

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：32707

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09870

研究課題名(和文) 骨密度関連SNPs近隣由来のmiRNAsによる骨代謝制御の検討

研究課題名(英文) Regulation of bone metabolism by miRNAs located near the osteoporosis-related SNPs

研究代表者

嶋田 昌子 (Shimada, Masako)

相模女子大学・栄養科学部・教授

研究者番号：30637369

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)：超高齢化社会において高齢者の骨粗鬆症等の疾患が増加し、本人や介護者の負担が増加している。従って、こうした疾患の新規の病因や治療法を明らかにすることは重要である。近年、ゲノムワイド関連解析(GWAS)は遺伝子と疾患の特性を関連付けてきたが、マイクロ(mi)RNAなどの遺伝子のコードに関与しないRNAの疾患への寄与は未だよくわかっていない。本研究は、GWASデータから骨密度関連の一塩基多型の近隣に由来するmiRNAを同定し、これらの骨代謝に及ぼすメカニズムを解明することを目的とした。結果、385の一塩基多型を抽出し、内在する136の遺伝子と、近隣の37個のmiRNAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、ヒトの骨密度関連の一塩基多型とそれが内在する遺伝子や近在するmiRNAsをゲノムワイドに各種の公開データベースを中心に使って抽出し、系統的に機能を推定した。したがって、本研究から引き出されたデータの客観性、再現性は高いことが推定される。また、本研究の概念は、骨粗鬆症のみならずその他の疾患についても応用可能であること、また、例えば骨粗鬆症と合併し易いことが臨床的に知られている変形性関節症などの疾患との共通の制御因子やメカニズムの解明などへと発展性も高く、研究意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：The prevalence of diseases such as osteoporosis among the elderly is increasing in Japan; this leads to an increased burden on both the affected individuals and their caregivers. Therefore, it is critical to elucidate the novel etiology and treatment methods for such diseases. In recent years, genome-wide association studies (GWAS) have been associating genes with disease traits; yet, the contribution of non-coding RNA, such as microRNAs (miRNAs), to the gene-disease interactions remains poorly understood. This study aims to identify miRNAs derived from single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in proximity to bone density-related loci using GWAS data and elucidate the mechanisms, by which the miRNAs contribute to bone metabolism. As a result, we extracted 385 SNPs and identified 136 associated genes and 37 miRNAs in their vicinity.

研究分野：内科学ー代謝学

キーワード：骨・カルシウム代謝 SNPs miRNA 骨粗しょう症

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化する日本の社会背景の中、高齢者特有の疾患、たとえば、骨粗鬆症に伴う大腿骨頸部や転子部の骨折が増加し、今後もこのトレンドが続くことが予測される。また、こうした骨折や変形性膝関節症などの関節疾患で介護が必要になる人が20%弱にものぼり、臨床の現場において深刻な問題になってきた。したがって、こうした疾患の新規の病因の解明や、治療法を考える事は将来的にますます高齢化に向かう日本社会のニーズを思うと非常に重要である。

近年、多くのゲノムワイド関連解析(genome-wide association study; GWAS)が行われ、新規遺伝子と疾患との関わりを関連付けてきた。しかし、microRNA (miRNA)などのnon-coding RNAがこうした遺伝子と疾患の関連にどのように関与しているのかは未だ十分には解明されていない。miRNAは約22塩基長の1本鎖RNAで、一般に標的遺伝子の3' UTRに不完全な相同性をもって結合し、標的mRNAを不安定化して翻訳抑制を行い、結果としてタンパク質産生を抑制することで発生、細胞増殖および細胞分化、アポトーシス等の広範な生物学的機能に重要な役割を担うことが知られてきた (*Nature*, 2004)。例えば、コレステロールと中性脂肪の代謝を調節している一塩基多型 (SNP) の近隣に由来するmiRNAがゲノムワイドに検討され、それらの標的遺伝子 (*LDLR*, *ABCA1* 等)への分子制御機序が報告された (*Nature Med*, 2015)。同様の戦略を骨・軟骨代謝の領域に応用することで、骨密度関連のGWAS databaseからゲノムワイドに広く、かつ網羅的に疾患に寄与するmiRNAを同定し、それらによる骨粗鬆症の新規疾患調節メカニズムを解明する鍵となる可能性に注目した。

### 2. 研究の目的

GWAS databaseから得られた骨密度関連の一塩基多型 (SNP) の近隣に由来する miRNAをゲノムワイドに同定し、これらの骨代謝、特に骨粗鬆症の病態に寄与するメカニズムを解明すること。

### 3. 研究の方法

長期的な究極の目的は、骨密度関連のGWASのdatabaseからゲノムワイドに骨密度に関与するmiRNAsを同定し、これらによる疾患調節メカニズムを系統的に解明することである。本課題では、以下の2つの課題について検討する。

**課題1.** 骨密度関連SNPsの近隣に由来し、骨密度を制御する標的遺伝子を持つ可能性が示唆された5つのmiRNAの評価を行う。

**課題2.** 評価されたmiRNAの骨代謝における役割とその作用メカニズムを検討する。

### 4. 研究成果

**課題1.** 骨密度関連SNPsの近隣に由来し、骨密度を制御する標的遺伝子を持つ可能性が示唆された5種のmiRNAの評価を行う。

ヒトの骨密度関連のGWASのデータベース (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) からゲノムワイドに385個のSNPsを抽出し、それぞれのSNPが内在する136個の遺伝子と、近隣100kbp以内に由来する37個のmiRNAsを同定した (<https://www.mirbase.org/>) (表1)。

表1. 骨密度関連の GWAS 論文の網羅的検索により抽出された SNP と関連遺伝子、SNP の近隣 100kbp 以内に存在する miRNA

| 染色体 | SNP 数 | 関連遺伝子数 | 遺伝子名  | SNP 近隣の miRNA 数 | miRNA (hsa-mir-)                 |
|-----|-------|--------|---|-----------------|----------------------------------|
| 1   | 32    | 6      | <i>WNT4</i> , <i>WLS</i> , <i>DNM3</i> , <i>KCNH1</i> ,<br><i>LOC105372926</i> , <i>FMN2</i>  | 5               | 4418, 1262, 214,<br>3120, 199a-2 |
| 2   | 30    | 10     | <i>SLC8A1</i> , <i>PKDCC</i> , <i>SPTBN1</i> ,<br><i>ARHGAP25</i> , <i>CTNNA2</i> , <i>TCF7L1</i> ,<br><i>GALNT3</i> , <i>LOC 100506124</i> , <i>PLCL1</i> ,<br><i>DGKD</i> | 2               | 8080, 4771-2                     |
| 3   | 16    | 4      | <i>LOC105377045</i> , <i>USF3</i> , <i>LINC00886</i> ,<br><i>LEKR1</i>  | 1               | 4446                             |
| 4   | 13    | 2      | <i>IDUA</i> , <i>FGFRL1</i>   | 0               |                                  |
| 5   | 12    | 4      | <i>MEF2C</i> , <i>SRP19</i> , <i>CEP120</i> , <i>CSNK1G3</i>  | 0               |                                  |
| 6   | 37    | 7      | <i>SUPT3H</i> , <i>LOC105377989</i> , <i>RSPO3</i> ,<br><i>EYA4</i> , <i>CCDC170</i> , <i>ESR1</i>  | 2               | 586, 588                         |

|    |     |     |  |    |  |
|----|-----|-----|--|----|--|
| 7  | 44  | 12  | JAZF1, <b>AQP1</b> , NME8, DYNC111, SEM1, ZKSCAN5, TSPAN12, CPED1, <b>WNT16</b> , FAM3C, <b>ABCF2</b> , <b>SMARCD3</b>   | 1  | <a href="#">671</a>  |
| 8  | 11  | 3   | ZMAT4, <b>TNFRSF11B</b> , COLEC10  | 0  |  |
| 9  | 8   | 3   | <b>PATCH1</b> , LOC1053762, <b>FUBP3</b>   | 1  | <a href="#">6856</a>   |
| 10 | 12  | 6   | <b>MPP7</b> , LOC105378305, KCNMA1, LOC105378481, TACC2, <b>PLEKHA1</b>  | 2  | <a href="#">8086</a> , <a href="#">3941</a>  |
| 11 | 55  | 25  | PSMD13, LOC102724957, LOC105376570, <b>SOX6</b> , C11orf58, <b>BDFE</b> , DCDC1, LOC105376626, <b>LDLRAD3</b> , <b>DGKZ</b> , <b>AMBRA1</b> , <b>ZNF408</b> , <b>CKAP5</b> , <b>LRP4</b> , C11orf49, <b>DDB2</b> , <b>CELF1</b> , <b>LRP5</b> , PPP6R3, <b>CPT1A</b> , LINC01488, LOC10539422, <b>TMEM135</b> , DYNC2H1, <b>MIR100HG</b> | 7  | <a href="#">8087</a> , <a href="#">4688</a> , <a href="#">3160-1</a> , <a href="#">3160-2</a> , <a href="#">5582</a> , <a href="#">6745</a> , <a href="#">125b-1</a> |
| 12 | 24  | 12  | LOC107984507, <b>DDX23</b> , LOC105369757, TUBA1C, SPATS2, <b>ESPL1</b> , <b>SP7</b> , ATP5MC2, HOXC4, LOC105369890, TMEM263, MED13L   | 4  | <a href="#">6505</a> , <a href="#">4701</a> , <a href="#">196a-2</a> , <a href="#">615</a>   |
| 13 | 13  | 3   | SMAD9, LINC02341, <b>TNFSF11</b>   | 0  |  |
| 14 | 11  | 5   | LOC1053705, <b>SMOC1</b> , RPS6KA5, RIN3, MARK3  | 0  |  |
| 15 | 9   | 5   | LINC02345, <b>CYP19A1</b> , <b>SMAD3</b> , AAGAB, IQCH   | 3  | <a href="#">4713</a> , <a href="#">7973-1</a> , <a href="#">7973-2</a>   |
| 16 | 11  | 3   | <b>AXIN1</b> , <b>PDXDC1</b> , ADAMTS18  | 2  | <a href="#">1972-1</a> , <a href="#">6511b-2</a>   |
| 17 | 30  | 17  | <b>HIC1</b> , <b>SMG6</b> , <b>TOM1L2</b> , DRC3, GID4, MYO15A, <b>SOST</b> , C17orf105, MPP3, <b>PYY</b> , LSM12, <b>HDAC5</b> , C17orf53, <b>UBTE</b> , LINC02210-CRHR1 MAPT, CEP112,  | 5  | <a href="#">132</a> , <a href="#">212</a> , <a href="#">6777</a> , <a href="#">33b</a> , <a href="#">6782</a>  |
| 18 | 2   | 1   | <b>TNFRSF11A</b>   | 0  |  |
| 19 | 3   | 3   | TSHZ3, RHPN2, GPATCH1  | 0  |  |
| 20 | 6   | 3   | <b>JAG1</b> , <b>MACROD2</b> , <b>OSBPL2</b>   | 2  | <a href="#">6870</a> , <a href="#">4758</a>  |
| 21 | 6   | 2   | CLDN14, LINC01700  | 0  |  |
| 計  | 385 | 136 |  | 37 |  |

赤字は、Gene ontology解析で骨密度や骨代謝、Wnt signalingに関連するとされた遺伝子。

次に、Peoples' 1000においてLD in EAS>0.8のSNPについて、conservation解析を行なった。UCSC Genome browserを用いて、SNP位の本来のゲノム配列が9種 (human, rhesus, mouse, dog, elephant, chicken, x. tropicalis, zebrafish, lamprey) において何種で保持されているか、SNP配列がVISTAデータベース (Mouse, Chimp) でどれくらいの頻度で見られるのかを検討した。さらに、JASPARデータベース (<https://jaspar.genereg.net>) にて、SNPの前後51bpの配列を入力し、遺伝子変異で影響を受ける可能性のある転写因子をリストアップした (表2)。

表 2. SNP 位の種間保存状況 (4/9 以上) と転写因子への影響

| Chr | SNP ID    | GRCh38<br>UCSC (n/9) | GRCh37<br>VISTA<br>Mouse | Chimp    | Jasper の解析: SNP により影響<br>を受ける転写因子の数 |   |
|-----|-----------|----------------------|--------------------------|----------|-------------------------------------|---|
|     |           |                      |                          |          | -                                   | + |
| 2   | 4233949   | 4                    | 0.0013                   | -        | 6                                   | 3 |
| 2   | 10048745  | 5                    | 1.60E-05                 | -        | 10                                  | 2 |
| 2   | 144832051 | 5                    | -                        | -        | 8                                   | 4 |
| 2   | 6716216   | 4                    | -                        | -        | 2                                   | 3 |
| 3   | 74394007  | 4                    | -                        | -        | 19                                  | 3 |
| 6   | 7741085   | 5                    | 1.90E-09                 | 0.04     | 1                                   | 0 |
| 6   | 17423748  | 4                    | -                        | 5.80E-08 | 4                                   | 1 |

|    |           |   |          |        |    |    |
|----|-----------|---|----------|--------|----|----|
| 6  | 12201899  | 4 | -        | -      | 13 | 2  |
| 6  | 577721086 | 4 | 6.30E-12 | -      | 0  | 4  |
| 6  | 3012465   | 4 | -        | -      | 7  | 3  |
| 6  | 3020331   | 5 | 0.011    | 0.087  | 3  | 8  |
| 6  | 2504063   | 4 | -        | 0.11   | 0  | 4  |
| 7  | 6965122   | 4 | -        | -      | 12 | 7  |
| 7  | 13223036  | 4 | -        | -      | 2  | 11 |
| 7  | 35789132  | 4 | -        | -      | 8  | 15 |
| 7  | 7797976   | 5 | -        | -      | 4  | 4  |
| 7  | 3801387   | 5 | 7.20E-20 | 0.0046 | 13 | 2  |
| 7  | 10242100  | 5 | -        | -      | 10 | 7  |
| 7  | 7812088   | 4 | -        | -      | 2  | 5  |
| 10 | 12256387  | 5 | -        | -      | 6  | 5  |
| 10 | 1373004   | 5 | -        | -      | 0  | 15 |
| 10 | 73349318  | 5 | 0.027    | 0.0057 | 4  | 7  |
| 11 | 35199438  | 5 | -        | -      | 8  | 7  |
| 11 | 11024028  | 4 | -        | -      | 5  | 4  |
| 11 | 3809095   | 4 | -        | -      | 1  | 9  |
| 11 | 7112229   | 5 | -        | -      | 4  | 1  |
| 11 | 61884327  | 4 | -        | -      | 20 | 8  |
| 11 | 60201196  | 5 | -        | -      | 3  | 0  |
| 11 | 3736228   | 5 | -        | -      | 2  | 3  |
| 12 | 192096194 | 4 | -        | -      | 5  | 2  |
| 12 | 11551274  | 4 | 5.30E-05 | 0.22   | 2  | 4  |
| 12 | 118115924 | 5 | 1.20E-31 | -      | 7  | 1  |
| 13 | 9533095   | 4 | -        | -      | 6  | 4  |
| 13 | 116926994 | 4 | -        | -      | 3  | 1  |
| 16 | 16945612  | 4 | -        | -      | 9  | 6  |
| 17 | 8070128   | 4 | -        | -      | 4  | 3  |
| 17 | 2741856   | 4 | -        | -      | 8  | 12 |
| 17 | 71382995  | 5 | -        | -      | 4  | 2  |
| 21 | 1452102   | 4 | -        | -      | 47 | 8  |

UCSCによる解析は、9種 (human, rhesus, mouse, dog, elephant, chicken, x. tropicalis, zebrafish, lamprey) を対象とした。  
Chr: 染色体。

次いで、ある遺伝子の 3' UTR に存在する SNP が miRNA に与える影響については、miRNA-SNP database (miRNASNP v3, <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP/>) により検討した(表3)。3' UTR 領域にある SNP により、結合が増強されたり、減弱されたりする miRNA があり、それらの変化により遺伝子発現制御が変化することが推察された。

表 3. 遺伝子の 3' UTR に存在する SNP が miRNA binding に与える影響について

| Chr | SNP ID   | Ref/Alt | Gene    | SNP で gain/loss する miRNA 数 |      |
|-----|----------|---------|---------|----------------------------|------|
|     |          |         |         | gain                       | loss |
| 3   | 1026364  | G/T     | USF3    | 4                          | 1    |
| 7   | 34670419 | G/T     | ZKSCAN5 | 7                          | 3    |
| 11  | 2278907  | C/T     | CAPT1A  | 13                         | 20   |
| 17  | 7501812  | G/A     | TOM1L2  | 1                          | 3    |

最後に、骨密度関連 SNPs に関わる 136 の遺伝子の機能解析 (<http://pantherdb.org/>) を行なった(表4)。Biological process、Metabolic process の生体機能、結合や異化に関与している遺伝子が多い傾向が見られた。Biological process においては、bone mineralization/

ossification, canonical Wnt signaling pathways, animal organ morphogenesis に関わる遺伝子の集積が認められた。

表4. SNP 関連遺伝子 110 の機能解析

| Biological process                                      | %    |
|---|------|
| Biological adhesion GO:0022610)                         | 0.8  |
| Biological regulation GO:0065007)                       | 22.7 |
| Cellular component organization or biogenesis (0074840) | 13.6 |
| Cellular process (GO:0009987)                           | 10.6 |
| Developmental process (GO:0032502)                      | 6.8  |
| Immune system process (GO:0002376)                      | 0.8  |
| Localization (GO:0051179)                               | 9.1  |
| Metabolic process (GO:0008152)                          | 23.5 |
| Multicellular organismal process (GO:0032501)           | 3.8  |
| Reproduction (GO:0000003)                               | 0.8  |
| Response to stimulus (GO:0050896)                       | 3.8  |
| Signaling (GO:0023052)                                  | 3.8  |

Total # genes 111, Total # process hits 132

| Molecular function                            | %    |
|---|------|
| Binding (GO:0005488)                          | 46.7 |
| Catalytic activity (GO:0003824)               | 22.2 |
| Molecular function regulator (GO:0098772)     | 5.6  |
| Molecular transducer activity (GO:0060089)    | 3.3  |
| Structural molecule activity (GO:0005198)     | 3.3  |
| Transcription regulator activity (GO:0140110) | 11.1 |
| Translation regulator activity (GO:0045182)   | 1.1  |
| Transporter activity (GO:0005215)             | 6.7  |

Total #genes 111, Total # function hits 90

| Cellular component                      | %    |
|---|------|
| Cell junction (GO:0030054)              | 2.3  |
| Cell (GO:0005623)                       | 43.2 |
| Extracellular region (GO:0005576)       | 6.8  |
| Membrane (GO:0016020)                   | 8    |
| Organelle (GO:0043226)                  | 20.5 |
| Protein-containing complex (GO:0032991) | 13.6 |
| Supramolecular complex (GO:0099080)     | 2.3  |
| Synapse (GO:0045202)                    | 3.4  |

Total # genes 111, Total # components hit 88

#### 課題2. 評価されたmiRNAsの骨代謝における役割とその作用メカニズムを検討する。

既に骨代謝に関連して論文報告されている染色体1番の *Dynamin3* 遺伝子の近隣から由来する hsa-mir-214と199a (*RNA Biology*, 2014/2015) を本研究の研究対象からは研究計画の段階で除外することとしていた。miRNAのtarget scanの結果も踏まえ、課題1の検討から、筆者らは、hsa-miR-106a-2/615, 132, 212, 33d, 6870から着手することとした。

しかし、残念なことに、本課題研究においての報告できる結果はここまでとなった。新型コロナウイルス感染症の蔓延により、学部および大学院の学生の研究テーマを主として在宅・リモートで行うことを前提としたものに変更することを長期間にわたり余儀なくされ、自身も含めて研究室での研究が中断されたこともその主たる理由に挙げられる。その間、SNP研究からのメタ解析を行うことなども試みたが、ここで報告するに十分な結果は未だ得られておらず、研究期間終了後も継続して解析していく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Shihori Watanabe, Shizuko Yamabe, Masako Shimada  | 4. 巻<br>2             |
| 2. 論文標題<br>Arctium lappa Lam. and Its Related Lignans Improve Hyperglycemia and Dyslipidemia in Diabetic Rodent Models: A Systemic Review and Meta-Analysis | 5. 発行年<br>2022年       |
| 3. 雑誌名<br>Nutraceuticals  | 6. 最初と最後の頁<br>335-349 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/nutraceuticals2040026  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Shihori Watanabe, Hiyori Okoshi, Shizuko Yamabe, Masako Shimada                    | 4. 巻<br>26                |
| 2. 論文標題<br>Moringa oleifera Lam. in Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecules  | 6. 最初と最後の頁<br>3513 ~ 3513 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/molecules26123513   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                 |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Moe Sasaki, Nami Nishida, Masako Shimada  | 4. 巻<br>23 (4)    |
| 2. 論文標題<br>A Beneficial Role of Rooibos in Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis | 5. 発行年<br>2018年   |
| 3. 雑誌名<br>Molecules   | 6. 最初と最後の頁<br>839 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/molecules23040839  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-         |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>荒井大空、佐々木萌絵、西内梓、嶋田昌子              |
| 2. 発表標題<br>高脂肪食投与マウスにおける血中microRNAの発現の変化の検討 |
| 3. 学会等名<br>日本臨床栄養学会総会                       |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|---------------|---|--|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 奥村 裕司<br><br>(Okumura Yuushi)<br><br>(70294725) | 相模女子大学・栄養科学部・教授<br><br><br><br>(32707) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|