

201108016A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発

(H22-政策創薬-一般-008)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者

江口 傑徳 (平成23年4月～平成23年7月)

渡辺 研 (平成23年8月～平成24年3月)

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発

(H22-政策創薬-一般-008)

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者

江口 傑徳 (平成23年4月～平成23年7月)

渡辺 研 (平成23年8月～平成24年3月)

平成24(2012)年 5月

総合研究報告書

目 次

総括研究報告	
歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発	----- 1
江口 傑徳・渡辺 研	
研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
研究成果の刊行物・別刷	----- 12

総括研究報告書

総括研究報告書

歯周病治療薬と歯槽骨再生方法の開発

研究代表者 江口 傑徳

(平成 23 年 4 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日)

渡辺 研

(平成 23 年 8 月 1 日～平成 24 年 3 月 31 日)

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 研究所

研究要旨

miRNAは、21-25 ntの一本鎖RNAであり、その機能として特定のmRNAからタンパク質への翻訳の抑制、mRNAの分解誘導および転写調節が知られてきた。さらに最近、エクソソームの中にmiRNAが存在することが分かってきた。これまでに骨細胞分化のマーカー、転写因子、増殖因子が報告されてきたが、それらを制御するmiRNAについての情報は少ない。本研究では、半網羅的なmiRNAアレイ解析を援用することによって、骨細胞形成過程におけるmiRNA発現変動パターンを明らかにし、特徴的な発現変動を示すmiRNAを抽出し、骨細胞分化関連因子との関わりを探った。結果として、骨関連因子、細胞の幹性、エピジェネティクス関連因子を制御することが予測されるmiRNAが骨細胞分化過程で発現変動することが明らかとなり、それらのmiRNAをostemiR(オステミア)と命名した。本研究で同定した OstemiR および anti-ostemiR は、生理的な骨代謝の理解に有用であると同時に、歯周病と骨粗鬆症の診断および治療のために有用な新しい指標およびツールとなりうる。

A. 研究目的

ゲノムからの転写産物の多くは、複数のステム、ループ、バルジ構造をとるが、それらのうちいくつかは microRNA 前駆体 (primary miRNA, pri-miRNA) をなす。哺乳類では、RNaseIII である Drosha タンパク質による切断によって、pri-miRNA からより単純なステム・バルジ・ループ構造をもつ pre-miRNA が発生する。その後 Exportin-5 によって細胞質へと輸送される (Grimm and Streetz, 2006; Diederichs and Jung, 2008)。さらに pre-miRNA は、やはり RNaseIII である Dicer 複合体によってループ部分が切断除去されることで二本鎖 RNA 構造が生成される。二本鎖 miRNA の各鎖すなわち一本鎖 mature miRNA あるいは siRNA は、およそ 20-30 ヌクレ

オチドの一本鎖 RNA であり、Argonaute タンパク質と RNA-induced silencing complex (RISC) を形成し (Siomi H and Siomi MC, 2009)、特定の mRNA との部分的なハイブリダイゼーションにより、特定の mRNA からタンパク質への翻訳の抑制 (Olsen and Ambros, 1999)、mRNA の分解誘導 (Hatvagner and Zamore, 2002; Llave and Xie, 2002) を行う。加えて、エクソソームの中にも miRNA が存在することが知られてきた (Hu and Drescher, 2012)。

発生過程における骨形成および成体における骨代謝にとって、骨芽細胞および骨細胞は主要な役割を担う細胞である。骨芽細胞は、多能性をもつ未分化間葉系幹細胞に由来する (Harada and Rodan, 2003)。骨芽細胞は、さらに

最終分化段階である骨細胞へと成熟し、骨マトリックスの中で個々の骨細胞はラクナと呼ばれる穴に存在する(Aarden and Burger, 1994). この分化と成熟は、骨芽細胞分化のマスター転写因子としてこれまでに Runx2/Cbfa1, Sp7/Osterix, beta-catenin が知られてきた(Karsenty and Kronenberg, 2009; Komori T, 2006). また骨芽細胞分化を促進する成長因子として BMP ファミリーや CCN ファミリーが知られている(Perbal and Takigawa, 2005; Kubota and Takigawa, 2011). これまでに、Runx2(Zhang and Xie, 2011), FAK (Eskildsen and Taipaleenmaki, 2011), Connexin43 (Inose and Ochi, 2009)のそれぞれの mRNA を直接認識することによって骨芽細胞分化を制御する miRNA が示されてきた.

骨芽細胞分化の研究には、MC3T3-E1 (MC3T3), C3H10T1/2, ST2, C2C12, KUSA-A1 (KUSA) および実験動物およびヒトからのプライマリー細胞が用いられてきた. これらのうち KUSA 細胞は培養皿中で旺盛に増殖し、豊富な ALP 活性、骨グラタンパク質(bglap/osteocalcin)の産生、石灰化を示し、Sca-1, CD44, Ly-6C, CD140 といった細胞表面マーカーを発現する(Ochi and Chen, 2002; Kawashima and Shindo, 2005). さらに、KUSA 細胞をマウス皮下に注射すると異所性骨化を誘発した. また、骨細胞の単離と培養が困難であることから有用な骨細胞株は少なく、プライマリー細胞が利用されてきた(Kato and Windle, 1997; Kamioka and Honjo, 2001). 既知の骨細胞マーカーとしては、DMP1, FGF-23, Sclerostin が知られている(Franz-Odenaal and Hall, 2006; Ikeda, 2008). 分泌タンパク質である DMP1 が最初に発表された骨細胞マーカーである(Toyosawa and Shintani, 2001). FGF-23 は、腎臓におけるリンの排泄とビタミン D の活性化を調節することで生体のミネラルの恒常性を維持するという重要な生理的機能をもつ(Lorenz-Depiereux and Bastephe, 2006; Feng and Ward, 2006;). 硬結性硬化症(Sclerosteosis)の原因遺伝子である sost にコードされる Sclerostin もまた骨細胞マーカーである(Bezooijen and Roelen, 2004; Winkler and Sutherland, 2003).

本研究では、半網羅的な miRNA Array 解析を援用することによって、KUSA 細胞の骨細胞分化過程における miRNA 発現変動パターンを明らかにする. それらの miRNA のうち特徴的な発現変動を示す miRNA を抽出し、骨細胞分化関連因子との関わりを探った.

B. 研究方法

細胞培養と分化誘導

マウス骨髄間質由来 KUSA-A1 (KUSA)細胞とマウス頭蓋冠由来 MC3T3-E1 (MC3T3)細胞は、理研細胞バンクより供与を受けた(Ochi and Chen, 2002). これらの細胞株は 10%血清を含む DMEM 中で、5%二酸化炭素濃度で培養された. 細胞はコンフルエントまで培養され、L アスコルビン酸、デキサメタゾン、ベータグリセロフォスフェートが2日おきに添加された.

カルシウム沈着の染色

アリザリンレッド染色は、通法に従い実施された(Kawata and Eguchi, 2006).

RNA の調製

小さな RNA を含むトータル RNA の調製は、miRNeasy mini kit(キアゲン)を用い、DNase 処理とともにを行った.

miRNA qPCR アレイ

アダプターを援用した cDNA 合成は RT2 first strand kit (SABiosciences)を用いて行った. miRNA qPCR アレイは、miFinder miRNA PCR array を用いて行った. miScript array data analysis を用いて、データ解析がなされた.

プライマーのデザインと qRT-PCR

cDNA は上記方法あるいは All-in-One miRNA qRT-PCR kit (Gene Copoeia)を用いて合成した. 各 mature miRNA に特異的なプライマーは、miRBase における一次及び二次構造に基づいて設計した(Griffiths-Jones and Saini, 2008). miRNA を定量するための qPCR は、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa)を用いて行った. qRT-PCR による mRNA の定量は通法に従い行った(Eguchi and Kubota, 2008).

miRNA のターゲット予測

TargetScan を援用した(Lewis and Burge, 2005).

統計

細胞は、デュプリケートあるいはトリプリケートで培養され実験に用いられた. リアルタイム PCR はトリプリケートで行われ、平均値が算出され用いられた. 標準偏差は、独立した培養皿のデータをもとに算出された.

C. 研究結果
KUSA 細胞の骨細胞分化

骨細胞分化のモデルとして, KUSA 細胞と MC3T3 細胞の有用性を検討した(図1).

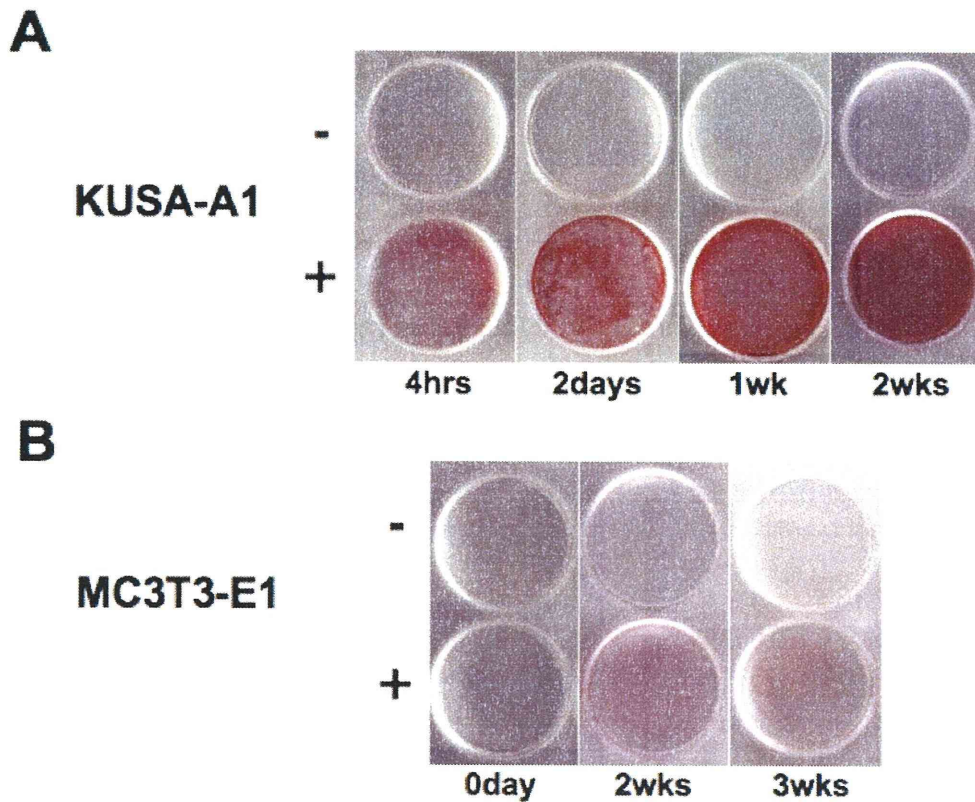


図1. KUSA-A1 (A)および MC3T3 (B)の骨芽細胞分化過程におけるアリザリンレッド染色.

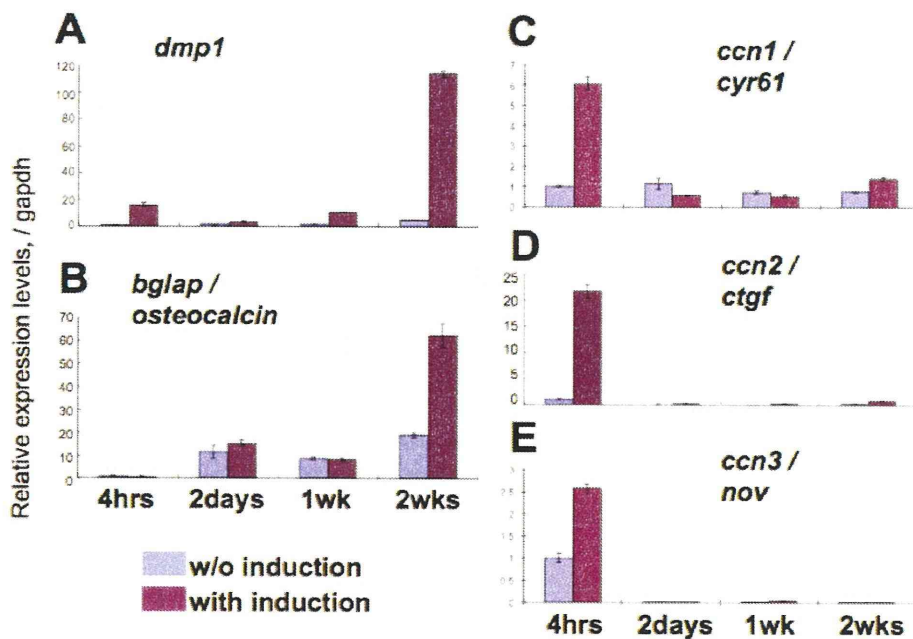


図2. KUSA-A1 細胞の分化過程における遺伝子発現変化. *Dmp1* (A) 及び *bglap/osteocalcin* (B) の mRNA は骨細胞マーカーとして定量された. *Cyr61/ccn1* (C), *ctgf/ccn2* (D) 及び *nov/ccn3* (E) の mRNAs は, 骨芽細胞と軟骨細胞のマーカーとして定量された.

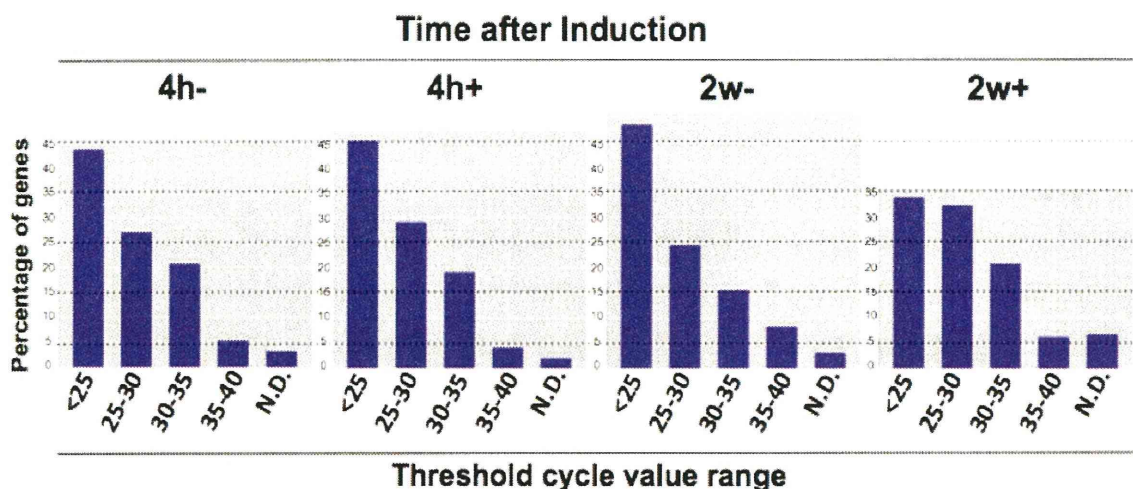


図3. 各実験条件間での miRNA 発現傾向の相違.

分化誘導サプリメントを添加することによって、KUSA 細胞では添加の4時間後から2週間後にかけて段階的なカルシウムの蓄積を認め、石灰化が立証された(図1A). このカルシウムの蓄積は KUSA 細胞においては2週間後に顕著であったが、MC3T3 細胞では大変緩やかであった(図1B).

細胞の分化段階についての確証を得るために、分化マーカーの定量を行った. 骨細胞マーカーである Dmp1 は、KUSA 細胞の段階的な石灰化の間に、顕著に誘導された(図2A). もう一つの骨細胞マーカーである Bglap/オステオカルシンは、分化誘導開始の2週間後に誘導が確認された(図2B). 加えて、CTGF, Cyr61, NovといったCCN ファミリーのメンバーが最初の分化刺激によって誘導された(図2C, D, E). これらの結果から、KUSA 細胞が骨細胞分化研究のモデルとして有用であることが再確認された.

miRNA アレイの概要

骨細胞分化と細胞の幹性(stemness)を制御する新規の miRNA の探索のために、qRT-PCR を基本とした miRNA アレイを使用した. 概要として、骨細胞分化誘導2週間での miRNA 発現レベルは、他の実験条件(誘導前および対象実験)と比較して全体的に低かった(図3A). 別の表現を使うと、ほとんどの miRNA は、KUSA 細胞の未成熟な段階と比べて成熟した骨細胞の段階において低く発現していた(データ略). 骨誘導の2週間後に発現低下した miRNA には let-7a ファミリーおよび miR-30 ファミリー(miR-30a/d/e)が含まれていた(データ略).

次に定量した全 miRNA をクラスタグラムによって解析した(図3B). クラスタグラムの結果に基づき、miRNA を8種類に分類した(データ略). 最も主要な miRNA 群は、骨誘導なしの2週間培養によって発現が上昇した miRNA 群であった.

オステミアについてより理解するために、2つの実験群間における miRNA の発現レベルを比較したヒートマップを作成した. miR-30d の発現レベルは、4h-の条件と比較した場合、4h+, 2w-, 2w+のいずれの条件においても高かった(図4A-C). 骨誘導のための一度の刺激によって、miR-30d だけでなく miR-155 も誘導された(図4A). miR-16 の発現レベルは、同様の単刺激によって減少した(図4A). 骨誘導の反復刺激によって、miR-30d と miR-30c が誘導され、miR-503, miR-322, miR-125-3p の発現レベルは最も抑制された(図4B). miR-30d と miR-150 は、他の miRNA と同様に2週間の長期培養によっても発現誘導された(図4C). miR-503 および miR-744 は長期培養によって減少した.

miRNA 発現の標準化された定量

KUSA の骨細胞分化における miRNA 定量のための内部標準を決定するために、Snord85, Snord66, Rnu6, miRTC, PPC の発現パターンを miRNA アレイの結果から抽出した(図5A). それらのうち Snord66 と PPC の発現パターンは各実験条件間において最も安定しており、Rnu6 と Snord85 の発現パターンは安定していなかった. 従って、Snord66 と PPC をその後の KUSA 骨細胞分化実験における miRNA 定量の内部標準として適用した.

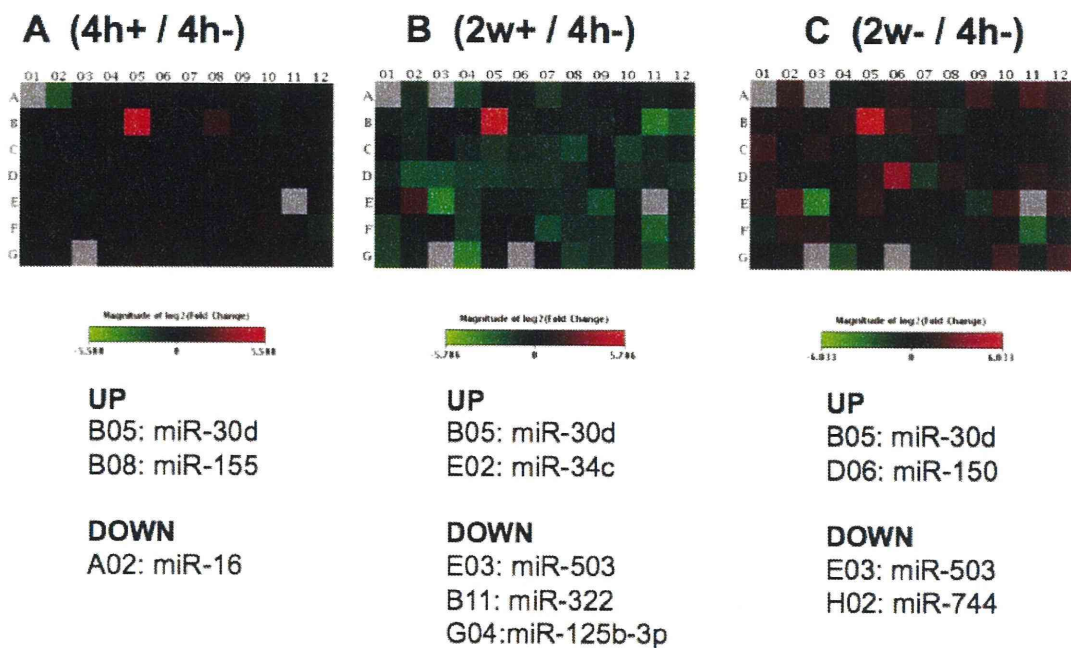


図4. miRNA アレイ及びヒートマップ解析. 発現上昇は赤, 発現低下は緑で示した. 骨誘導の4時間後(4h+, A), 2週間の骨誘導(2w+), 2週間の長期培養(2w-)の各 miRNA 発現量は, 無刺激の miRNA 発現量(4h-)と相対比較された.

次に, miRNA アレイの結果の信憑性について確認するために, 各 miRNA に対する特異的プライマーを設計し, それらを用いて qRT-PCR を行った. miR-21 および miR-155 の発現は, qRT-PCR によっても miRNA アレイによっても最初の刺激によって上昇したものの, 最終分化段階においては抑制された. miR-322 についても同様の方法で検討し, qRT-PCR および miRNA アレイの両方において, 骨誘導の2週間後の時点で発現の低下を示した(データ略). miR-16 が骨細胞ステージにおいて抑制されるとの結果は, qRT-PCR によっても miRNA アレイによっても確認された(データ略). miRNA アレイの結果, miR-30d は単刺激, 複数回刺激, 長期培養のいずれでも誘導されるとの結果を得たものの, qRT-PCR の結果では単刺激のみによって誘導されるとの結果を得た(データ略).

オステミア (ostemiR) のターゲットおよび機能の予測

骨細胞分化の過程で顕著に発現変動した miRNA の機能とターゲットについて, 予測及び推察を行った(表2). これらのオステミアは, 骨形成あるいは細胞の幹性に関わる遺伝子をターゲットとすると予測された. エピジェネティクス関連遺伝子もまたオステミアのターゲットであると予

測された. 骨細胞分化の間に上昇した一群の miRNA, すなわち miR-30d, miR-155, miR-21, miR-16 を含む miRNA 群は, 骨形成マーカーであると同時に, 骨芽細胞の幹性の維持を抑制する可能性がある. miR-34c と miR-16 はいずれも骨細胞ステージである 2w+ で上昇したため, 骨細胞マーカーであると同時に, 骨芽細胞維持遺伝子を抑制する可能性がある.

骨制御因子をターゲットとする miRNA の予測

骨制御因子をターゲットとする miRNA の予測によって, 脊椎動物間で保存された, 哺乳類のみで保存された, あるいは種間であまり保存されていない miRNA 認識部位が各 3' 非翻訳領域上に予測された. 以下では脊椎動物間で保存された, あるいは哺乳類で保存された miRNA について論ずる. 骨細胞マーカーである Dmpl の 3' 非翻訳領域を認識する miRNA として, let-7/miR-98 が予測された(データ略). let-7 ファミリーの全メンバーは, 骨細胞分化の過程で発現抑制されたことから, let-7 ファミリーの低下は dmpl 遺伝子の発現抑制を解除することが示唆された. さらに, 骨形成因子である ctgf/ccn2 の 3' 非翻訳領域を認識すると予測された miRNA の中でも, miR-18ab と miR-19 は骨

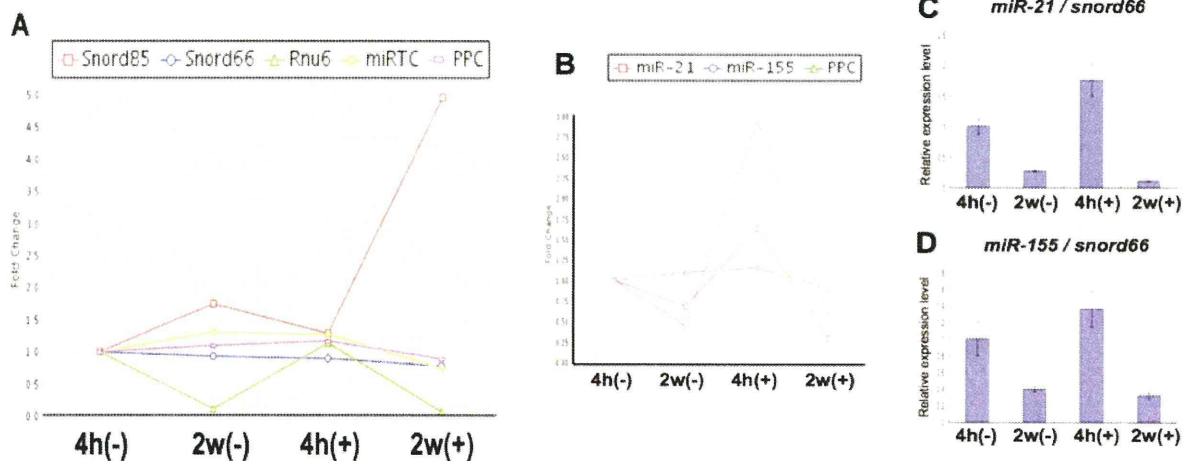


図5. 骨細胞分化過程における miRNA の発現定量. (A) miRNA 発現定量のための内部標準の検討. (B) miRNA アレイによる miR-21 及び miR-155 の発現変動. (C, D) リアルタイム PCR による miR-21 及び miR-155 の発現変動. 内部標準として Snord66 を用いた.

細胞分化の過程で上昇するオステミアでもあった.

骨芽細胞最終分化と転写因子群

骨芽細胞分化において Runx2 や Osterix が必須の役割を担っていることはすでに明らかになっているが、後期の分化(骨細胞への最終分化)については未知である。そこで、MC3T3 の長期培養において発現誘導される転写因子の検索を行った。骨細胞分化のマーカーとして、*sost*, *pheX*, *mepe* の遺伝子発現を指標にして、MC3T3 細胞を7週間分化培養し、これらの遺伝子群発現を確認した。この過程で、*dlx3*, *mef2c*, *tcf7* といった転写因子群の発現亢進が顕著であることを見いだした。そこで、これらの転写因子群の強制発現ならびにノックダウンによる機能亢進と機能減少による骨芽細胞最終分化のプロファイリングを行ったところ、*Dlx3* 強制発現系で骨細胞分化が亢進し、また、*Mef2c* と *Tcf7* の強制発現では部分的に分化が亢進した。一方、*Dlx3*, *Mef2c*, *Tcf7* のいずれのノックダウンでも骨芽細胞最終分化は抑制された。骨芽細胞分化での必須な役割について既知である Runx2, Osterix の強制発現発現では、Runx2 は骨芽細胞後期分化において抑制、Osterix は亢進した。これらのノックダウンは両者とも骨芽細胞の分化形態が低下し、それに伴い後期分化も低下した。

D. 考察

本研究では、まず KUSA 細胞を活用して、骨芽細胞が骨細胞に成熟する実験系を確立した。

Osteocytogenesis における miRNA の半網羅的な発現解析によって、Osteocytogenesis に伴い特徴的に発現変動する一群の miRNA が明らかとなりそれらを *OstemiR* と命名した。その一部を、個別の定量 PCR で解析し、miRNA PCR Array と個別の PCR との間で類似した結果を得た。*OstemiR* のターゲット予測の結果、骨形成に必須の転写因子である Runx2 やパターン形成に必須の成長因子 Wnt family などが予想された。またエピジェネティクスに関わる遺伝子も *OstemiR* のターゲットとして予想された。骨形成に関わる *dmp1*, *ctgf*, *runx2* および *osterix* の 3' 非翻訳領域探索の結果、miRNA Array で抽出した *OstemiR* が *dmp1*, *ctgf*, *runx2* および *osterix* を標的とすることが予測された。

骨細胞分化研究における KUSA 細胞の有用性

骨芽細胞分化モデルとして KUSA 細胞および MC3T3 細胞を検討した(図1)。その結果、KUSA 細胞では顕著かつ段階的な石灰化および *dmp1* と *bglap/ocn* の発現上昇を認めた。また分化誘導初期に CTGF/CCN2, *Cyr61/CCN1*, *Nov/CCN3* といった CCN 遺伝子ファミリーの顕著な発現上昇を認めた。これに対し、MC3T3 では僅かな石灰化しか認めなかった。このように骨髄間質細胞である KUSA 細胞が、今回用いたサプリメントによって綺麗に骨細胞まで分化誘導したのに対し、頭蓋骨由来である MC3T3 は今回の分化誘導とマッチしなかったと考えられた。これらの結果から、KUSA 骨細胞分化系は、骨研究のために有用であることが分かった。

miRNA	Results in arrays	Results in qRT-PCR (M)	Possible actions	Possible target signals	TargetScan, bone- and stem-related	TargetScan, epigenetic and others
miR-30d	Low in 4h-	High in 2h+	Repressing stemness or osteoblast factors	Wnt, FGF, BMP/TGFb, Runx2, Osx	RUNX2, SOX9, LRP6, SMAD2, SMAD1, NOTCH1, NOV TET1, TET3,	ITGA4, MLL, SNAI1, JMJD1A, ITGB3, SIRT1, HDAC5, ITGA5, NCOA1, HOXB8, IGF, FOXO3, SENP5, MBD6, IGF2R, IGF1R, KLF9, KLF11, ZEB2, BDNF, HSPA5,
miR-155	High in 4h+, Low in 4h-	Similar	Repressing stemness or osteoblast factor	Wnt, FGF, BMP/TGFb, Runx2, Osx	LRP1B, TCF4, SP1, SMAD2, GDF6, FGF7, FOS, SMAD1, SP3, TGFBR2, ACVR2B,	JHDM1D, TP53INP1, JARID1B, SIRT1, SMARCA1, KLF3, DNABJ1, Claudin-1,
miR-21	High in 4h+, Low in 4h-	Similar	Repressing stemness or osteoblast factor	Wnt, FGF, BMP/TGFb, Runx2, Osx	BMPR2, ACVR1C, SKI, LIFR, TGFBI, SOX5, FGF1, SMAD7, LRP6, KLF5, SOX2, TGFBR2, MSX1, TET1,	RECK, ITGB8, KLF3, JHDM1D, TIMP3, KLF12,
miR-34c	High in 2w+, low in 4h-		Repressing stemness or osteoblast factor	Wnt, FGF, BMP/TGFb, Runx2, Osx	MYCN, FGF23, NOTCH1/2, ACVR2B, SMAD4, FOSB	HSPA1B, CTNND2, BCL2, JHDM1D, ITGB8, ITGA10, TGIF2, PDGFRA,
miR-16*	High in 4h-, Low in 4h+/2w+	Low in 2w+	Repressing stemness or osteoblast factors	Wnt, FGF, BMP/TGFb, Runx2, Osx, CCN	INSR, ACVR2B, SMURF1, FGF7, LRP2/6, FGFR1, SMAD7, WNT3A, NOTCH2, SMAD5, SMAD3, IHH, WNT4, TGFBR3, LRP1B, TCF3, SMURF2, BMPR1A, IGF2R, WNT7A, BMP8A, WISP1, SOX5, WNT5B, ACVR2A	MYB, GFAP, SIRT4, MYBL1, VEGFA, RECK, BDNF, HSPG2, SUMO3, ITGA10, LITAF, FOXO1, CREBZF, CTNBP1, FOSL1, TET3, IGF1R, IGF1, GHR, RICTOR, CLDN2, DNABJ4, PTH,
miR-503	High in 4h-, Low in 2w+/-		Repressing stemness or osteoblast factors	BMP/TGFb, Runx2, Osx, CCN	SMURF1, FGF7, INSR, ACVR2B, BMPR1A, SMAD7, SMURF2, WNT3A, WNT4, SOX5, IHH	RECK, JARID2, VEGFA, MYBL1, FOSL1, HSPG2, IGF1, IGF1R,
miR-541						
miR-744	High in 2w+/-, Low in 4h-		Repressing stemness factors		JUNB, TGFB1	LRP3

表1. オステミア (OstemiR) の発現パターン及びターゲット予測. miRNA の発現パターンから機能とターゲット mRNA が予測された. ヒトにおけるターゲット mRNA は, TargetScan 5.2 を用いて予測した. 骨, 幹性およびエピジェネティクスに関わるターゲット mRNA を列挙した. miR-16 及び miR-322/424 はターゲットを共有する.

miRNA Array および定量 PCR によるオステミアの抽出

次に, miRNA Array によって半網羅的解析を行った結果, まず骨細胞分化ステージである 2w+ では, 他の実験条件と比較してほとんどの miRNA の発現が低下し, それらには Let-7 family および miR-30a/d/e が含まれていた(図3, 表1). 従って, miRNA の総量が骨細胞では低下すると考えられる. このことは, 第一に, 多くの遺伝子の翻訳抑制の解除が起こることを意味する.

さらにヒートマップ解析とスキャッタープロット解析によって, OstemiR を抽出した(図4). miRNA PCR Array によって抽出された OstemiR について, 個別の定量 PCR によっても発現パターン解析を行った. まず miRNA Array の結果から, 内部標準を検討した結果, Snord66 が最も発現変動が少なかったためこれを KUSA 骨細胞分化系における内部標準とした. 個別の定量 PCR の結果, miR-21, miR-155, miR-322/424 については, 2つの実験系の間で, ほぼ同様の結果を得られ, データの信頼性が高まった. miR-16, miR-30d については, 2つの実験系の間で, 共通しない部分があった. 実験原理を踏まえて考察すると, miRNA PCR Array はスクリーニングとして網羅的解析に向いているものの, 細かな条件設定と検討には向かない. 個別の miRNA の定量のためには, より効率的でリニアな増幅が確認できる個別のリアルタイム PCR が向いている. したがって,

最終的にはリアルタイム PCR のデータのほうが信頼度が高い.

オステミアのターゲット予測

これまでの発現パターン解析によって, 特徴的な発現変動を示した miRNA について, その機能予測とターゲット予測を行った(表1). ターゲット予測によって, OstemiR は骨形成および幹細胞誘導に関わる遺伝子をターゲットとすることが予測された. またエピジェネティクスに関連する遺伝子も OstemiR のターゲットとして予測された. OstemiR のうち分化誘導に伴い発現上昇する miR-30d, miR-155, miR-21, miR-16 は, 骨芽細胞の分化マーカーであり, 未成熟な Osteoprogenitor を維持する因子を抑制する可能性がある. 骨細胞段階である 2w+ で発現上昇する miR-16, 34c は, 骨細胞マーカーであり, 骨細胞分化抑制性の骨芽細胞維持遺伝子を抑制する可能性がある.

骨細胞分化制御因子をターゲットとする miRNA の検索

骨芽細胞分化マーカーを標的とする miRNA を予測したところ, 脊椎動物間で広く保存された miRNA 認識部位, 哺乳類でのみ保存された miRNA 認識部位, 保存度の低い miRNA 認識部位がそれぞれ予測された. ここでは, 脊椎動物あるいは哺乳類で保存された miRNA およびその認識領域のみについて考察する. 骨細胞マーカーである dmp1 の 3' 非翻訳領域を認識する miRNA として let-7/98 が予測された. 今回の実

験で, let-7 family のメンバーはいずれも骨細胞分化で発現低下したため, let-7 family の発現低下によって Dmp1 の発現抑制解除が起こったと考えられる。

CCN2/CTGF の mRNA 制御

骨芽細胞および軟骨細胞の分化促進因子である *ctgf/ccn2* の 3'-UTR から予測された miRNA のうち, miR-18ab, miR-19 は OstemiR であり, 他に miR-26ab/1297, miR-132/212, miR-133 が予測された. *ccn2/ctgf* mRNA の 3' 非翻訳領域には CAESAR という遺伝子発現抑制領域があり (Kubota and Kondo, 2000; Eguchi and Kubota, 2001), またマウス (Kondo and Kubota, 2000) およびニワトリ (Mukudai and Kubota, 2005; 2008) の *ccn2/ctgf* にも遺伝子発現を負に調節する領域が示されてきた. 本研究の OstemiR として miR-18ab が抽出されたが, miR-18a は既にヒトにおいて *ctgf/ccn2* mRNA に直接作用することが報告されている (Ohgawara and Kubota, 2009). また *ctgf/ccn2* の遺伝子発現は, デキサメタゾンによって誘導されることが知られている (Dammeier and Beer, 1998; Kubota and Moritani, 2003), 本研究での骨誘導による *ctgf/ccn2* の急激な発現上昇も同じ機序と考えられる. またデキサメタゾンによる *ctgf/ccn2* 発現誘導および抑制は, 既報の miR-18a および本研究で明らかとなった前述の複数の miRNA の作用によるものと考えられる。

Runx2 を制御する miRNA

骨芽細胞分化のマスター転写因子である Runx2 は, 分化誘導後 4h, 2d, 1w の時点で抑制されたが, 2w で発現が上昇した. Runx2 の 3' 非翻訳領域には 2カ所の miR-30a/d/e 認識配列, および 1カ所の miR-23ab 認識配列が予測され, それらは今回の実験で発現変動した OstemiR である. 他に miR-205, miR-218, miR-338, miR-106/302, miR-203, miR-217, miR-204/211 が予測された. 定量 PCR では miR-30d は 4h+ で発現上昇するものの 2w+ ではコントロールと同様の発現レベルであった. 従って, miR-30d は Runx2 の発現を抑制するが, miR-30d の発現が低下することで Runx2 の発現抑制の解除が起こると考えられる. miR-30a/e も Runx2 を標的とすると予測され, これらは 2w- で発現低下することから, miR-30 family は Runx2 を標的として骨の細胞分化に関与すると考えられる。

Runx2 を制御する miRNA として miR-30c, miR-135a, miR-204, miR-133a, miR-217, miR-

205, miR-34, miR-23a, miR-338 が立証されている (Zhang and Xie, 2011). それらの miRNA は Runx2 のタンパク質の発現を抑制するだけでなく, 3'-UTR のレポーターおよび ALP 活性をも抑制し, さらにそれらの Anti-miRNA は, Runx2 3'-UTR のレポーターを活性化した. 我々の実験においても miR-30a/d/e, miR-34c の発現が変動したため, Zhang らの報告でみられたように Runx2 の発現を抑制すると考えられる。

Osterix を制御する miRNA

もう一つの骨芽細胞分化のマスター転写因子 Sp7/Osterix の発現は, 1w+ で著しく抑制されていた. Osterix を標的とすると予測された miRNA のうち, miR-96/1271, miR-125, miR-27ab は OstemiR であり, 他に miR-383, miR-145 が予測された. miR-27ab, miR-96, miR-125 は 2w- で発現上昇し, 特に miR-125 は 2w+ で発現が低下した. Osterix の発現変動パターンはトリッキーではあるが, miR-96, 125, 27ab, miR-383, miR-145 による発現抑制と解除が推察される。

この他に, ヒト骨髄間質由来間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御する miRNA として miR-138 が報告されている (Eskildsen and Taipaleenmaki, 2011). miR-138 は FAK の制御を介して骨芽細胞分化を抑制する。

骨細胞分化に関わる転写因子群

骨芽細胞分化に Runx2 ならびに Osterix が必須であることが示されてきたが, 後期分化、骨細胞分化に至る過程で機能する転写因子群は知られていない. 本研究で新たに 3つの転写因子を同定した. そのうち Mef2c は骨形成の阻害に関わる *sost* の遺伝子調節に関わる事が知られている. 一方, これらの転写因子は前者の既知の転写因子とはことなり, 他の組織や細胞でも発現しており, 骨芽細胞では後期分化に寄与していると考えられる. 一方, Runx2 は後期分化に対して抑制的に働いている. これまでに Runx2 の骨芽細胞での過剰発現マウスでは, この必須な役割にも関わらず, 骨量の低下と骨細胞の喪失が報告されている (Liu et al., 2001). また, Osterix は骨細胞での発現が高く, コンディショナルノックアウトマウスでは, 骨細胞の異常や発現遺伝子の低下が観察されている (Zhou et al, 2010). 骨細胞は骨の恒常性に対して, 骨代謝を制御するメタボロスタットの役割を担っていることが考えられている事から (Watanabe and Ikeda, 2010), 単なる転写因子の導入による分化亢進ではなく, 適度 (分化時期や状況) な発現

調節が、効率のよい骨の再生においても重要と思われる。この点においても miRNA の応用は有効であると考えられる。

E. 結論

本研究で明らかにされた OstemiR は、今後の機能解析によって、単数の miRNA あるいは anti-miRNA、もしくは複数の組み合わせによって、骨芽細胞分化を正負に調節すると考えられる。miRNA はタンパク質や抗体と比べると小分子であるため、比較的簡単かつ安価に合成および定量できる。また miRNA が細胞外に分泌されるとい生物学的および医学的に重要な報告が増えている (Hu and Drescher, 2012)。従って、本研究で同定した OstemiR および anti-ostemiR は、生理的な骨代謝の理解に有用であると同時に、歯周病と骨粗鬆症の診断および治療のために有用な新しい指標およびツールとなりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Role of low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in CCN2/connective tissue growth factor (CTGF) protein transport in chondrocytes. Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama E, Moritani NH, Kondo S, Nishida T, Takigawa M. J Cell Sci. 2012 Mar 27.

2. 学会発表

江口傑徳, 土屋由佳子. 骨芽細胞分化に関わる microRNAs の同定. 第5回エピジェネティクス研究会年会. 2011年5月19日. 熊本.

Watanabe K, Aburatani H, Ikeda K
An in vitro model for osteocyte differentiation.
The 33rd Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. Sep 18 San Diego, USA

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

別紙4

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Watanabe K.	Classical models of senile osteoporosis	Duque G, Watanabe K	Osteoporosis Research	Springer-Verlag	London, UK	2011	115-121

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawata K, Kubota S, Eguchi T, Aoyama E, Moritani NH, Kondo S, Nishida T, Takigawa M.	Role of low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in CCN2/connective tissue growth factor (CTGF) protein transport in chondrocytes.	Journal of cell science	in press	in press	2012

研究成果(発表論文別刷)

1 **Role of low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) in**
2 **CCN2/connective tissue growth factor (CTGF) protein transport in chondrocytes**

3

4 Kazumi Kawata¹, Satoshi Kubota¹, Takanori Eguchi¹, Eriko Aoyama², Norifumi H.
5 Moritani³, Seiji Kondo¹, Takashi Nishida¹ and Masaharu Takigawa^{1,*}

6

7 ¹Department of Biochemistry and Molecular Dentistry, Okayama University Graduate
8 School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1 Shikata-Cho,
9 Kita-ku, Okayama-City, Okayama 700-8525, Japan

10 ²Biodental Research Center, Okayama University Dental School, 2-5-1 Shikata-Cho,
11 Kita-ku, Okayama-City, Okayama 700-8525, Japan

12 ³Department of Oral and Maxillofacial Reconstructive Surgery, Okayama University
13 Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, 2-5-1
14 Shikata-Cho, Kita-ku, Okayama-City, Okayama 700-8525, Japan

15

16 *Author for correspondence. (e-mail: takigawa@md.okayama-u.ac.jp)

17

1 **Summary**

2 LRP1 is known to be a receptor for signal transmission and endocytosis. We formerly
3 reported that LRP1 regulates WNT/ β -catenin and protein kinase C signaling in
4 chondrocytes and represses the hypertrophy of chondrocytes during endochondral
5 ossification, and that LRP1 is co-localized with a ligand, CCN2, which conducts
6 endochondral ossification, on chondrocytes. However, the role of LRP1 in endocytotic
7 transport of CCN2 in chondrocytes is not yet understood. In the present study, we
8 investigated the interaction between LRP1 and CCN2 during endocytotic trafficking.

9 RNAi-mediated knockdown of *LRP1* in chondrocytic HCS-2/8 cells showed that the
10 amount of exogenous CCN2 binding/incorporation was decreased in the *LRP1*
11 down-regulated cells. Importantly, we observed that CCN2 internalization in
12 chondrocytes was dependent on clathrin and internalized CCN2 was co-localized with
13 an early or recycling endosome marker. Transcytosis of CCN2 through HCS-2/8 cells
14 was confirmed by performing experiments with a trans-well apparatus, and the amount
15 of transcytosed CCN2 was decreased by an LRP1 antagonist. These findings rule out
16 possible leakage and confirm the critical involvement of LRP1 during experimental
17 transcytosis. Moreover, under the hypoxic condition mimicking the cartilaginous
18 microenvironment, the production level of LRP1 and the amount of transcytosed CCN2
19 were increased, which increases were neutralized by the LRP1 antagonist. The
20 distribution of LRP1 and its antagonist in the growth plate in vivo was consistent with
21 that of CCN2 therein, which was produced by and transported from the chondrocytes in
22 the prehypertrophic layer.

23 These findings suggest that LRP1 mediates the transcytosis of CCN2, which may be a
24 critical event that determines the distribution of CCN2 in cartilage.

25

26 Keywords: low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), chondrocytes,
27 CCN2/connective tissue growth factor (CTGF), endocytosis, transcytosis

1

2 Running title: LRP1 induced CCN2 transcytosis

3

1 Introduction

2 The low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related protein-1 (LRP1), is a 600-kDa
3 type I membrane protein and a member of the LDLR family (Herz and Strickland,
4 2001). By interacting with over 40 distinct ligands, LRP1 is thought to regulate lipid
5 homeostasis, extracellular proteolysis, growth factor/cytokine activity, composition of
6 the extracellular matrix (ECM), and even immune responses (Herz, 2001; Herz and
7 Strickland, 2001; Lillis et al., 2008). A significant part of these LRP1 functions is
8 thought to be related to clathrin-dependent endocytosis (Hussain, 2001) and cellular
9 signal transduction pathways (Herz, 2001; Herz and Strickland, 2001; Lillis et al., 2008),
10 such as protein kinase C (PKC) cascades (Hayashi et al., 2007). Recently, LRP1 was
11 shown to interact with human frizzled-1 to down-regulate the canonical WNT/ β -catenin
12 signaling pathway (Zilberberg et al., 2004). Consistent with its functional diversity,
13 LRP1 is essential for embryonic development. It was reported that conventional
14 *Lrp1*-deficient animals failed to develop normally and died during early to
15 mid-gestation (Herz et al., 1992). Of note, the involvement of LRP1 in the prevention
16 of atherosclerosis was also indicated by utilizing conditional gene targeting technology
17 (Boucher et al., 2003). Also, the expression and function of LRP1 in the central
18 nervous system (May and Herz, 2003), vascular smooth muscle cells (Boucher et al.,
19 2003), and macrophages (Gardai et al., 2003) have been relatively well characterized.

20 We formerly demonstrated the distribution of LRP1 in normal cartilage (Kawata et al.,
21 2006) and reported that LRP1 initiates the hypertrophy of chondrocytes during
22 endochondral ossification through the WNT/ β -catenin and PKC signaling (Kawata et al.,
23 2010). Vertebrate cartilage is of two distinct types, permanent cartilage represented by
24 articular cartilage, and temporary cartilage represented by the growth plate cartilage
25 where endochondral ossification occurs. During endochondral ossification,
26 chondrocytes first proliferate, and then become mature cells that produce abundant
27 ECM components such as type II collagen. Thereafter, the cells eventually