

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23792280

研究課題名（和文） Anti-miRNA による骨芽細胞分化誘導

研究課題名（英文） osteoblastic differentiation by anti-miRNA

研究代表者

岡本 秀治 (OKAMOTO HIDEHARU)

鳥取大学・医学部・研究員

研究者番号：70529429

研究成果の概要（和文）：

miR-124a と miR-181a による Dlx5 と Msx2 の制御は、非骨性細胞において骨芽細胞分化を抑制するために Dlx5 と Msx2 を負に制御する重要なメカニズムであることを示した。

Anti-miRNA での分化誘導では anti-miR-124a と anti-miR-181a の 2 つの導入では分化誘導されなかった。Dlx5 及び Msx2 を直接的に標的とする miR-124a と miR-181a の抑制だけでは不十分であり、これら 2 つの miRNA に加え少なくとも、もう一つの miRNA の抑制が必要であると考えられた。

miR-10a、miR-10b、miR-19b、miR-9-3p は Dlx5 および Msx2 に対する制御メカニズムを構成する可能性が考えられた。

マウス iPS 細胞を用いた BMP-4 処理による骨芽細胞分化誘導系で、骨芽細胞分化に関連する 6 つの miRNA を同定し、分化制御での重要な役割を示した。標的遺伝子を抑制することによりマウス iPS 細胞の BMP-4 誘導性骨芽細胞分化制御に強く関与し、重要な役割を担う 6 つの miRNA を見出した。

また、anti-miRNA を用いた骨芽細胞分化誘導の可能性を示した

研究成果の概要（英文）：

The targeting of Dlx5 and Msx2 mRNA by miR-124a and miR-181a is a key mechanism for negatively regulating these factors in order to suppress osteoblastic differentiation in non-osseous cells.

Transfection of anti-miR-124a and anti-miR-181a did not induce osteoblastic differentiation in mouse iPS cells, suggesting that suppression of miR-124a and miR181a, which directly target Dlx5 and Msx2, is not sufficient to induce osteoblastic differentiation of mouse iPS cells, but that suppression of at least one miRNA of miR-10a, miR-10b, miR-9-3p and miR-19b besides miR-124a and miR-181a is required for osteoblastic differentiation.

MiR-10a, miR-10b, miR-19b and miR-9-3p may constitute a control mechanism for Dlx5 and Msx2.

We found 6 miRNAs that were strongly associated and played a key role in controlling BMP-4-induced osteoblast differentiation in mouse iPS cells by suppressing the translation of their targeting genes.

We also showed the possibility of osteoblastic differentiation by anti-miRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学

1. 研究開始当初の背景

2007年に樹立されたiPS細胞は再生医療の細胞源として大いに期待されている。マウスiPS細胞をBMP-4を用いて骨芽細胞へ分化誘導を行い、骨芽細胞分化に成功し、ES細胞と同様にiPS細胞が骨芽細胞へ分化可能であることを確認した。

この分化誘導系を用いてiPS細胞からの骨芽細胞分化過程の制御機構を解明するためにmiRNAに着目した。複数のmiRNAが骨芽細胞分化制御に関与していることが報告されており、骨芽細胞分化間に特異的に発現変化するmiRNAを見出し、その中で、発現低下したmiRNAに着目した。そして、その中で骨芽細胞分化に関連する転写因子Dlx-5とMsx2が標的遺伝子であると推測される2つのmiRNA、mir-124およびmir181に注目した。現在までに、これら2つのmiRNAが転写因子Dlx-5とMsx2のmRNAを特異的な標的であることを確認し、骨芽細胞分化を制御するmiRNAであることを示した。

2. 研究の目的

マウスiPS細胞をBMP-4を用いて骨芽細胞分化させ、分化間に発現低下したmiRNAの中で、骨芽細胞分化に関連する転写因子Dlx5、Msx2を標的遺伝子とするmiRNAに注目した。まず、これらのanti-miRNA導入によるマウスiPS細胞の骨芽細胞分化を行い、さらに、マウスiPS細胞で確立した系をヒトiPS細胞に応用し、anti-miRNAによる骨芽細胞分化を行い、新たな骨芽細胞分化誘導系を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

骨芽細胞分化に関与する転写因子Dlx5及びMsx2を特異的な標的とするmiRNAが同定したので、それらのanti-miRNAをマウスiPS細胞に導入し骨芽細胞分化を行い、新たな分化誘導系を確立する。

(1)mir-124およびmir181を含む複数のmiRNAのanti-miRNAをマウスiPS細胞に導入し骨芽細胞分化を行い、分化誘導系を確立する。この段階でanti-miRNAの導入方法による分化誘導効率を検討する。

(2)マウスiPS細胞で確立された分化誘導系をヒトiPS細胞に応用し、骨芽細胞分化における新たな誘導系を確立する。

4. 研究成果

骨芽細胞分化に関与するmiRNAが複数報告されており、骨芽細胞分化に複数のmiRNAが関与すると考えられ、マウスiPS細胞をBMP-4で骨芽細胞分化誘導させ、骨芽細胞分化を負に制御するmiRNAを同定し、そのanti-miRNAを用いた骨芽細胞分化誘導系の確立を目的とした。

分化間に発現低下したmiRNAの中で、mir124aとmir181aを含む6つのmiRNAは転写因子Dlx-5またはMsx2を標的遺伝子とすることが予測され、このうちmir-124aとmir-181aはそれぞれDlx5とMsx2のmRNAを特異的に制御し、蛋白発現を低下させ、骨分化マーカーに影響を及ぼした。またanti-mir124a, anti-mir181aを含む骨芽細胞分化に正に働く6つのanti-miRNAを導入した分化誘導では有意な骨芽細胞分化マーカーの上昇がみられた。

論文においてmiR-124aとmiR-181aによるDlx5とMsx2の制御は、非骨性細胞において骨芽細胞分化を抑制するためにDlx5とMsx2を負に制御する重要なメカニズムでありmiRNAが骨芽細胞分化制御に関与していること示した。anti-miRNAによる分化誘導結果より骨芽細胞分化に関与するDlx5およびMsx2に対する制御メカニズムを構成する可能性を示した。

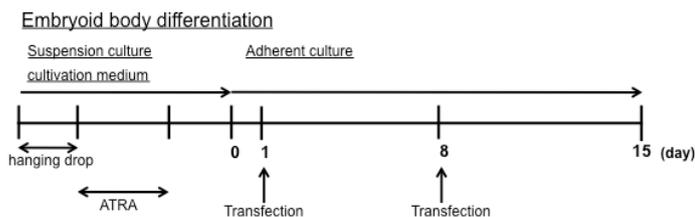
本研究の結論として、マウスiPS細胞を用いたBMP-4処理による骨芽細胞分化誘導系で、骨芽細胞分化に関連する6つのmiRNAを同定し、分化制御での重要な役割を示した。標的遺伝子を抑制することによりマウスiPS細胞のBMP-4誘導性骨芽細胞分化制御に強く関与し、重要な役割を担う6つのmiRNAを見出した。また、anti-miRNAを用いた骨芽細胞分化誘導の可能性を示した

Anti-miRNAでの骨芽細胞分化では一部の骨芽細胞分化マーカーの有意な上昇は認められたが、更なる、効率的で効果的な分化誘導を行

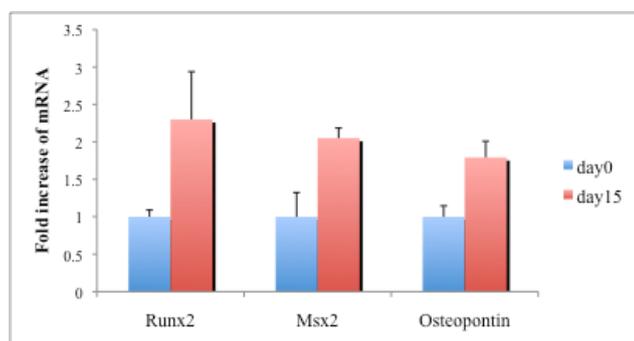
うためにウイルスベクターを用いた誘導系の確立、及びマウス iPS 細胞からヒト iPS 細胞への骨芽細胞分化段階への移行が 24 年度までの研究内容である。

最終的な目標はヒト iPS 細胞での anti-miRNA による骨芽細胞分化を行うことであるが、マウス iPS においてさらに効率的なトランスフェクション方法の確立が必要となる。

下記に今回の研究でデータの結果の一部を示す。



Anti-miRNA による分化誘導プロトコルトランスフェクションは embryoid body 作製後 day1 及び day8 で行った。



Anti-miRNA を用いた分化誘導では図に示す骨芽細胞分化マーカーの有意な発現増加を認めた。しかし、染色結果は陰性であり十分な骨芽細胞分化誘導ではなかった。しかし、anti-miRNA による骨芽細胞分化誘導の可能性を示した。

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)

① Hideharu Okamoto, Yoshiaki Matsumi, Yoshiko Hoshikawa, Kazuko Takubo, Kazuo Ryoke, Goshi Shiota, Involvement of MicroRNAs in Regulation of Osteoblastic Differentiation in Mouse Induced Pluripotent Stem Cells, PLOS ONE、査読あり、Volume7、2013、e43800
DOI : 10.1371

[学会発表] (計 2 件)

① 岡本秀治、田窪千子、領家和男
miRNA による骨分化制御(25)
第 59 回日本口腔科学会 中国・四国地方部会
2011 年 11 月 26 日、愛媛

② 岡本秀治、田窪千子、星川淑子、汐田剛史、領家和男
骨芽細胞分化に関与する miRNA の固定と anti-miRNA による骨芽細胞分化の検討
第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会
2011 年 4 月 21 日、東京

[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

岡本 秀治 (OKAMOTO HIDEHARU)

鳥取大学・医学部・研究員

研究者番号：70529429

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：