

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15542

研究課題名(和文) 長鎖ncRNAによる骨芽細胞分化に対する調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of regulatory role of osteoblast differentiation by long noncoding RNA

研究代表者

猪瀬 弘之 (Inose, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30615711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨量の維持には、骨形成及び骨吸収を調整する機構が必要であるが、その分子機構には未だ不明な点が多い。我々は長鎖ノンコーディングRNA(以下長鎖ncRNA)に注目し、骨リモデリングにおけるその役割について検討した。間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化においていくつかの長鎖ncRNAの発現が変動していた。そのうち我々は、CRNDEに注目した。CRNDEの発現は骨芽細胞分化の過程と共に増加した。また、CRNDEの発現を抑制すると、骨芽細胞分化は有意に抑制された。更にCRNDE欠損マウスを作成した。今後は骨形態計測を行い、CRNDEの骨リモデリングにおける働きについて更に明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Recently, long non-coding RNAs (lncRNAs) have been shown to regulate various developmental and metabolic events. Osteoblast differentiation is an indispensable process in proper skeletal development and acquisition of bone mass, however, the physiological role of lncRNAs in osteoblast differentiation have not yet to be fully understood. Here, we found that CRNDE is an important regulator of this process through comprehensive analysis of lncRNAs expression during osteoblast differentiation by RNAseq. CRNDE was expressed in osteoblasts, and its expression increased over the course of osteoblast differentiation. Overexpression of CRNDE in osteoblasts promoted their differentiation, and on the opposite side, deletion of CRNDE expression inhibited osteoblast differentiation. Finally, we established CRNDE knockout mice using CRISPR/Cas9, and will continue to investigate its phenotype in further research. Our data shows that lncRNA is an important regulator of osteoblast differentiation.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 ノンコーディングRNA 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

骨リモデリングは、骨において分泌される因子による局所調節とホルモンによる全身的な調節によりコントロールされており、それらの機構が破綻することにより骨粗鬆症が生じる。したがって、適切な骨量を維持するために、骨のリモデリングの機序の解明が急務である。

しかしながら、骨リモデリングの分子機構に関しては未だ不明な点も多く、その解明にあたり、既存の手法ではなく、新しい視点からのアプローチが必要であると考えられている。そのため、申請者らはこれまで、新たな遺伝子発現の調節因子として注目されているマイクロ RNA による骨代謝の調節機構について検討を行ってきた (Inose et al. PNAS 2009, Wei and Inose et al. J Cell Biol 2012 など)。長さ 20 塩基程度のノンコーディング RNA であるマイクロ RNA が過去 5 年余りの間にきわめて詳細な解析が行われ、新たな遺伝子発現抑制機構が明らかとなりつつあるのに比べ、それ以外の ncRNA、特に長鎖 ncRNA の機能解析は一向に進んでいないのが現状である。もちろん、これまでのところ、骨代謝領域、特に骨芽細胞での長鎖 ncRNA の意義は明らかでない。

申請者らは長鎖 ncRNA が骨芽細胞の分化、増殖、機能を調節するとする仮説をたてた。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨芽細胞分化における長鎖 ncRNA の意義について明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞分化において変動する長鎖 ncRNA の探索・同定

BMP2 を投与して骨芽細胞に分化誘導したマウス間葉系幹細胞である ST2 から RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、骨芽細胞分化の過程にお

いて発現が変動する長鎖 ncRNA を同定する。

(2) 骨芽細胞における長鎖 ncRNA の発現の確認

定量的 RT-PCR により長鎖 ncRNA の発現をマウス初代培養骨芽細胞及びマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 において確認する。そして、定量的 RT-PCR により骨芽細胞分化過程における長鎖 ncRNA の発現の変動について検討する。

(3) 長鎖 ncRNA の機能解析

長鎖 ncRNA をゲノム配列上より PCR 法により切り出し、CMV ベクターを利用したプラスミドベクター及びアデノウイルスを利用して骨芽細胞及びセルラインの細胞に遺伝子導入を行い、その影響をアルカリフォスファターゼ活性及び real time PCR 法にて検討する。さらに抑制系の実験でも長鎖 ncRNA の作用について確認することが必要と考えられる。具体的には長鎖 ncRNA に対する siRNA をカチオン系の試薬を用いて骨芽細胞もしくはセルラインの細胞に導入して長鎖 ncRNA の発現を抑制し、その影響をアルカリフォスファターゼ活性及び real time PCR 法にて検討する。

(4) 長鎖 ncRNA 欠損マウスの作成および組織学的検討

ゲノム編集技術を用いて、長鎖 ncRNA 欠損マウスを作成し、骨形態計測を行い、その表現型について検討する。

4. 研究成果

ST2 の骨芽細胞への分化においていくつかの長鎖 ncRNA の発現が変動していた。そのうち我々は、CRNDE (Colorectal Neoplasia Differentially Expressed) に注目した。CRNDE の発現は骨芽細胞分化の過程と共に増加した。また、CRNDE の発現を抑制すると、

骨芽細胞分化は有意に抑制された。

最後に、ゲノム編集技術を用いて CRNDE 欠損マウスを作成した。マウスは現在 f0 世代であり、今後研究を継続し、論文発表を行っていく予定である。

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 10 件)

Yoshii T, Hirai T, Yamada T, Inose H, Kato T, Sakai K, Enomoto M, Kawabata S, Arai Y, Okawa A. Intraoperative evaluation using mobile computed tomography in anterior cervical decompression with floating method for massive ossification of the posterior longitudinal ligament. J Orthop Surg Res. (査読あり) 2017 Jan 19;12(1):12. doi: 10.1186/s13018-017-0515-1.

Yoshii T, Hirai T, Sakai K, Sotome S, Enomoto M, Yamada T, Inose H, Kato T, Kawabata S, Okawa A. Anterior Cervical Corpectomy and Fusion Using a Synthetic Hydroxyapatite Graft for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. Orthopedics. (査読あり) 2017 Mar 1;40(2):e334-e339. doi: 10.3928/01477447-20161208-02.

Inose H (corresponding author), Kawabata A, Ukegawa D, Kawabata S, Yamada T, Okawa A. A foreign body granuloma after the usage of polyglycolic acid mesh and fibrin glue for dural repair. A case report. J Orthop Sci. (査読あり) 2017 Mar;22(2):371-374. doi: 10.1016/j.jos.2015.08.003.

Inose H (corresponding author), Yamada T, Mulati M, Hirai T, Ushio S, Yoshii T, Kato T, Kawabata S, Okawa A.

Bone Turnover Markers as a New Predicting Factor for Non-union After Spinal Fusion Surgery. Spine (Phila Pa 1976). (査読あり) 2016 Nov 22. [Epub ahead of print]

Yoshii T, Sakai K, Hirai T, Yamada T, Inose H, Kato T, Enomoto M, Tomizawa S, Kawabata S, Arai Y, Okawa A. Anterior decompression with fusion versus posterior decompression with fusion for massive cervical ossification of the posterior longitudinal ligament with a $\geq 50\%$ canal occupying ratio: a multicenter retrospective study. Spine J. (査読あり) 2016 Nov;16(11):1351-1357. doi: 10.1016/j.spinee.2016.07.532.

Yamada T, Yoshii T, Hirai T, Inose H, Kato T, Kawabata S, Okawa A. Clinical Outcomes of Spinal Surgery for Patients Undergoing Hemodialysis. Orthopedics. (査読あり) 2016 Sep 1;39(5):e863-8. doi: 10.3928/01477447-20160509-06.

Yoshii T, Hirai T, Sakai K, Inose H, Kato T, Okawa A. Cervical pedicle screw placement using intraoperative computed tomography imaging with a mobile scanner gantry. Eur Spine J. (査読あり) 2016 Jun;25(6):1690-7. doi: 10.1007/s00586-016-4508-2.

Yamada T, Yoshii T, Egawa S, Takada R, Hirai T, Inose H, Kato T, Jinno T, Okawa A. Drain Tip Culture is Not Prognostic for Surgical Site Infection in Spinal Surgery Under Prophylactic Use of Antibiotics. Spine (Phila Pa 1976). (査読あり) 2016 Jul 15;41(14):1179-84. doi: 10.1097/BRS.0000000000001503.

Saito M, Mulati M, Talib SZ, Kaldis P, Takeda S, Okawa A, **Inose H** (corresponding author). The Indispensable Role of Cyclin-Dependent Kinase 1 in Skeletal Development. Sci Rep. (査読あり) 2016 Feb 10;6:20622. doi: 10.1038/srep20622.

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. (査読あり) 2015 Oct 24;589(21):3302-8. doi: 10.1016/j.febslet.2015.09.024.

〔学会発表〕(計 10 件)
国際学会

Inose H: Bone turnover markers as a predicting factor for nonunion after spinal surgery. The 90th annual meeting of the Japanese Orthopaedic Association. May 2017. Sendai(Japan)
Inose H: The impact of Sarcopenia on the results of spinal surgery. WOF-IOF-OSCEO, Mar 2017. Florence(Italy)

Inose H: Investigation of predicting factors for nonunion after spinal fusion. The 89th annual meeting of the Japanese Orthopaedic Association. May 2016. Yokohama (Japan)

Inose H. The cell cycle regulation of chondrocyte proliferation. ASBMR, Oct 2015. Seattle(U.S.A.)

国内学会

齋藤 正徳、**猪瀬 弘之**、大川 淳 Cdk1 は骨格形成に必須である 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

猪瀬 弘之、山田 剛史、平井 高志、吉井俊貴、川端 茂徳、大川 淳、椎インストゥルメンテーションにおける骨癒合遷延の予測因子の検討 第 25 回日本脊椎インストゥルメンテーション学会、2016、長崎ブリックホール(長崎市長崎県)

猪瀬 弘之、山田 剛史、平井 高志、吉井俊貴、川端 茂徳、大川 淳、腰椎疾患におけるサルコペニアの関与及びその治療成績 第 24 回日本腰痛学会、2016、甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)
猪瀬 弘之、齋藤 正徳、大川 淳 後

縦靭帯骨化症の進展・発生に関する遺伝子の検索 第 45 回日本脊椎脊髄病学会、2016 幕張メッセ(千葉県千葉市)
猪瀬 弘之、大川 淳 サルコペニアの病態における腰椎疾患の関与 第 45 回日本脊椎脊髄病学会、2016 幕張メッセ(千葉県千葉市)
猪瀬 弘之 第 38 回日本分子生物学会年会 細胞周期制御因子による骨格形成の調節機構 2015 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔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：
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

猪瀬 弘之(Inose, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・大学院整形外科学・助教

研究者番号：30615711