

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 3 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861548

研究課題名(和文) マイクロRNAを介した硬組織ネットワーク機構

研究課題名(英文) A Novel Mechanism of Osteo-network through MicroRNAs

研究代表者

竹井 悠一郎 (Takei, Yuichiro)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：10711377

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)：骨恒常性維持には骨形成と骨破壊のバランスが重要である。我々は、骨を形成する骨芽細胞に特有の微小胞、骨基質小胞(BMVs)の中にマイクロRNA(miRNA)が包含されていることを見出した。また、骨芽細胞がBMVsを情報伝達輸送体として利用し、骨破壊細胞である破骨細胞の分化・形成を抑制することが明らかとなった。さらにこの際、BMVsに含有される特定のmiRNA、miR-125bが重要であることが示唆された。本研究は、骨代謝調節の新たな機構の発見、解明に寄与する。

研究成果の概要(英文)：The balance between bone formation and bone destruction is fundamental on the skeletal homeostasis.

We found the microRNAs (miRNAs) included in bone matrix vesicles (BMVs), that is specifically derived from bone-forming osteoblasts. Furthermore, it had been uncovered osteoblasts applied BMV as a signal transducer and suppressed the differentiation from macrophages into osteoclasts, bone-absorbing cells. Especially, it was suggested that a certain miRNA, miR-125b involved in BMVs was crucial in this pathway. This study contributes a discovery of a novel mechanism of bone metabolism.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：マイクロRNA 骨基質小胞 破骨細胞形成

### 1. 研究開始当初の背景

細胞間の遺伝子発現調節の新たな担い手としてマイクロ RNA (miRNA) およびそれを包含する微小胞が注目されている。骨や歯などの硬組織は多種の細胞間情報伝達・制御が活発に行われており、そのネットワークを解明することが極めて重要である。そこで本研究は骨芽細胞に特異的な微小胞、骨基質小胞 (BMV) および miRNA に注目した。また、予備試験により、われわれは既に BMV 内に 100 種以上の miRNA が存在することを発見している。

### 2. 研究の目的

予備試験の結果から、骨構成細胞の機能を調節し得る miRNA が確認された。そのため、BMV の役割は、単に骨外基質の石灰化させるだけにとどまらず、骨組織内の細胞間情報伝達を担っていることが予想された。そこで、当該研究は BMV の細胞情報伝達因子としての新たな役割を解明するとともに、骨代謝調節機構のメカニズムを追究することを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究方法およびその時系列を下記する。

平成 26 年度:

- (1) BMV 選択的 miRNA の同定  
種間 (ヒト、マウスなど) による BMV 内の miRNA 発現量の比較検討をする。
- (2) 標的細胞の特定および miRNA 伝達機序の解明  
Vybrant Dil-labeling Kit を用い、蛍光標識された BMV を取り込む標的細胞の特定およびその標的細胞への影響を検討する。
- (3) BMV の機能解析 (in vitro)  
BMV を骨を構成する細胞へ負荷し、その影響を解析する。

平成 27 年度:

- (4) 機能を有する miRNA および標的遺伝子の同定  
miRNA 阻害により機能を有する miRNA を同定および siRNA により標的遺伝子を同定する。
- (5) In vivo 解析  
アテロコラーゲンをを用いた miRNA 導入法により、個体レベルで骨組織に与える影響を解析する。

### 4. 研究成果

当該研究は概ね良好に進んだ。

まず、ヒト、ラット、マウスの骨芽細胞を培養し、回収した BMV の中に存在する miRNA を確認した。BMV 中に高発現する miRNA は種間で高確率に保存されていることが明らかになった。

次に、Vybrant Dil-labeling Kit を用い、BMV を蛍光標識させた。この蛍光 BMV を骨構成細胞である骨芽細胞系細胞および破骨細胞系細胞に添加させると、蛍光 BMV は、破骨細胞前駆細胞に選択的に取り込まれること、また破骨細胞分化を抑制することを見出した (図 1、図 2 参照)。

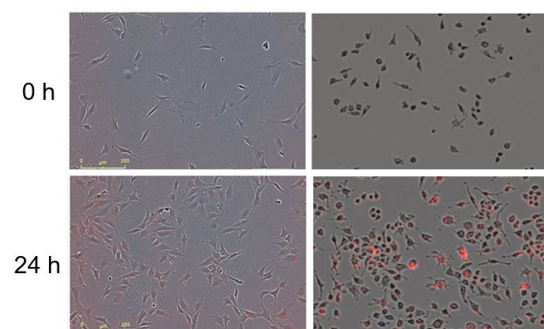


図 1 蛍光 BMV の取り込み試験

(左図は、骨芽細胞前駆細胞。右図は破骨細胞前駆細胞を示す。蛍光 BMV 添加後 24 時間で、破骨細胞前駆細胞に強い赤色蛍光が確認された。)

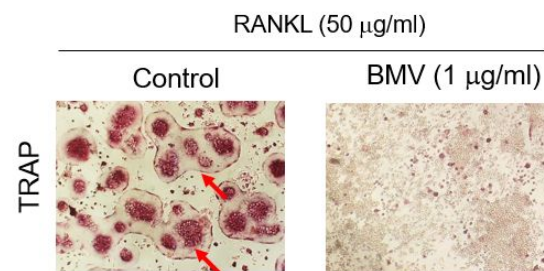


図 2 破骨細胞形成における BMV の影響

(破骨細胞前駆細胞 RAW-D 細胞に破骨細胞分化刺激因子である RANKL および BMV を添加させ、5 日間刺激させた培養細胞を TRAP 染色により、破骨細胞を検出した。破骨細胞を赤矢印で示した。)

さらに、miR-125b を RAW-D 細胞に導入させ、miR-125b が高発現した RAW-D 細胞に破骨細胞分化刺激を行うと、破骨細胞誘導が抑制された。また、miR-125b の発現を低下させた骨芽細胞系細胞を樹立させ、この細

胞から得られた BMV には、破骨細胞分化抑制作用が著しく減少していることから、破骨細胞抑制作用には、BMV 中の miR-125b が重要であることが示唆された。

最後に、AteloGene を用いた *in vivo* 試験において、miR-125b が LPS 誘導性骨破壊を抑制することが明らかになった(図3参照)。

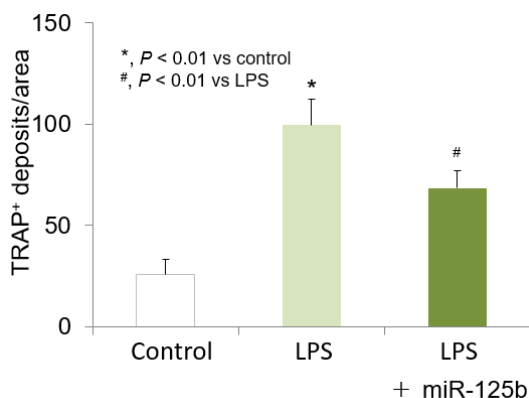


図3 LPS 誘導性骨破壊における miR-125b の影響

(マウス頭頂部に LPS および AteloGene に懸濁した miR-125b を投与し、6 日後の TRAP 陽性染色を確認した。miR-125b 投与により、マウス頭蓋骨の TRAP 陽性染色が減少した。)

以上のことから、BMV が骨芽細胞 - 破骨細胞間の情報伝達に関わっていることが明らかとなり、さらに BMV 中の miRNA が重要であることが示唆された。当該研究の成果は、骨代謝調節の新たな機序を明らかにするとともに、骨疾患に対する新規薬剤の開発に貢献するものと期待している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) Takei Y, Minamizaki T, Yoshioka H, Yoshiko Y. Bone-derived miRNA as a mediator of cell-cell communication. Proceedings of 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry. 査読無 2015;71-72.
- (2) Takei Y, Minamizaki T, Yoshiko Y. Functional Diversity of Fibroblast Growth Factors in Bone Formation. Int J Endocrinol. 査読有 2015;2015:729352. Review
- (3) 竹井悠一郎, 吉子裕二 骨・血管相関と microRNA 臨床化学 査読無

2014;43(2):106-111.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Takei Y, Minamizaki T, Yoshioka H, Yoshiko Y. Bone-derived miRNA as a mediator of cell-cell communication. 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry., 23-25 Oct. 2015, Hiroshima, Japan.
2. Takei Y, Nakao Y その他 7 名. Matrix Vesicles Mediate the Cell-to-Cell Transmission of MicroRNA-125b as an Inhibitor of Osteoclastic Bone Resorption., 9-12 Oct. 2015, ASBMR, Seattle, USA.
3. Nakao Y, Takei Y, その他 6 名. MicroRNAs Involved in Bone Metabolism Are Transported into Matrix Vesicles during Bone Formation., 9-12 Oct. 2015, ASBMR, Seattle, USA.
4. Kagawa K, Yoshioka H, Okita S, Kuremoto K, Takei Y, その他 4 名. Newly Identified FGFR2 Isoform Modulates FGF10-FGFR Signaling During Osteochondrogenesis., 9-12 Oct. 2015, ASBMR, Seattle, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：破骨細胞形成および/または機能抑制剤、破骨細胞形成および/または機能促進剤並びに破骨細胞形成および/または機能を抑制または促進する薬剤のスクリーニング法

発明者：吉子裕二、竹井悠一郎、南崎朋子、吉岡広陽、越智保夫(小野薬品)

権利者：広島大学、小野薬品工業株式会社

種類：特許

番号：特願 2015-162851

出願年月日：2015 年 8 月 20 日

国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.hiroshima-u.ac.jp/dent/research/lab/dentistry/Calcified\\_Tissue\\_Biology](https://www.hiroshima-u.ac.jp/dent/research/lab/dentistry/Calcified_Tissue_Biology)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹井 悠一郎 ( Takei Yuichiro )

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・

助教

研究者番号：10711377