで分化を行い、21日間培養し、骨化のマーカーにはオステオカルシン(OC)を用いた。その結果、1種類を除いて、分化につれて長鎖非コード(lnc)RNAの発現が増加した。また、ヒト骨芽細胞(Saos-2細胞)についても発現が増加する長鎖(lnc)RNAが複数見られた。マウス、ヒトに共通に増加がみられる長鎖非コード(lnc)RNAを3種類選んで、オステオカルシン(OC)、アルカリホスファターゼ(ALP)、I型コラーゲンの発現に関し調べた。 β -グリセロールを用い、7日間培養し、各々の長鎖非コード(lnc)RNAの siRNA で発現阻止実験を行った。この3種類において同様な結果を得た。図2にその中の一種類の長鎖非コード(lnc)RNA(lncRNA-X)におけるI型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖(図2a)、 $\alpha 2$ 鎖(図2b)を示す。両鎖の mRNA は分化によって増加し、lncRNA-Xの siRNA の導入によってその発現は低下した。

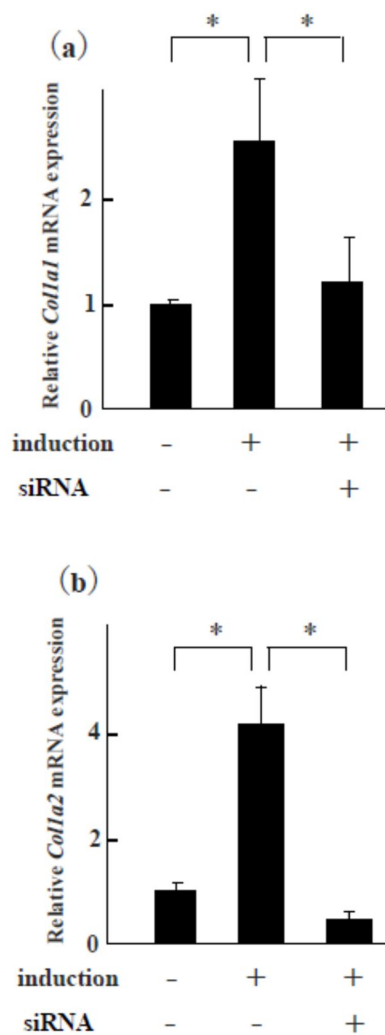


図2：長鎖非コード(lnc)RNA-X・siRNAによるI型コラーゲン発現の抑制 (* $p < 0.05$)

(3) 環状(circ)RNAの発現

環状(circ)RNAはマイクロRNA(miR)、長鎖非コード(lnc)RNAと同様に非コードRNAであり、遺伝子発現の調節に関与が知られている。最終年度に間葉系細胞であるマウス線維芽細胞(NIH-3T3)を用いて網羅的にその発現を調べた。高発現が見られた環状(circ)RNAにおいては硬組織におけるコラーゲン発現に関与する可能性がある。

(4) 結果のまとめ

本研究においては骨芽細胞を用いて、非コード RNA によりコラーゲン遺伝子の発現調節による結果を得た。V 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の発現には転写因子と共に miR29-b1 が関与していることを証明した。骨芽細胞の分化において、3種類の長鎖非コード(lnc)RNA が I 型コラーゲンの発現に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhang JJ, Yano H, Sasaki T, Matsuo N, Yoshioka H	4. 巻 59
2. 論文標題 The pro- $\alpha 1(V)$ collagen gene (Col5a1) is coordinately regulated by miR-29b with core promoter in cultured cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Connect Tissue Res	6. 最初と最後の頁 263-273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03008207.2017.1370465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、矢野真美、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 骨芽細胞分化における長鎖非コード（lnc）RNAの機能解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、矢野真美、松尾哲孝、吉岡秀克
2. 発表標題 骨芽細胞分化における長鎖非コード（lnc）RNAの発現
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢野博之、濱中良志、松尾哲孝、甲斐浩一、吉岡秀克
2. 発表標題 骨芽細胞における長鎖非コード（lnc）RNAの発現
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Juan Juan Zhang, Hiroyuki Yano, Takako Sasaki, Noritaka Matsuo, Hidekatsu Yoshioka
2. 発表標題 The pro- $\alpha 1(V)$ collagen gene (Col5a1) is coordinately regulated by mir-29b with core promoter in cultured cells.
3. 学会等名 第49回日本結合組織学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松尾 哲孝 (Matsuo Noritaka) (10284788)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	佐々木 隆子 (Sasaki Takako) (30133193)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	
研究分担者	矢野 博之 (Yano Hiroyuki) (50448552)	大分大学・医学部・客員研究員 (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------