

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670773

研究課題名(和文) microRNAを用いたオーダーメイド顔面骨形成法の開発的研究

研究課題名(英文) A Study to Subjugate Bone Cycles using siRNA

研究代表者

矢野 浩規 (YANO, Hiroki)

長崎大学・病院(医学系)・講師

研究者番号：60325652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、siRNAを用いて骨周期コントロール法を開発することにある。バイオインフォマティクスを用いmiR-142 標的遺伝子同定を行いG 蛋白質ファミリーに關与する結果が得られた。骨組織における miR-142 発現細胞の同定を目的に大腿骨内における miR-142 ファミリーの発現を ISH を用いて試みたが明らかなシグナルを検出することが出来ず、免疫細胞群を分離、miRNA 抽出、cDNA 合成を行い qPCR を用いて発現動態を解析した。その結果、miR-142-3p 及び miR-142-5p を発現していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：This study is primarily intended to control the bone cycle such as bone formation and resorption with siRNAs. Since miR-142 has related to immune system, we've gotten the results that it also contributes to the low-weight molecular G proteins operating cytoskeletal action based on the bioinformatics. Although miR-142 signals could not be found in the murine femur by in situ hybridization, miR-142-3p and miR-142-5p were newfound in immune cells by qPCR after cDNA cloning from miRNA extractions.

研究分野：形成外科学

キーワード：miRNA 骨形成 骨調整 G蛋白質

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顔面の土台は顔面骨であり、先天性(素因性)および後天性の顔面骨の変形は個性のもととなる顔面の形態異常を引き起こす。近年の顎顔面外科の進歩(骨切りや骨延長術等)は多くの顔面変形に福音をもたらして来ているが、熟練の技量や長期の治療期間を要するうえ高度の変形に対しては技術的限界が存在することも事実である。

近年、癌発生を中心に増殖およびアポトーシスなどでの microRNA (miRNA) の関与が明らかとなっている。miRNA は、mRNA の 3' UTR 部位に相補的に結合し、細胞内の翻訳を制御している。さらに miRNA は、発生・分化など細胞機能根幹に関わっていることも明らかとなってきた。

類似機能を有する分子として siRNA が知られている。siRNA も癌化抑制作用や細胞分化の抑制・促進作用を有する事も示唆され、我々もケロイド組織における microRNA の役割について報告してきた (Kashiyama K et al. *J Invest Dermatol.* 132(6)p1597; 2012)。しかしながら、顔面骨形成(再生)過程における miRNA の関与は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、骨形成過程とくに破骨細胞や造骨細胞における miRNA 機能を明らかにする。そして miRNA を中心とした有機質基質(仮骨)形成や無機質沈着(石灰化)における機能を明らかにする。そして、顔面骨形成過程における miRNA もしくは siRNA を用いて人為的に骨形成・吸収および骨周期コントロール法を開発する。

3. 研究の方法

(1)実験動物由来 miRNA 解析用 cDNA の合成

ラット頭蓋骨欠損および骨移植組織から total RNA を抽出して cDNA 合成を行った。

(2)培養細胞株由来 miRNA 解析用 cDNA 合成

HCO 培養細胞株および MLC-6 培養細胞株から total RNA を抽出して cDNA 合成を行った。

(3)miRNA 発現解析

各組織および細胞から抽出した RNA から microRNA などの短鎖 non-coding RNA を選択的に抽出し、マイクロアレイおよび microRNA specific real-time PCR

を用いて、発現動態を解析し miRNA の選別を行った。

(4)miRNA 標的遺伝子の同定

miRNA 標的遺伝子群のバイオインフォマティクスを用いて解析を行った。解析ツールは下記である。

TargetScan,

http://www.targetscan.org/mmu_71/

miRDB,

<http://mirdb.org/miRDB/>

DIANA,

http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=miroT_CDS/index

(5)病理解析

実験動物より臓器を摘出、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、病理解析を行った。

(6)骨病態の解析

分子病理学的手法を用いて骨病態解析を行った。まず、マウスから採取した大腿骨をホルマリン固定し、固定された大腿骨を組織量の約 50 倍量の脱灰液(K-CX(株式会社ファルマ))原液に一晩漬けて脱灰した。脱灰後は蒸留水で洗浄した後にパラフィン包埋切片を作製。その後作製した標本を用いて、免疫染色を行った。

各抗体の希釈率は以下である。抗 F4/80 抗体(1:400)。抗好中球抗体(1:200)。抗 RhoA 抗体(1:50)。抗 Rac1 抗体(1:50)。Alexa Fluor 488 抗体(1:1000)。Alexa Fluor 568 抗体(1:1000)。核染色は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた。

各抗体における染色条件は以下である。

1次抗体: 4 で 16 時間反応。

2次抗体: 室温で 16 時間反応。

(7) *In situ* hybridization (ISH)

作製したパラフィン切片を用いて microRNA ISH Buffer (Eqiqon) に miRCURY LNA Detection Probe, 5'-DIG labeled (Eqiqon) を混合し、42 で 16 時間反応した。その後、抗 DIG 抗体(希釈率 1:500) と反応させ、発色を行った。

(8)磁気ビースを用いた実質臓器からの細胞分離

MACS 細胞分離試薬 (Miltenyl Biotec) を用いて、実質臓器より選択的に細胞分離・抽出を行った。

(9)miRNA および標的遺伝子における結合解析

ホタルならびにウミシイタケ由来ルシフェラーゼ遺伝子が組み込まれている pmirGLO ベクター(プロメガ社)に、miRNA 結合予想部位を挿入し、発現ベクターの構築を行った。構築後はシークエンスを行い、目的部位に正確に遺伝子が組み込まれていることを確認した。確認後、*E. coli* を用いてプラスミドの大量精製を行った。そして、Lipofectamine3000 (Invitrogen) を用いて、プラスミドおよび人工合成 miRNA (miRNA mimic, Exiqon) を培養細胞に同時に遺伝子導入を行った。その後、ルシフェラーゼ活性を測定して、結合様態を観察した。

4. 研究成果

(4)miRNA 標的遺伝子の同定

本研究で着目している miR-142 は、免疫反応に関与することが miR-142 KO マウスを用いた解析により示唆されている。そこで、miR-142 標的遺伝子同定を、バイオインフォマティクスを用いて行った。その結果、細胞骨格構成に関与する低分子量 G 蛋白質ファミリーに関与する結果が得られた(図1)。

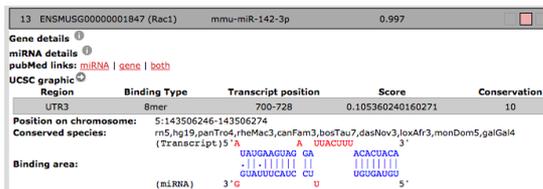


図1、DIANA を用いたバイオインフォマティクス解析

miR-142-3p は Rac1 3' UTR 部位に高確率で結合することが予想された。

(5)骨組織における miR-142 発現細胞の同定

大腿骨は骨形成の分子メカニズムを調べるのに適している。そこで、大腿骨内における miR-142 ファミリーの発現細胞の同定を ISH を用いて試みた。しかしながら、明らかな miR-142 シグナルを検出することが出来なかった。

miRNA 発現は、非常に低レベルであると推察される。そこで、磁気ビーズを用いて代表的な免疫細胞群(好中球、マクロファージ、T 細胞、B 細胞)を分離、miRNA 抽出、cDNA 合成を行い qPCR を用いて発現動態を解析した。その結果、脾臓における上記細胞群は、miR-142-3p 及び miR-142-5p を発現していることが確認された。今後は、破骨細胞や造骨細胞における miRNA 発現を検索する。

(6)miR-142 および低分子量 G 蛋白質 mRNA の結合解析

Cdc42、Rac、および Rho ファミリーは、代表的な低分子量 G 蛋白質ファミリーである。一方 miR-142 は、バイオインフォマティクス解析により、上記分子群の翻訳抑制に関与していると推察された。はじめに、分子間相互作用を解析系の確立に着手した。まず、比較的遺伝子導入を行いやすい NIH 3T3 細胞を用いて、検討した。その結果、本研究で構築したプラスミド群は、正確なルシフェラーゼ活性を保持していることが確認された。一方で細胞毒性は確認されなかった。各 Rho ファミリーにおける miR-142-3p、miR-142-5p への結合をみると、Rac において miR-142-3p への結合が示唆されたが、それ以外の Rho ファミリーではコントロールと比較して優位な差を認めなかった。これまで、これらの Rho ファミリーと miR-142-3p、-5p のいずれかが結合することが報告されているため、人工合成 miRNA の濃度条件や遺伝子導入されたベクターとの結合性の評価などを行い再検討していく予定である。また今回は遺伝子導入しやすい NIH-3T3 細胞を用いた解析であり、今後は骨形成に関与する細胞での評価も行っていく予定である。

本研究成果により、miR-142 は骨形成における細胞運動に関与していることが推察された。今後は、miR-142 欠損マウスならびに突然変異マウスを用いて詳細に解析を行う予定である。

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 4 件)

矢野 浩規、芳原 聖司、前場 崇宏、吉本 浩、平野 明喜、当科における過去 10 年間の眼窩底骨折手術 われわれの手術適応、日本頭蓋顎顔面外科学会誌、査読有、Vol. 30、2014、9-15
矢野 浩規、平野 明喜、顔面骨骨折の骨固定、PEPARS、査読無、Vol. 88、2014、32-40

Yano Hiroki. The Prolonged Double Vision Is not Only Caused by Adhesion of Orbital Contents After Blowout Fractures: Important Role of the Orbital Proprioception. J Craniofac Surg. 査読有 Vol.26 No.7, 2015;e680-681. doi: 10.1097/SCS.0000000000002139

Iwao Atsuhiko, Nakashima Mitsuko, Yano Hiroki. The Cranial Base Fracture after the Caldwell-Luc Operation. Plast Reconstr Surg Glob Open. 査読有 Vol.3 No.8, 2015; e483. doi:10.1097/GOX.0000000000000464

〔学会発表〕（計5件）

矢野 浩規、眼窩骨折手術におけるピットホールと対応、第20回日本形成外科手術手技学会、2015年2月21日、鎌倉プリンスホテル(神奈川県・鎌倉市)

矢野 浩規、当科における頭蓋早期癒合症における頭蓋骨骨延長術の検討、第32回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会、2014年11月6日~7日、大阪市中央公会堂(大阪府・大阪市)

矢野浩規 平野明喜：下直筋障害性眼窩底骨折：第58回日本形成外科学会・総会学術集会：2015.4.8-10：ウエスティン都ホテル京都(京都府・京都市)

矢野浩規、吉本浩、大石正雄、高原英作、馬渡星示、平野明喜：眼窩悪性リンパ腫13例の検討：第33回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会：2015.11.12-13：宝塚ホテル(兵庫県・宝塚市)

Hiroki Yano, Katsuya Tanaka, Kazuya Kashiya, Shizuka Suzuki, Akiyoshi Hirano : Solitary Fibrous Tumor as an Orbit Lesion: Report of Three Cases. : The 16th Congress of ISCFs:2015.9.14-18 ヒルトン東京ベイ(千葉県・舞浜市)

〔図書〕（計2件）

矢野 浩規、平野 明喜：上顎骨骨折・下顎骨骨折：克誠堂出版：形成外科治療手技全集III 創傷外科：楠本健司、館正弘（編）：2015：364（p43-58）
矢野 浩規、平野 明喜：上下顎骨骨折：専門医取得に必要な形成外科手技36-口頭試問への対策-、中塚貴志（編）：克誠堂出版（東京）、2015：326（p174-181）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 浩規 (YANO, Hiroki)
長崎大学・病院(医学系)・講師
研究者番号：60325652

(2)研究分担者

田中 克弥 (TANAKA, Katsuya)
長崎大学・病院(医学系)・客員研究員
研究者番号：707922750

平野 明喜 (HIRANO, Akiyoshi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授
研究者番号：90208835

(3)連携研究者

なし()