

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700767

研究課題名(和文)メカニカルストレス負荷時の骨細胞および骨芽細胞分化におけるmiRNAの役割

研究課題名(英文)The role of miRNAs in hydrostatic pressure-stimulated osteocyte and osteoblast.

研究代表者

伊藤 智広 (ITO, Tomohiro)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：30435854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：MC3T3-E1細胞をスキャフォールドブロックに接着後、培養細胞物理的的刺激装置により1.5 MPa、1時間のメカニカルストレス負荷処理を行った。miRNA アレイ解析によりmiRNA発現プロファイルの変化について解析を行った結果、メカニカル負荷処理により発現変化が8倍以上変化したmiRNAを120種同定した。この変動したmiRNAsは骨形成を促進するsemaphorin 3Aを標的遺伝子とすることが解った。以上のことから、メカニカルストレス負荷後の骨芽細胞分化において特定のmiRNAsが分化を一部制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：MC3T3-E1 cells were attached on biodegradable polymer scaffold and then cultured for 3 days. To investigate the expression profiles of miRNAs in hydrostatic pressure-stimulated MC3T3-E1 cells, we subjected their total RNA extracted from hydrostatic pressure-stimulated (1.5 MPa for 1 h) or nontreated cells to miRNA array chips. The expression levels of 120 miRNAs (log ratio 3 <) were distinct between hydrostatic pressure-stimulated and nontreated cells. Among them, we focused on the 3 kinds of down-regulated miRNAs, because the nucleotide sequences of these miRNAs were similar and the semaphorin 3A that is closely related in osteoblast differentiation was a common target gene for each miRNAs. The enforced expression of these mature miRNAs in MC3T3-E1 cells remarkably attenuated a hydrostatic pressure-stimulated preosteoblast differentiation. From these results, it was presumed that those miRNAs act as important factors for regulatory machinery involved in early osteogenesis in part.

研究分野：食品機能学、骨代謝化学

キーワード：メカニカルストレス microRNA 骨代謝 骨芽細胞 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢者におけるロコモティブシンドローム(移動運動器障害)は骨粗鬆症, 変形性関節症, 脊椎症性の脊髄・馬尾・神経根障害の3つが相互に関連しており, 運動によるメカニカルストレス(荷重負荷)が骨形成に非常に大きな影響を及ぼす重要な因子となる。しかし, 骨組織(骨細胞, 骨芽細胞や破骨細胞等)がどのようにメカニカルストレスを感受し, 骨形成シグナルを活性化しているかについては未だ不明な点が多い。我々は, 骨粗鬆症治療のための RNA 創薬の開発を目的にわずか 20 数塩基の small-noncoding RNA の一種である microRNA (以下 miR) が骨芽細胞の分化機構にどのように関与しているのかについてこれまで検討してきた。現在までに miR-141 および miR-200a が BMP-2 誘導による Runx2 発現や転写活性の調節, 骨基質タンパクの Osterix 発現に関与している転写因子 Dlx5 を, miR-208 が Osteocalcin, PTHrP, collagen I, Runx2 の発現を制御している転写因子 Ets1 を, miR-370 が BMP-2 と Ets1 をそれぞれ標的とすることで骨芽細胞の分化を制御していることを明らかにした。このように我々をはじめ, miR が骨芽細胞の分化を制御していることが近年数多く報告され, 骨芽細胞の分化に miR が深く関与していることは間違いない。そこで, メカニカルストレスを感受した骨細胞, 骨芽細胞および破骨細胞が分化シグナルを活性化する際にも分化誘導因子で刺激した時と同じように miR による分化制御が機能しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

メカニカルストレスによる骨細胞および骨芽細胞分化に関与する miR の発現プロファイルおよび制御メカニズムを解明することで, 未だ明らかにされていないメカニカルストレス誘導骨分化における miR の制御機構を明らかにし, 高齢者や宇宙飛行士の骨代謝治療 RNAi (miR) 創薬開発の基盤を確立させる。

3. 研究の方法

①メカニカルストレス負荷細胞における miR プロファイルの変化

静水圧刺激装置(ストレッチクス株式会社製 SPB-1000)を用いて(図1)加圧ストレスをマウス長骨由来骨細胞様株 MLO-Y4 細胞およびマウス前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞にそれぞれ与え, 分化ステージに移行させた。加圧処理後の各細胞を回収し, small RNA を調製後, 東レ株式会社 3D-Gene[®] miR array に供することで骨形成ステージにおける加圧ストレスによる miR 発現 profile を解析した。

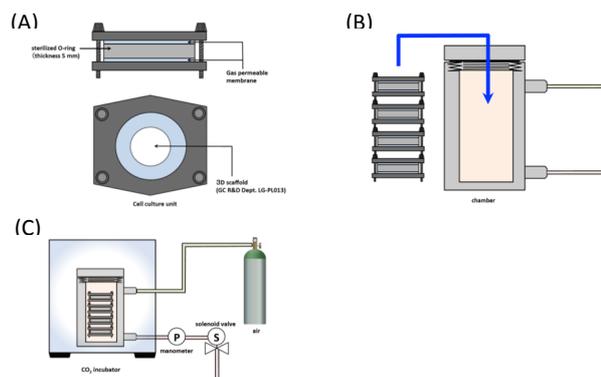


図1. メカニカルストレス負荷装置について。(A)培養ユニット, (B)加圧チャンバー, (C)培養システム。チャンバー内に混合空気を満たすことで 1.5 MPa のメカニカルストレスを培養細胞に与える。培養細胞は Oリングの上下を混合空気透過性のフィルターにてを挟むことで培養条件を整えている。

②メカニカルストレス負荷により変動した miR の確認

メカニカルストレス負荷により発現が変化した miR の前駆体またはそのアンチセンス鎖を細胞内に導入することで骨芽細胞分化の影響を確認した。分化の指標は, アルカリホスファターゼ(以下 ALP)活性により確認した。また, 標的遺伝子を TargetScan6.2, miRanda などのバイオインフォマティクスを駆使し, 検索した。その後, 標的分子のタンパクおよび mRNA 発現レベルを western blot 法および Real time-PCR 法によりそれぞれ検討した。

4. 研究成果

①メカニカルストレス負荷細胞における miR プロファイルの変化

MC3T3-E1 細胞を乳酸系ポリマーとハイドロキシアパタイトからなるスキャフォールドブロックに接着後, メカニカルストレスを加圧装置により 1.5 MPa, 1 時間与えた。その後ただちにスキャフォールドブロックに TRIzol 試薬を加え, トータル RNA を回収した。調製した全 RNA の品質チェック後, メカニカル負荷処理における miR 発現プロファイルの変化について東レ 3D-Gene miR Oligo chip アレイ解析を行った。その結果, 骨芽細胞では, メカニカル負荷処理により 8 倍以上変化した miR を 120 種(発現上昇 miR: 84 種, 発現低下 miR: 36 種), 骨細胞では, 35 種(発現上昇 miR: 27 種, 発現低下 miR: 8 種)同定した。

②メカニカルストレス負荷により変動した miR の確認

メカニカルストレス負荷処理細胞で変動した miR の標的遺伝子を TargetScan6.2, miRanda のデータベースを活用して解析した結果, 骨

形成の促進作用の機能を示す semaphorin 3A (sema3A)を標的遺伝子とする3種の miRs (miR-195a-5p, miR-322-5p, miR-497a-5p)にフォーカスした(図2, 3)。これら3種の miRs はメカニカルストレスを負荷することで発現が低下したので、それぞれの miR の mature 型を骨芽細胞に導入し、細胞にメカニカルストレスを負荷すると、分化指標である ALP 活性が有意に低下した(図4)。また、この3種の miRs の内で最も分化への影響が強いと考えられた miR-195a-5p を導入した骨芽細胞のメカニカルストレス負荷後の sema3A タンパク発現量を western blot 法により検討したところ、発現が上昇しなかった(図5)。このことから、メカニカルストレス負荷後の骨芽細胞において、特定の miRs が sema3A を標的にすることで分化を一部制御することが示唆された。現在、sema3A がこれら miR の標的遺伝子であることを確定するために図3に示した sema3A の mRNA-3'-非翻訳領域におけるこれら miR の共通した結合サイトを Life Technologies 社の pmiR-REPORT miR Expression Reporter Vector に組み込んでセンサーベクターを作製している。ベクター作製後、Luciferase reporter assay により結合状態を検討するとともに、共通した結合サイトにポイントミューテーションを入れたセンサーベクターも引き続き作製し、Luciferase reporter assay における発光強度低下を確認する予定でいる。

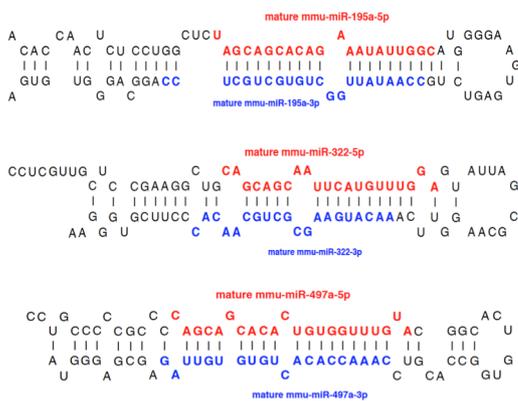


図2. 本研究で着目したメカニカルストレス負荷骨芽細胞において発現変動した miRs.

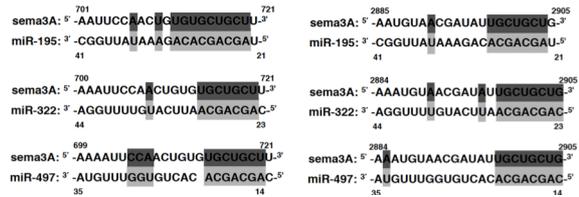


図3. miR-195a-5p, miRNA-322-5p, miR-497a-5p は semaphorin 3A (sema3A)を標的遺伝子とする。

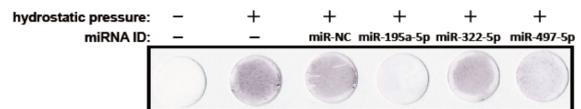


図4. miR-195a-5p, miRNA-322-5p および miR-497a-5p 導入骨芽細胞におけるメカニカルストレス負荷刺激後の骨芽細胞分化。

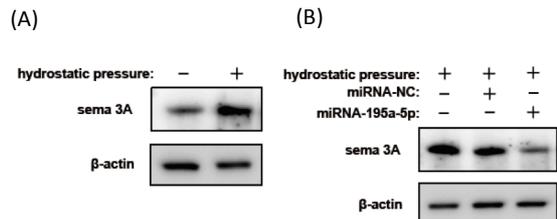


図5. miR-195a-5 導入骨芽細胞におけるメカニカルストレス負荷後の sema3A タンパク発現変化。(A)骨芽細胞におけるメカニカルストレス負荷後の sema3A 発現上昇、(B) miR-195a-5 導入骨芽細胞におけるメカニカルストレス負荷後の sema3A 発現低下。

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 2件)

① Tomohiro Itoh, Masashi Ando, Yasuyuki Tsukamasa, Yukihiro Akao Expressions of BMP-2 and Ets1 in BMP-2-stimulated mouse pre-osteoblast differentiation are regulated by microRNA-370. *FEBS Letters*, **586** (12), 1693-1701 (2012), (査読有, doi:10.1016/j.febslet.2012.04.014).

② Tomohiro Itoh, Yuko Ito, Yoshinori Ohtsuki, Masashi Ando, Yasuyuki Tsukamasa, Nami Yamada, Tomoki Naoe, Yukihiro Akao Microvesicles released from

hormone-refractory prostate cancer cells facilitate mouse pre-osteoblast differentiation *Journal of Molecular Histology*, **43**(5), 509-515 (2012), (査 読 有 , doi: 10.1007/s10735-012-9415-1)

〔学会発表〕(計 1 件)

① **伊藤智広**, 赤尾幸博, メカニカルストレス負荷マウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞における miRNA 発現プロフィール
2014 年度日本分子生物学会, 2014 年 11 月(神奈川県横浜市, パシフィコ横浜) .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 智広 (ITOHI Tomohiro)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号:30435854

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし