

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670822

研究課題名(和文) ストレス刺激に応答するmiRNAと口腔内への分泌の解明

研究課題名(英文) The elucidation of miRNAs in response to stress stimuli and its secretion into an oral cavity

研究代表者

市川 哲雄 (ICHIKAWA, Tetsuo)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90193432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： マウス骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1細胞)への圧縮応力負荷(CF)により発現が変動するmiRNAを同定した。CFとCFiにより発現上昇するmiR-494-3pの過剰発現はMC3T3-E1細胞の増殖を抑制した。MC3T3-E1細胞でのmiR-494-3pの標的がFgfr2、Rock1であり、それらの発現抑制が細胞増殖を抑制することを確認した。以上より、MC3T3-E1細胞における圧縮応力誘導性miR-494-3pは、Fgfr2とRock1の発現抑制を介して細胞増殖を阻害することが示された。今回同定した圧縮応力誘導性のmiRNAの唾液中分泌について継続的に検討していく。

研究成果の概要(英文)： In the present study, we attempted to identify miRNA in response to mechanical stress in MC3T3-E1 cells, a mouse osteoblast-like cell line, and to elucidate its functions.

We identified miRNAs whose expression was changed in MC3T3-E1 cells subjected to compressive force at 294 Pa for 24 h. Treatment with compressive force and overexpression of miR-494-3p, a miRNA up-regulated by compressive force, in MC3T3-E1 cells inhibited the cell proliferation. Furthermore, we demonstrated that Fgfr2 and Rock1 were targets of mi494-3p in MC3T3-E1 cells, and their knockdown inhibited the cell proliferation.

We concluded that compressive force affected expressions of several miRNAs including miR-494-3p in MC3T3-E1 cells. Compressive force might inhibit cell proliferation in MC3T3-E1 cells by up-regulating miR-494-3p followed by Fgfr2 and Rock1 gene repressions. For further study, we will investigate whether these miRNAs induced by compressive force exist in saliva.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：microRNA メカニカルストレス 細胞増殖 MC3T3-E1細胞

### 1. 研究開始当初の背景

生体は、日常活動および生活環境において様々なストレスに曝されており、各組織が細胞レベルにおいて、その環境を受容し、機能および形態的に変化し適応している。中でも骨組織におけるメカニカルストレスは、最も重要な外的因子の1つと考えられ、メカニカルストレスの強度によって骨モデリング/リモデリングが変化するというFrostのメカノスタット理論が広く支持されている。例えば、微少重力環境や長期臥床によるメカニカルストレスの不足は廃用性に骨吸収を生じさせ、逆に過度の咬合力やトレーニングは骨形成を促進させる。この理論は歯科補綴学領域においても重要であり、特に歯根膜を持たないインプラントは、咬合によるメカニカルストレスが直接的に骨組織へ影響を及ぼすことが考えられる。つまり、骨組織に対するメカニカルストレスの影響についての分子基盤の解明はインプラントの生存率に寄与することが期待される。

骨組織に対するメカノバイオロジーは細胞レベルでの研究が多数報告されている。骨組織には、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞、ライニング細胞が存在するが、中でも骨基質の添加および石灰化を担う骨芽細胞はメカニカルストレス応答細胞として重要な役割を担う。様々なメカニカルストレスが骨芽細胞の増殖・分化の要因であることが知られており、そのシグナル分子の解明が進んでいる。一方、近年転写後に作用する遺伝子発現制御因子としてmicroRNA (miRNA) が注目されている。miRNAは約18-25塩基のnon-coding RNAで、標的mRNAの3'-非翻訳領域(UTR)に相補的に結合することで、mRNAの分解または翻訳の抑制を行い、細胞増殖、細胞分化、発生など多くの細胞プロセスに関与する。骨芽細胞においても、miRNAは細胞増殖・分化を制御する因子として作用していることが知られている。よって、メカニカルストレスによる骨芽細胞の遺伝子発現の変動にもmiRNAが関与している可能性が高い。

### 2. 研究の目的

本研究では、圧縮応力(Compressive force: CF)を負荷したマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1細胞)で変動するmiRNAの同定し、そのmiRNAのMC3T3-E1細胞における機能解析を試みた。

### 3. 研究の方法

#### 【細胞培養】

まず、MC3T3-E1細胞を10% FBS (Vita) 添加MEM $\alpha$ 培地(和光純薬)にて、6穴ディッシュでコンフルエントまで培養した。次に、重りを入れたガラスシリンダーを細胞上へ静置し、24時間持続的にCF処理を行った。圧縮強度は過去の文献および実験を参考に294 Pa

に設定した。

#### 【miRNAマイクロアレイ解析】

ISOGEN II (ニッポンジーン)を用いて、細胞よりtotal RNAを抽出し、100 ngのtotal RNAをCyanine3-pCpで標識後、Agilent Technologies oligonucleotide microarray (Agilent Technologies)へのハイブリダイゼーションを行った。Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies)でシグナルを読み取り、Software Feature Extraction (Agilent Technologies)にて定量後、Gene Spring GX (Agilent Technologies)にて解析を行った。

#### 【定量的PCR】

miRNAのcDNA合成およびPCRには、miScript PCR system (QIAGEN)を用いた。PCRのフォワードプライマーは各miRNAに特異的なものを、リバープライマーはキットに付随するユニバーサルプライマーを使用した。mRNAのcDNA合成には、PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ)を、PCRには、各遺伝子特異的プライマーとTHUNDERBIRD<sup>TM</sup>SYBR qPCR Mix (東洋紡)を用いた。これらを用い、7300 real time PCR system (Applied Biosystems)にて定量的PCRを行った。内部標準としてmiRNAではsnoRNA420、mRNAではTATA-binding proteinの発現量を同時に測定し、各遺伝子発現の補正に用いた。

#### 【細胞増殖測定】

MC3T3-E1細胞を $5.0 \times 10^3$ 個/穴ずつ24穴ディッシュへ播種し、24時間後に50 nM miR-494-3p mimic (Life Technologies)、negative control oligonucleotide (Life Technologies)、30 nM Fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2)、Rho-associated coiled-coil kinase 1 (ROCK1)に対するsmall interference RNA (siRNA) (Sigma)、negative control siRNA (Sigma)をHiPerFect (QIAGEN)にて導入した。導入後、0、24、48、72、120時間後の細胞活性をCell Counting Kit 8 (同仁化学)を用いて測定した。また、CFを24時間負荷したMC3T3-E1細胞をトリプシン処理により回収後、遠心し、 $5.0 \times 10^3$ 個/穴ずつ24穴ディッシュへ再播種した。再播種後、3、24、48、72、96時間後の細胞活性を同様に測定した。

#### 【miRNA標的遺伝子候補の予測】

同定したmiRNAの標的遺伝子を、miRDB ([www.mirdb.org](http://www.mirdb.org))、Target Scan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org))、micro-RNA.org ([www.microrna.org](http://www.microrna.org))の3種のデータベースにて検索し、標的遺伝子の予測を行った。

#### 【ウェスタンブロット】

細胞より溶解バッファー(50 mM Tris pH 8、150 mM NaCl、0.5% NP-40)を用いてタンパク質を抽出した。電気泳動後、PVDF膜(Immobilon Transfer Membrane; Millipore)に転写し、ブロッキング処理後、FGFR2 (Santa Cruz)、ROCK1 (Santa Cruz)、 $\beta$ -actin (Sigma)の各抗体で一次抗体処理、HRP標識抗マウスIgG抗体(GE Healthcare)で二次抗体処理を行

った。洗浄後、Immobilon Western (Millipore)を用い、X線フィルムに感光させた。得られたタンパク質のバンド密度をImage J software (NIH)にて定量した。

【ルシフェラーゼアッセイ】

Fgfr2またはRock1 mRNAのmiR-494-3p結合予測部位を含む3'-UTRをMC3T3-E1細胞のcDNAよりPCRで増幅し、pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega)のホタルルシフェラーゼ遺伝子下流へサブクローニングした。このクローンを鋳型に各結合予測部位を欠損させた変異DNAのレポーターベクターをPCR変異導入法により作製した。これらのレポーターベクターとmiR-494-3p mimicまたはNegative ControlをEffectene Transfection Reagent (QIAGEN)を用いてHEK293細胞へ導入し、Dual Luciferase Assay Kit (Promega)およびTriStar LB 941 Multi-label plate readerにてルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はホタルルシフェラーゼによる発光強度をウミシイタケルシフェラーゼによる発光強度で標準化したものを用いた。

【統計処理】

各データは、平均値±標準偏差で表した。統計処理をstudent's t-testで行い、P値が5%以下 ( $p < 0.05$ ) を有意とした。

4. 研究成果

【実験1：CF負荷にて発現変動するmiRNAの同定】

MC3T3-E1細胞へ294 Paの持続的CFを24時間負荷し、変動するmiRNAをmiRNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。コントロール群 (CF未処理群) と比較してCF負荷群では、55種類のmiRNAの発現上昇と57種類のmiRNAの発現低下が認められた。発現上昇を認めたmiRNAの内、ヒトとマウス間で保存されているmiRNA14種について、定量的PCRにより発現変動の検証を行ったところ、CF負荷群でmiR-494-3p, miR146a-5p, miR-210-3p, miR-1247-3pの有意な発現上昇が確認できた (図1)。この中で、MC3T3-E1細胞で発現量が多く、変動も顕著であったmiR-494-3pに着目し、骨芽細胞における機能について検討を行った。

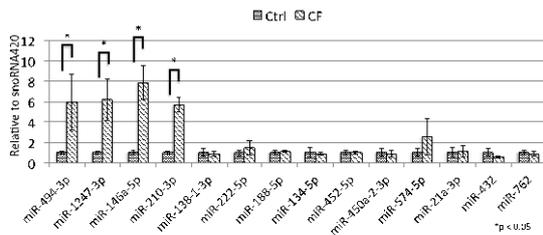


図1

【実験2：miR-494-3p mimicまたはCF負荷の細胞増殖能への影響】

miR-494は様々な細胞種で細胞増殖への関与が報告されている。そこで、CF処理に

よるmiR-494-3p発現上昇がMC3T3-E1細胞の細胞増殖にどのような影響を及ぼすか検討した。MC3T3-E1細胞へmiR-494-3p mimicを導入すると、導入後72時間以降において細胞増殖の抑制が認められた (図2A)。さらに、CF負荷はコンフルエントの細胞へ行われるため、細胞増殖の検討は困難であると考えられた。そこで、CF負荷後のMC3T3-E1細胞をトリプシン処理により一度回収し、再播種した際の細胞増殖を検討した。また、再播種後もmiR-494-3pの高発現が持続しているか確認するため、定量的PCRも併せて行った。CF負荷後再播種した細胞は、48時間以降で細胞増殖の抑制を示した (図2B)。

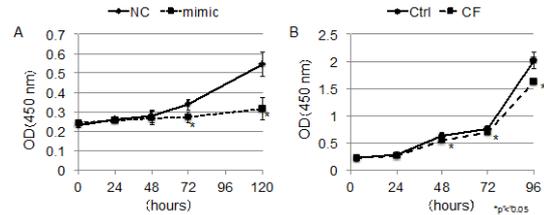


図2

これらの細胞では再播種後12時間の時点においてもCF負荷によるmiR-494-3pの発現上昇が認められた (図3)。

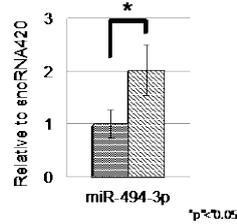
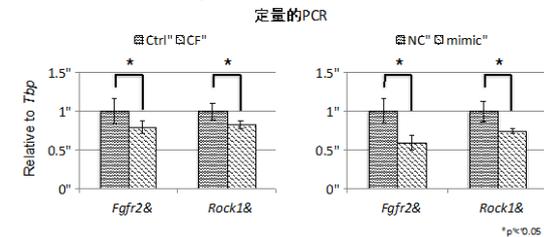


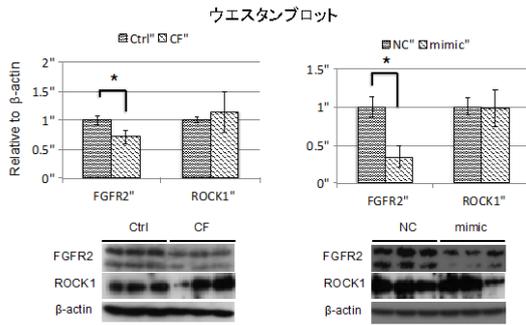
図3

これらより、CF負荷およびmiR-494-3pの高発現は、MC3T3-E1細胞で細胞増殖に抑制的に働くことが明らかとなった。

【実験3：miR-494-3pの標的遺伝子の同定】

3種のデータベースを用いたin silico解析において、miR-494-3pの標的遺伝子候補を検索した。3種のデータベース全てで予測されていた候補の中で、ヒトおよびマウス間で保存されており、細胞増殖に関する報告があるFgfr2、Rock1に着目し、CF負荷またはmiR-494-3p mimicを導入したMC3T3-E1細胞でのFgfr2、Rock1のmRNAおよびタンパク質の発現を定量的PCRとウェスタンブロット解析により検討した。CF負荷またはmimic過剰発現は、Fgfr2のmRNA発現とタンパク質発現の両方を低下させた。一方、Rock1はmRNAレベルのみで発現抑制が認められた (図4)。





(図4)

次に*Fgfr2*と*Rock1*の発現低下が骨芽細胞の細胞増殖に影響を及ぼすか検討したところ、*Fgfr2*あるいは*Rock1*に対するsiRNAを導入したMC3T3-E1細胞では、細胞増殖の抑制が認められた。さらに*Fgfr2*と*Rock1*遺伝子の両方の発現低下は相乗的な細胞増殖抑制作用を示した (図5)。

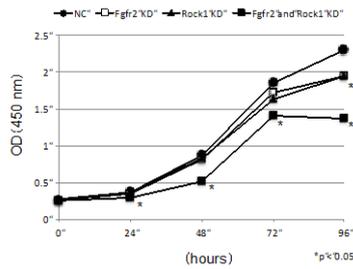


図5

以上より、miR-494-3pの標的として*Fgfr2*および*Rock1*が確認でき、細胞増殖へ影響を与えていることが明らかとなった。

【実験4：miR-494-3pの結合部位の同定】

*Fgfr2*、*Rock1* mRNAの3'-UTRには、それぞれ2カ所のmiR-494-3p結合部位が存在することがmiRDBのアルゴリズムにより予測された(図6A)。*Fgfr2*、*Rock1* mRNAの3'-UTR (WT) と結合予測部位の片方あるいは両方を欠損させたルシフェラーゼレポーターベクターを作製し (図6B)、これらとmiR-494 mimicを共導入しHEK293細胞のルシフェラーゼアッセイを行うことで、miR-494-3pによる発現抑制に必要な領域の同定を試みた。

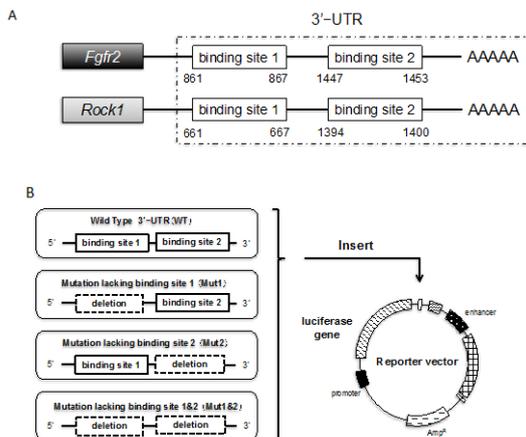


図6

*Fgfr2*においては、Mut1&2以外においてルシフェラーゼ活性の低下が認められた。一方、*Rock1*ではMut1&2とMut1ではルシフェラーゼ活性の低下が認められず、WTとMut2において活性の低下が認められた (図7)。

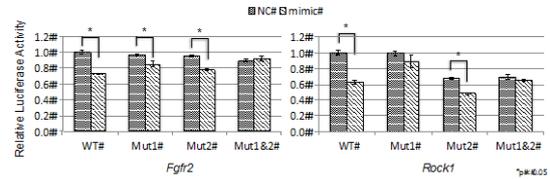


図7

以上より、miR-494-3pによる*Fgfr2*遺伝子の発現抑制には、2つの結合予測部位の両方が必要で、*Rock1*遺伝子の発現抑制には5'側の結合予測部位のみが必要であることが示された。

【総括】

今回の実験結果より、MC3T3-E1細胞へ294 Paの圧縮応力を24 時間負荷した際、誘導されるmiRNAとしてmiR-494-3p、miR-1247-3p、miR-146a-5p、miR-210-3pが同定された。また、その中でmiR-494-3pは、*Fgfr2*および*Rock1*を直接標的とすることで、MC3T3-E1細胞の増殖能へ関与することが明らかとなった (図8)。

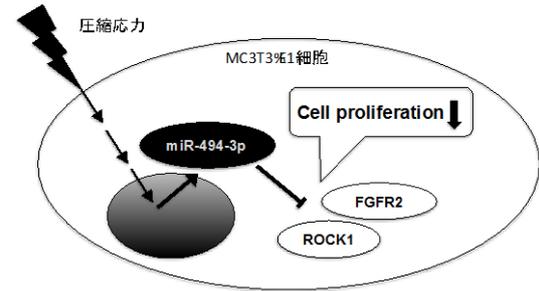


図8

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)

Yuki Iwawaki, Noriko Mizusawa, Takeo Iwata, Nobuaki Higaki, Takaharu Goto, Megumi Watanabe, Yoritoki Tomotake, Tetsuo Ichikawa, Katsuhiko Yoshimoto  
MiR-494-3p induced by compressive force inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 cells

Journal of Bioscience and Bioengineering, Received 25 December 2014; Accepted 6 February 2015; Available online 17 March 2015 (査読有り)

〔学会発表〕(計 6件)

1. 岩脇有軌, 檜垣宜明, 後藤崇晴, 渡邊 恵, 友竹偉則, 市川哲雄  
圧縮力誘導性microRNAと機能の検討-

- miR-494-3pによる細胞増殖抑制 -  
益社団法人日本補綴歯科学会第124回学  
術大会 2015.5.31 大宮ソニックシテ  
ィ (埼玉県・大宮市)
2. Yuki Iwawaki, Noriko Mizusawa,  
Tomotake Yoritoki, Ichikawa Testuo,  
Katuhiko Yoshimoto  
Mechanical stress - responsive  
micro-RNA  
The 3rd ASEAN plus and TOKUSHIMA  
Joint International Conference on  
“Strategic Achievement of Oral Sciences  
and Promotion of Quality of Life” 2014.12.  
4-5 Makassar, Indonesia
3. 岩脇有軌、水澤典子、小野信二、岩田武男、  
吉本勝彦  
メカニカルストレス応答性miR-494-3pに  
よるFGFR2発現の抑制  
第56回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2014.9.25-27 福岡国際会議場 (福岡県・  
福岡市)
4. 岩脇有軌、水澤典子、水頭英樹、後藤崇晴、  
渡邊 恵、友竹偉則、市川哲雄  
メカニカルストレス応答性micro-RNA -  
miR-494-3pはFGFR2の発現を抑制する -  
公益社団法人日本補綴歯科学会第123回学  
術大会 2014.5.24-25 仙台国際センター  
(宮城県・仙台市)
5. 岩脇有軌、後藤崇晴、渡邊 恵、友竹偉則、  
市川哲雄  
メカニカルストレスに応答するmicroRNA  
の同定  
第43回 公益社団法人 日本口腔インプラ  
ント学会・学術大会 2013.09.13-15 福岡国際  
会議場 (福岡県・福岡市)
6. 岩脇有軌、水澤典子、岩田武男、小野信二、友竹  
偉則、市川哲雄、吉本勝彦  
機械的刺激応答性miRNAの同定  
第5回 日本RNAi研究会 2013.08.29-31 グ  
ランドプリンスホテル広島 (広島県・広島  
市)

[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：  
出願年月日：  
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

市川哲雄 (ICHIKAWA, Tetsuo)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：90193432

(2) 研究分担者

吉本勝彦 (YOSHIMOTO, Katsuhiko)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：90201863

友竹偉則 (TOMOTAKE, Yoritoki)  
徳島大学・病院・准教授  
研究者番号：70263853

水澤典子 (MIZUSAWA, Noriko)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：80254746