

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893067

研究課題名(和文)骨細胞のメカニカルストレス応答を制御するマイクロRNAの機能解析

研究課題名(英文)The effect of osteocyte specific miRNA in response to mechanical stress

研究代表者

塩飽 由香利 (Shiwaku, Yukari)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80736190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨細胞特異的に発現するmiRNAに着目し、骨細胞のメカニカルストレス応答におけるmiRNAの生理的意義を検討した。骨細胞特異的GFP発現マウスを用いて、骨細胞を単離し、骨細胞特異的miRNAを次世代シーケンズにて同定した。miRNA過剰発現した骨細胞を二次元及び三次元環境下で培養し、骨細胞分化を抑制するmiRNAを同定した。さらに、miRNA標的遺伝子と関連するシグナル伝達経路を検討するため、蛋白発現及び転写調節の解析を行った。以上より、骨細胞分化を制御するmiRNAの転写調節メカニズムの一端を解明し、骨細胞研究の進展に繋がる成果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on osteocyte specific miRNA and examined the effect of miRNA in osteocyte differentiation and response to mechanical stress. We isolated the osteocytes from osteocyte specific GFP expression mice by using FACS and identified miRNA expressed higher or lower than osteoblasts through the new generation sequencer. When some of miRNA was overexpressed in osteocyte, its differentiation was inhibited. Moreover, we identified the target genes of osteocyte specific miRNA by in silico analysis and examined protein expression and transcriptional activity of target genes. In conclusion, we succeeded to clarify one of the molecular mechanism by which miRNA regulates osteocyte differentiation.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 メカニカルストレス マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、骨量低下及び骨質劣化に伴い骨折の危険性が増大する疾患である。骨粗鬆症患者は高齢者に多く、骨折により寝たきりになった場合に更に骨量が低下し、悪循環に陥ることが問題となっている。その要因として、長期の臥床生活においては、骨にかかる荷重の低下により骨形成が抑制されることが考えられている。

骨の代謝は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の均衡により調節されている。しかし、近年、骨細胞がメカニカルストレスや血中カルシウム・リン酸濃度の変化を感知し、骨芽細胞や破骨細胞を介して骨代謝を制御していることが明らかとなってきた。なかでも、遺伝学的に骨細胞を除去したマウスでは、荷重の減少に伴う骨量の低下が認められないことから、骨細胞はメカニカルストレスの感知において重要な役割を担っていることが分かってきた。すでに、骨細胞は荷重条件下において、スクレロスチン、Dkk1などのWntシグナル阻害因子の分泌を抑制し、骨形成を促進することが報告されている。しかしながら、骨細胞のメカニカルストレス受容メカニズムに関連する知見は限られており、未だに不明な点が多い。

miRNAはタンパク質をコードしないnon-coding RNAの一種であり、標的とするメッセンジャーRNAと干渉することにより、タンパク質合成を阻害する。miRNAはヒトでは約1900種類存在し、細胞の分化・増殖や発癌など様々な生命現象に関与することが報告されている。申請者の所属する研究グループでは、miRNAの一種であるmiR-206が骨芽細胞分化を抑制することを世界に先駆けて明らかにした(Proc Natl Acad Sci USA. 2009)。骨細胞によるメカニカルストレス応答は骨芽細胞分化と密接な関わりがあることから、申請者は、骨細胞のメカニカルストレス受容におけるmiRNAの意義に着目し、既に骨細胞特異的に発現が認められるmiRNAを複数同定した(塩飽ら未発表データ)。そこで、骨細胞特異的miRNAによるメカニカルストレス受容の分子機構を明らかにすることを目的とし、本研究を行う。

2. 研究の目的

骨細胞特異的に発現が変動するmiRNAを同定し、細胞及び個体レベルにおけるmiRNAの機能解析を行うことにより、骨細胞のメカニカルストレス応答におけるmiRNAの生理的意義を明らかにすることを

目的とする。

3. 研究の方法

(1)骨細胞特異的なmiRNAの同定 - 骨芽細胞との比較検討 -

次世代シーケンサーを用いた網羅的解析によって、骨細胞では特異的に発現変動し、骨芽細胞では顕著な変化が認められないmiRNAを同定する。申請者らは、骨細胞と骨芽細胞をフローサイトメトリー(FACS)によって識別し、それぞれの細胞を単離する手法を既に確立している。

(2)骨細胞特異的miRNAのシグナル伝達機構の解明

同定した骨細胞特異的miRNA下流のシグナル伝達を明らかにするため、in silico解析を用いて、miRNAの標的候補遺伝子を探査する。骨細胞特異的miRNAの過剰発現またはノックダウン試験を行い、in silicoで得られた標的候補遺伝子の発現変動を調査する。また、骨芽細胞分化に関与する転写因子の活性を評価系にして、miRNA下流のシグナル伝達機構を明らかにする。さらに、メカニカルストレス負荷条件下において骨細胞特異的miRNAの発現変動を解析し、骨細胞のメカニカルストレス応答におけるmiRNAの骨細胞分化能調節を解明する。

4. 研究成果

(1)次世代シーケンサーによる骨細胞特異的miRNAの同定 - 骨芽細胞との比較 -

骨細胞および骨芽細胞においてArgonauteタンパク質に結合するmiRNAを、次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。初代骨細胞を単離するために、DMP1-CreトランスジェニックマウスとEGFPレポーターマウスとを交配し、骨細胞特異的にGFPを発現するマウスを作成した。また、初代骨芽細胞の単離には、Col1プロモーター下流でECFPを発現するトランスジェニックマウスを用いた。フローサイトメトリー(FACS)を用いて、GFP陽性の骨細胞とCFP陽性の骨芽細胞を識別し、骨細胞と骨芽細胞のmiRNA発現を比較検討し、骨細胞特異的に発現が増加または減少しているmiRNAを同定した(図1、2)。

図1. FACSによるGFP陽性骨細胞の単離

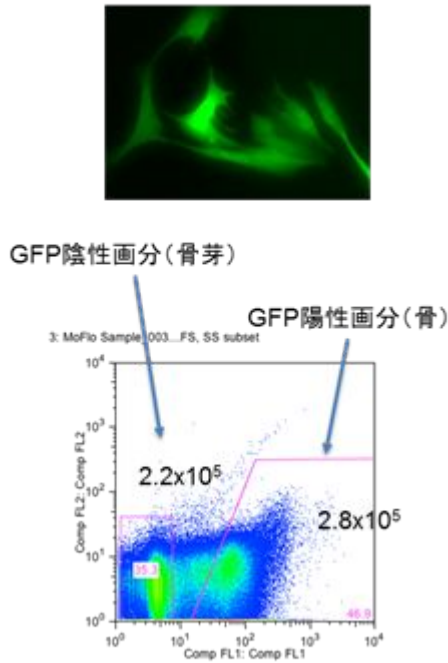
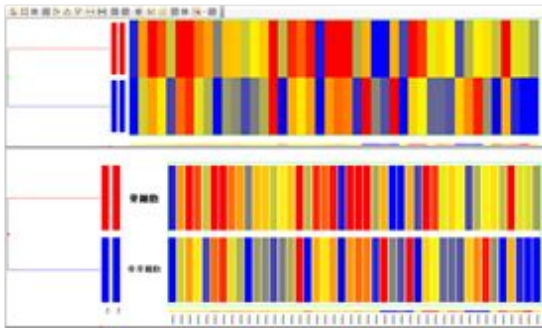


図2. 次世代シーケンス解析による骨細胞と骨芽細胞のmiRNA発現比較



(2)骨細胞培養による miRNA 標的遺伝子の検討と骨芽細胞分化能の評価

piggyBac トランスポゾンを用いて、miRNA を定常過剰発現する骨細胞株を作成し、骨細胞分化能と石灰化能を評価した。その結果、骨細胞特異的に発現し、ALP 活性及び石灰化を抑制する miRNA が同定され、骨細胞分化・石灰化調節に重要な役割を担う可能性が示唆された(図 3、4)。

図3. miRNAを定常発現させた骨細胞株のALP活性

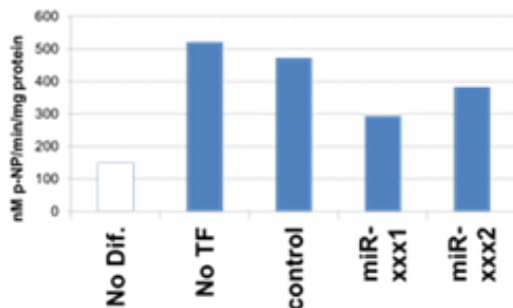
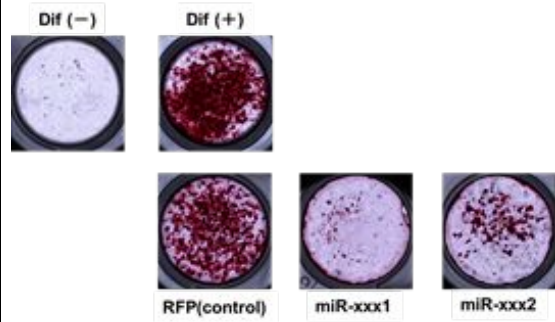


図4. miRNAを定常発現させた骨細胞株の石灰化能



(3)三次元培養による骨細胞特異的 miRNA の機能評価

生体内により近い三次元環境下において miRNA が骨細胞分化能に与える影響を明らかにするため、コラーゲン・ゲル包埋培養法を用いた三次元培養を確立し、miRNA の過剰発現あるいはノックダウン試験を行った。その結果、三次元培養においても骨細胞分化能を調節する miRNA が存在していることが明らかとなった。二次元培養での骨細胞分化の傾向と比較検討することにより、これまで同定していた miRNA の中から、骨細胞分化調節において特に重要な miRNA の絞り込みに成功した。

(4)骨細胞特異的 miRNA 標的遺伝子の同定と転写調節の解明

同定した miRNA の標的候補遺伝子を target scan, pictar 等のデータベースを用いて in silico で解析を行った。二次元骨細胞培養において、miRNA の過剰発現あるいはノックダウン試験を行い、miRNA 標的遺伝子の蛋白発現をウエスタンブロッティングにより評価した。その結果、複数の標的候補遺伝子の中から、骨細胞特異的 miRNA により発現が変化する標的遺伝子の絞り込みに成功した。また、標的遺伝子に関連するシグナル伝達経路に着目し、ルシフェラーゼアッセイによる転写調節の解析を行った。以上より、骨細胞分化を制御する miRNA の転写調節メカニズムの一端を解明し、骨細胞研究の進展に繋がる成果を得た。今後は、メカニカルストレス負荷条件下において、miRNA による骨細胞分化と転写調節の関連を明らかにしていく予定である。

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)

〔図書〕(計2件)

塩飽 由香利、竹田 秀、金原出版、産婦人科の実際、骨を基軸とした臓器間ネットワークによる代謝調節、2015、1348-1357 ページ

塩飽 由香利、竹田 秀、医学出版、月刊糖尿病、骨からみた糖尿病の病態と治療、2015、21-26 ページ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

塩飽 由香利 (Shiwaku Yukari)
東北大学大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80736190