

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390497

研究課題名（和文） Non-coding RNAによる破骨細胞分化制御機構の解析

研究課題名（英文） Studies on the control mechanism of osteoclast differentiation by non-coding RNA

研究代表者

下川 仁彌太（SHIMOKAWA HITOYATA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：80014257

研究成果の概要：

- 19年度は共存培養による破骨細胞の分化誘導系を用いて得られた十数種類の miRNA について個々に解析を行った。そのうちの数種類について変化が確かめられた。
- 20年度は骨髄細胞を用いた破骨細胞形成系により確かめることと、個々の miRNA についての解析を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は骨芽細胞や stromal cell から RANKL 刺激を受けて monocyte-macrophage 系の前駆細胞から分化してくる。この分化の機序についての研究は RANK-RANKL 系の発見以後急速に進歩をしてきており、RANK-RANKL 系以外にも TNF α や免疫系のシグナルの関与も明らかになってきたが、これまでの研究は主としてシグナル伝達から転写調節因子を中心に行われている。近年、遺伝子発現の調節には転写調節因子以外に、エピジェネティックな染色体の構造

変化が重要であることが示唆されていると共に、miRNA による翻訳調節も重要であるということが報告なされつつある。

ヒトではすでに 250-300 種類の miRNA が同定されているが、その機能および標的遺伝子はまだほとんど判明していない状況である。これまでに報告されている miRNA の機能は mRNA の切断やタンパク質合成阻害を通して標的遺伝子の発現を抑制することが報告されている。この miRNA の発現が正常な発生・細胞増殖・分化において特異的に変化しながら遺伝子抑制を行っていること

がわかりつつあり、この抑制状態が不安定になることが癌のような疾患を引き起こすことがわかり始めてきたところである。骨代謝研究領域ではまだこのような研究はなされていない。

2. 研究の目的

近年、真核生物の遺伝子発現の制御において、遺伝子抑制に関与していると推定されている microRNA (miRNA) やインプリンティングや遺伝子量補正などのエピジェネシスに関与している各種 non-coding RNA の存在が明らかになりつつある。真核生物の遺伝子発現制御におけるヒストンのメチル化やアセチル化の程度によるエピジェネティックな染色体の構造変化とともに、miRNA の役割が認識され始めてきた。現在、200 種類以上の miRNA がマウスやヒトで同定されているが、その標的遺伝子はほとんどわかっていない。これらの遺伝子の発現レベルは組織や分化の段階によって異なることが報告されている。多くの miRNA を探索した結果、miRNA が発生の初期段階や、細胞増殖・アポトーシスと脂質代謝などの様々な過程に影響を及ぼすことが示された。また、慢性リンパ性白血病の研究では、2 種類の miRNA の発現量の減少と強い相関があることが報告され、miRNA と癌の関連性が示唆されている。まだ、多くのことは分かっていないが、高等真核生物の遺伝子発現を制御している転写調節因子のように、miRNA が重要であることが推測されている。

破骨細胞の分化の機序に関する研究は、RANK-RANKL 系の発見により急速に種々のことがわかってきたが、この因子だけでは説明のできないことも多く、これ以外のいろいろな因子が関与していると思われる。

本研究では破骨細胞の分化に関与している miRNA の分離・同定を試みると同時に、その遺伝子の発現調節およびそれが標的と

している遺伝子の同定を行い、miRNA の生理的役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

共存培養系、M-CSF-RANKL-骨髄細胞などの *in vitro* 破骨細胞分化誘導系を用いて、破骨細胞を誘導し、その分化に伴い変動する miRNA を microRNA アレイ解析を行い、分化の進行に伴い発現が増加しているものと、その逆に分化に伴い発現が低下していくものをスクリーニングした。次にスクリーニングによりピックアップされた数種類の miRNA についてリアルタイム RT-PCR による確認を行った。

4. 研究成果

その結果、microRNA アレイによりこれまでのところ分化に伴い増加する miRNA 約十種類と分化に伴い減少する miRNA を約十種類ピックアップした。さらにこれらのうちからリアルタイム RT-PCR により、破骨細胞分化に伴い発現の増加する miRNA 2 種類と減少する miRNA 2 種類を同定できた。

今後、*in vivo*, *in vitro* の系においてこれらの miRNA が実際に破骨細胞分化を抑制したり、誘導したりすることを miRNA の強制発現や発現抑制により確認しなければならないが、それによって破骨細胞分化の変化が確かめられれば、将来、骨吸収抑制剤の開発につながると思われる。

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 5 件)

1. Soysa N, Alles N, Shimokawa H, Jimi E, Aoki K, Ohya K. Inhibition of the classical NF- κ B pathway prevents osteoclast bone-resorbing activity. J Bone Metab, Vol.27(2), pp131-139, 2009

2. Wantida S, Aoki K, Ohya K, Takagi Y, Shimokawa H. Bovine dentine organic matrix down-regulates osteoclast activity. J Bone Miner Metab, Vol.27, pp315-323, 2009

3. Yokota T, Shimokawa H, Shibata S, Itoh

K, Baba Y, Ohya K, Ohyama K, Suzuki S. Insulin-like Growth Factor I Regulates Apoptosis in Condylar Cartilage. J Dent Res Vol.87(2), pp159-163, 2008

4. Mian MD, Saito H, Alles N, Shimokawa H, Aoki K, Ohya K. Lipopolysaccharide-induced bone resorption is increased in TNF type 2 receptor-deficient mice in vivo. J Bone Miner Metab Vol. 26, pp469-477, 2008

5. Samee M, Kasugai S, Kondo H, Ohya K, Shimokawa H, Kuroda S. Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Transfection to Human Periosteal Cells Enhances Osteoblast Differentiation and Bone Formation. J Pharmacol Sci Vol.108, pp18-31, 2008

[学会発表] (計 8 件)

1. Nagano K, Aoki K, Mian H, Alles N, Shimokawa H, Morimoto N, Akiyoshi K, Ohya K. The control release of TNF- α is necessary to mimic the LPS-induced bone resorption on calvaria. 第 82 回日本薬理学会年会. 2009 年 3 月 16 日~18 日. 横浜

2. Soysa N, Alles N, Aoki K, Shimokawa H, Jimi E, Ohya K. Non-canonical NF- κ B pathway regulates osteoclast formation and function. The 81th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (第 81 回日本薬理学会年会), 2008 年 3 月 17~19 日, 横浜

3. Soysa N, Alles N, Mian MD, Yasuda H, Jimi E, Shimokawa H, Aoki K, Ohya K. NIK

MUTATION IN ALY/ALY MICE CAUSES OSTEOPETROSIS AND REDUCE RANKL INDUCED OSTEOCLASTOGENESIS. 2nd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, 2008 年 6 月 8 ~ 13 日, Rhodes (Greece)

4. Soysa N, Alles N, Aoki K, Shimokawa H, Jimi E, Ohya K. Defective Alternative Pathway of NF- κ B Causes Mild Osteopetrosis in Mice. 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008 年 7 月 2 ~5 日, Toronto

5. Sriarj W, Aoki K, Ohya K, Takagi Y, Shimokawa H. Effects of Dentin Organic Matrices on Osteoclastogenesis. 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008 年 7 月 2~5 日, Toronto

6. 友松伸允, 青木和広, Mian MD, 下川仁彌太, 天笠光雄, 大谷啓一. LPS 投与による抜歯後骨新生の抑制は TNF- α 依存的である. 第 28 回日本骨形態計測学会, 2008 年 7 月 25 ~27 日, 東京

7. Tomomatsu N, Aoki K, Hussain MA, Alles N, Shimokawa H, Amagasa T, Ohya K. LPS-induced Inhibition of Osteogenesis is TNF- α Dependent. 30th ASBMR Annual Meeting, 2008 年 9 月 12~16 日, Montreal

8. 青木和広, Alles N, Soysa N, 自見英治郎, 下川仁彌太, 大谷啓一. 破骨細胞機能抑制ペプチドによる臨床応用の可能性. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2008 年 9 月 23 日~25 日, 東京

[図書] (計 件)

下川 仁彌太
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・准教授
研究者番号：80014257

[産業財産権]
○出願状況 (計 件)

(2)研究分担者

青木 和広
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：40272603

○取得状況 (計 件)

(3)連携研究者

(4)研究協力者

Wantida Sriarj

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・大学院生

[その他]

6. 研究組織
(1)研究代表者