

平成 25 年度 実用化研究報告書

「破骨細胞における新規 RNA 結合タンパク質を利用した創薬のための基盤研究」

岩手医科大学 解剖学講座 機能形態学分野

助教 鍵谷忠慶

1. はじめに

骨は、身体を支持する重要な器官である。成長期を過ぎた成人の骨でも、破骨細胞による古い骨の吸収と骨芽細胞による骨形成が起こり、骨は代謝している。正常な成人の骨では、吸収量と形成量が等しいため、骨量は不変である。関節リウマチや骨粗鬆症は、破骨細胞数の増加や個々の破骨細胞の活性化（吸収力の増加）によって、このバランスが吸収過多の方へ傾いたために引き起こされる。従って、骨芽細胞や破骨細胞の動態を分子レベルで研究することは、各種骨疾患の治療薬（法）の開発に重要である。

破骨細胞は、造血幹細胞に由来する単球・マクロファージ系の細胞が融合して、多核巨細胞となった細胞である。骨芽細胞等が分泌する RANKL と呼ばれるサイトカインが、破骨細胞前駆細胞のレセプター (RANK) へ結合すると、TRAF6, NFκB, あるいは c-Fos を介してマスター転写因子である NFATc1 が誘導されて、破骨細胞が形成される [1]。

さて、DNA の遺伝情報は、mRNA に転写され、この情報に応じたアミノ酸が運搬され、タンパク質へ翻訳される。近年、この翻訳過程に microRNA と呼ばれる新しい RNA の関与が明らかとなった。microRNA は、約 22 塩基長からなる 1 本鎖の non-coding RNA で、真核生物のゲノムにコードされており、細胞の分化、増殖、癌化などを制御することが報告されており、遺伝子発現制御を行う新たな分子であると考えられている。多くの microRNA は、RNA ポリメラーゼ II によってゲノム DNA から転写され、標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) に結合し、タンパク質への翻訳を制御する。RNA 結合タンパク質は、この過程のなかで、mRNA の輸送、安定化（分解抑制）、あるいは翻訳制御等に関与していると考えられる。

前述のように、破骨細胞分化に関与するシグナル伝達経路は、明らかになりつつあるが、これを担う転写因子等の mRNA が microRNA や RNA 結合タンパク質によってどのように制御されているかは、不明である。本研究では、「破骨細胞分化を担う転写因子等の mRNA が、microRNA や RNA 結合タンパク質によって制御されている」という作業仮説を立て、これを証明することを目標とした。

2. 破骨細胞分化に重要な microRNA について

破骨細胞分化に重要な microRNA を見つけるために、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を用いて、RANKL 単独と TNF- α と RANKL の組合せの 2 通りで破骨細胞を誘導して検討した。RANKL 単独または、TNF- α /RANKL を作用させてから 0, 24, 82 時間後に total RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。また、発現変動の大きかった microRNA について、qRT-PCR 法によって、アレイ解析の結果を検証した。更に、マウス初代骨髄細胞を使って破骨細胞を誘導する系でも、qRT-PCR 法でその結果を検証した。表 1 は RANKL 単独と TNF- α と RANKL の組合せの 2 通りで破骨細胞を誘導した時に、2 倍以上変動した microRNA をまとめたものである。miR-223 と miR-378 は、破骨細胞分化に重要である可能性があり、miR-21, miR-29b, miR-146a, miR-155, および miR-210 は TNF- α と RANKL の組合せでの破骨細胞分化に関与している可能性が示唆された。

表 1 破骨細胞分化過程で 2 倍以上 変動した microRNA

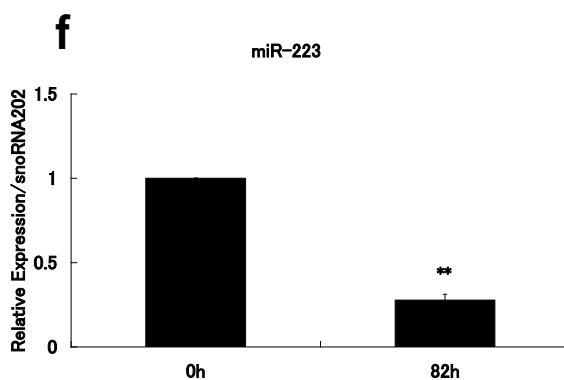
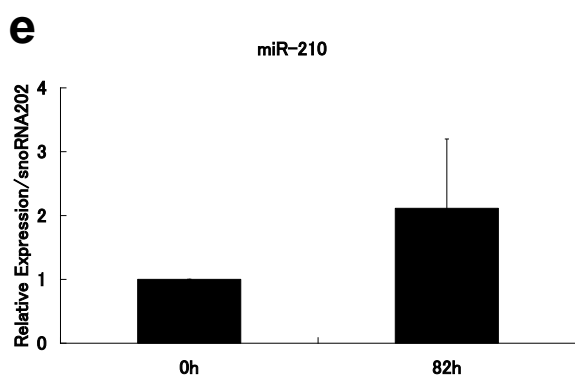
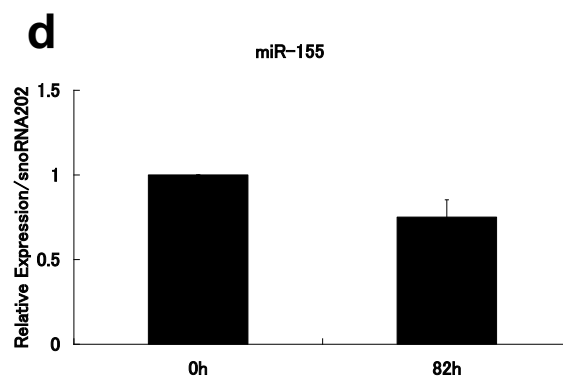
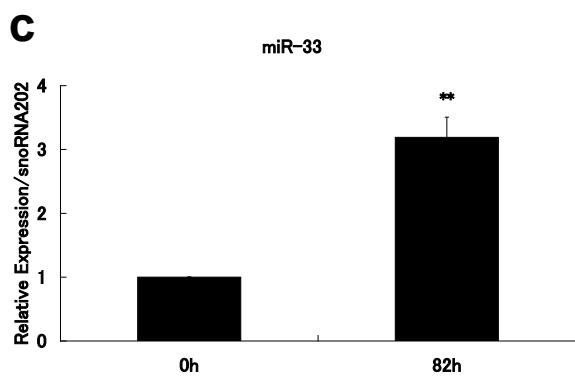
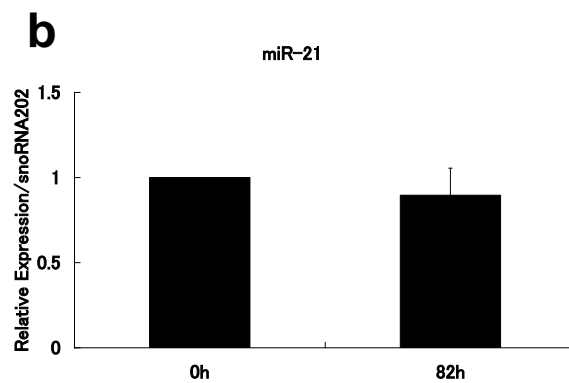
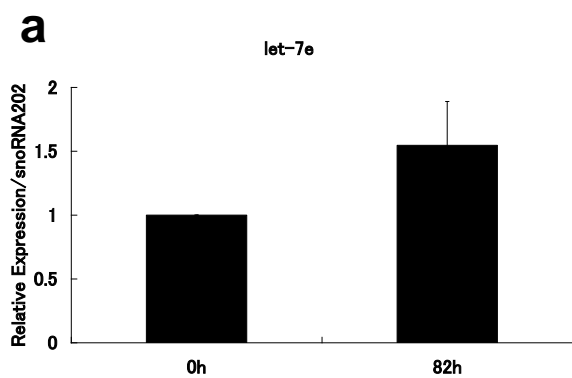
	TNF- α /RANKL	RANKL	TNF- α /RANKL RANKL
Downregulation	–	miR-23b, miR-146a, miR-146b, miR-338-3p	miR-223, miR-342-3p
Upregulation	miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-30e, miR-34a, miR-101a, miR-101b, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-148b, miR-199a-3p, miR-365, miR-1892, miR-1904	miR-18a, miR-99a, miR-100, miR-378*, miR-714	let-7e, miR-19a, miR-33, miR-96, miR-125a-3p, miR-139-3p, miR-183, miR-188-5p, miR-193, miR-210, miR-378, miR-483, miR-494, miR-671-5p, miR-674*, miR-680, miR-689, miR-721, miR-1224, miR-1895, miR-1897-5p

Kagiya *et al.* J Periodontal Res 2013, 文献[1]より引用

3. 破骨細胞の細胞外に分泌される microRNA について

これまで microRNA は、細胞内で発現・機能すると考えられていたが、最近、細胞外へも放出され、機能するという報告が相次いでいる [2, 3, 4]。細胞外へ放出される microRNA には、Argonaute などのタンパク質と結合して直接放出される場合と細胞外小胞 (Extracellular Microvesicles) に包まれて放出される場合がある。後者の場合、Extracellular Microvesicles のなかでも特に、エクソソーム (Exosomes) と呼ばれる直径 50-100nm のエンドソームに由来する小胞が microRNA 輸送の中心的役割を担っていると

考えられている。そこで、RANKL 誘導性破骨細胞分化に特に重要であると考えられる let-7e, miR-21, miR-33, miR-155, miR-210, miR-223, miR-378, miR-1224 について、マウス初代骨髄細胞培養系を使って細胞内での発現と細胞外小胞 (Exosome を含む) での発現について検討した。



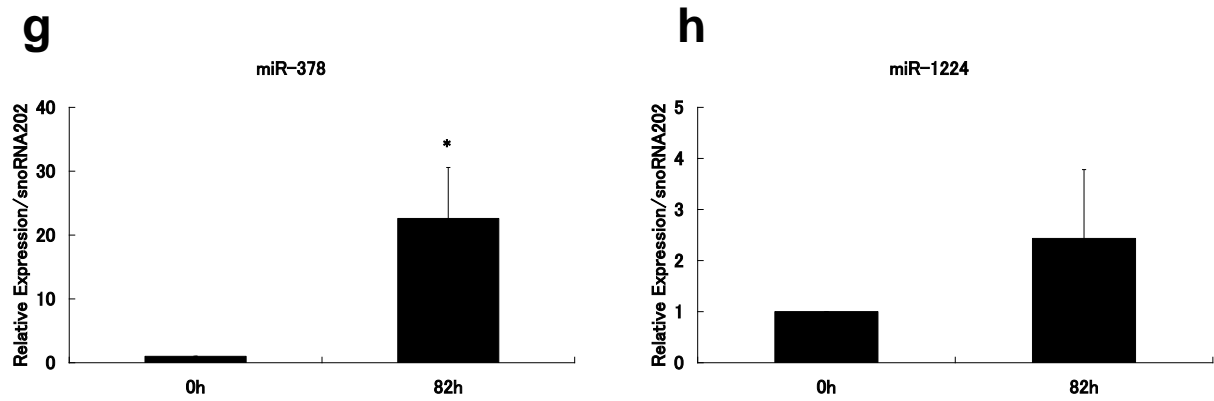
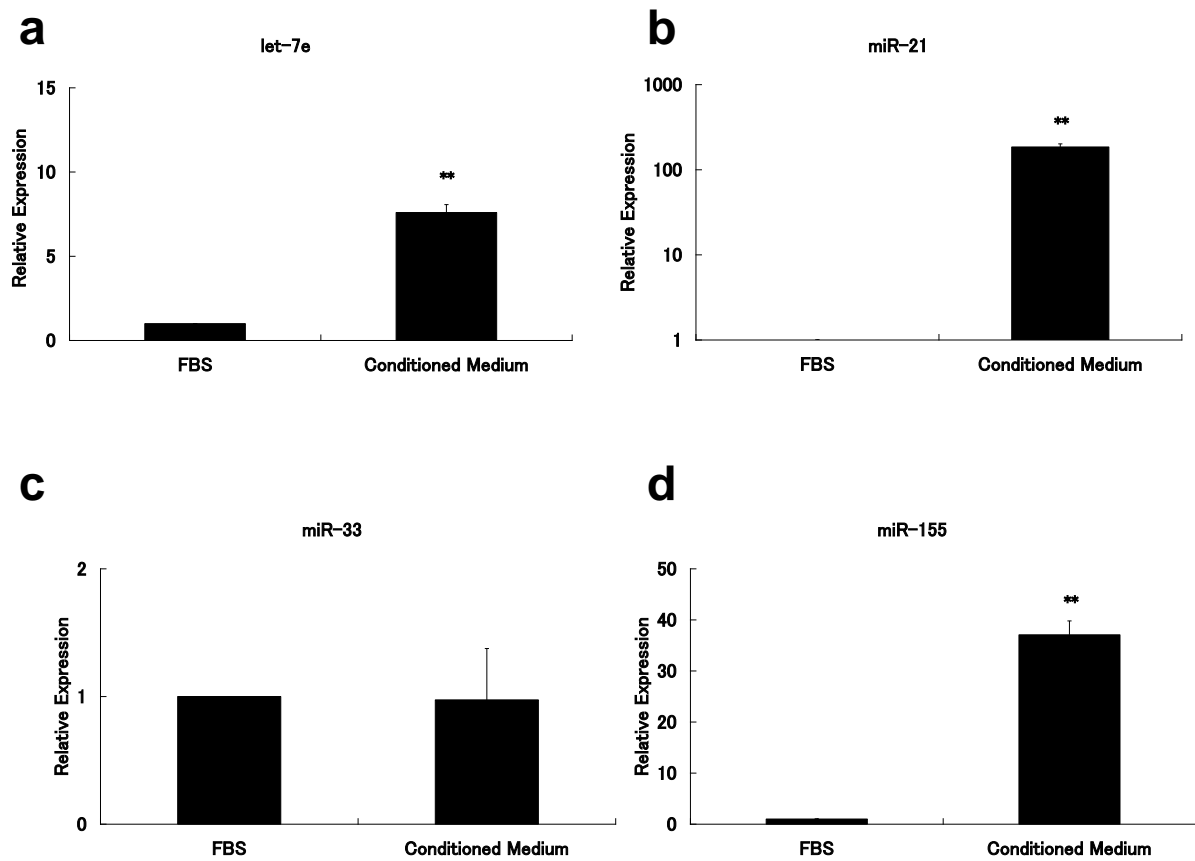


図1 破骨細胞分化過程における細胞内での microRNA 発現

0h : RANKL 刺激前のマクロファージ

82h : RANKL 刺激 82 時間後の破骨細胞

Kagiya *et al.* J Oral Tissue Engin 2013, 文献[5]より引用



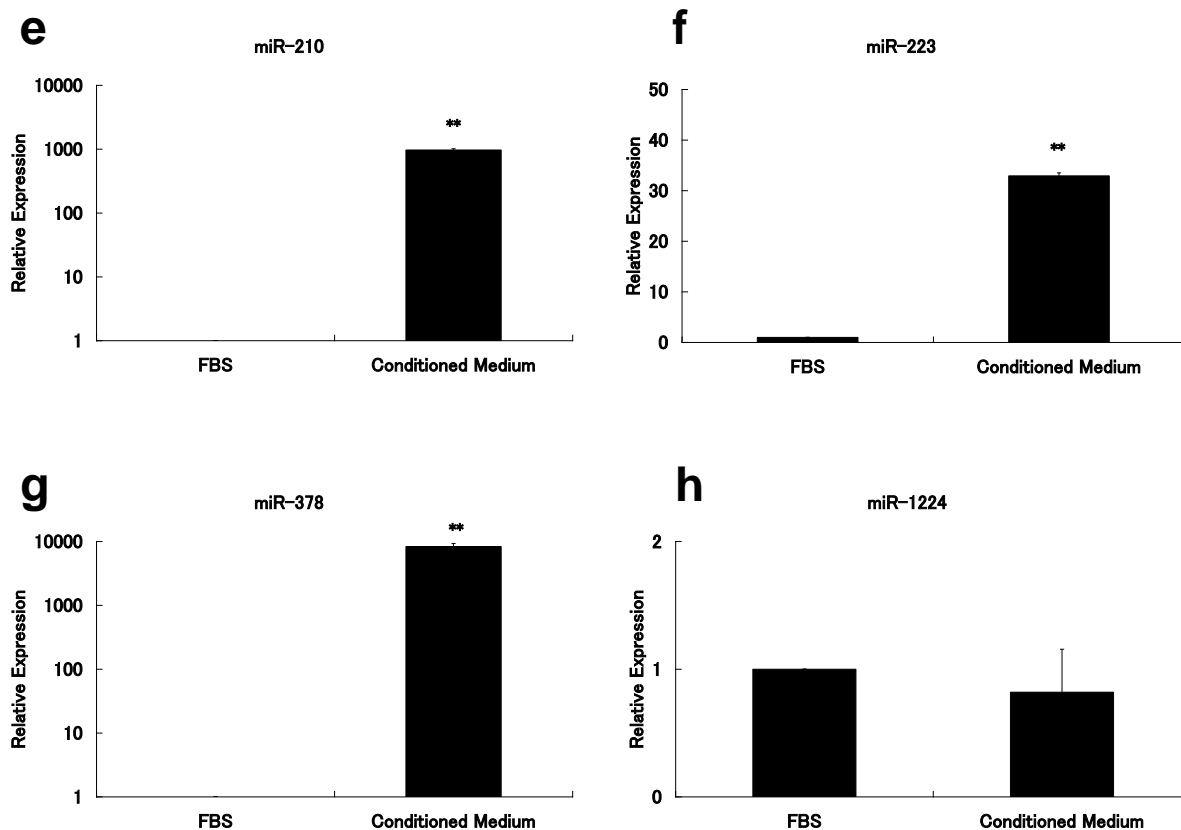


図2 破骨細胞における細胞外小胞での microRNA 発現

FBS：培養液 FBS 中での発現（バックグラウンド）

Conditioned Medium：破骨細胞培養液中へ分泌された細胞外小胞での発現

Kagiya *et al.* J Oral Tissue Engin 2013, 文献[5]より引用

図1は破骨細胞分化過程における細胞内での microRNA 発現を示す。miR-155 と miR-223 は破骨細胞分化に伴って減少したが、let-7e, miR-33, miR-210, miR-378, miR-1224 は増加した。また、miR-21 の発現は有意な変化を認めなかった。

一方、細胞外小胞での発現は、miR-378 が最も強く、miR-210 と miR-21 がこれに続いていた。miR-33 と miR-1224 では、有意な発現を認めなかった（図2）。

以上より、破骨細胞は microRNA を含む細胞外小胞を分泌するが、細胞内で発現している全ての microRNA が、細胞外小胞内に存在するとは限らないことが示された。

4. 破骨細胞における RNA 結合タンパク質について

著者は、これまである細胞に発現していると考えられていた RNA 結合タンパク質、X と Y が破骨細胞においても発現していることを発見した。X には、破骨細胞が骨吸収をする

際に分泌する酵素の mRNA が、多量に結合していた。X をノックダウンすると、破骨細胞形成が促進された。また、Y と結合している mRNA を免疫沈降して、マイクロアレイ法で網羅的解析した。Y は破骨細胞分化に重要な分子と結合していた。

5. まとめ

今回得られた成果から、本研究は新たな研究分野を開拓し、基礎となる考え方を確立することが期待される。医学研究は、ヒトを対象とする性格上、治療薬等の開発において、より慎重な対応が求められる。従って、研究開始から実用化までには、10 年以上の期間が必要となることも珍しくない。本研究成果は、基礎研究の段階であるが、将来的には、企業と連携し、成果の産業化に取り組みたいと考えている。

謝辞

本研究の一部は、公益財団法人インテリジェント・コスモス学術振興財団による「インテリジェント・コスモス奨励賞」および「実用化研究助成」によって行われた。ここに感謝の意を表す。

参考文献

- [1] Kagiya T, Nakamura S. Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation. *J Periodontal Res* 2013; 48: 373-385.
- [2] Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654-659.
- [3] Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 17442-17452.
- [4] Kagiya T, Taira M. A New Application for Microarrays: Analysis of Global MicroRNA Expression Profiles in the Extracellular Microvesicles of Human Macrophage-like Cells. In: Rogers JV, editor. *Microarrays: Principles, Applications and Technologies*. New York: Nova Science Publishers, 2014; 69-80.
- [5] Kagiya T, Taira M. Expression of MicroRNAs in the Extracellular Microvesicles of Murine Osteoclasts. *J Oral Tissue Engin* 2013; 10: 142-150.