

## 111. microRNA による骨芽細胞分化制御機構とその機能

伊藤 智広

Key words : 骨芽細胞, 分化, microRNA

近畿大学 農学部 水産学科  
水産利用学研究室

### 緒 言

近年, microRNA (以下 miRNA) や siRNA などの短い RNA が発生・分化やクロマチンのメチル化, 発ガンなど, 様々な生理現象に関与することが明らかになり, その報告数は年々増加している。我々もこれまでに, マウス頭蓋骨由来前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞に強力な骨分化誘導因子である bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) を用いて骨分化を惹起させると, BMP-2 刺激前と比較して 9 種類の miRNA が有意に発現変化することを示した。このうち, 変動した miRNA-141 及び miRNA-200a が, BMP-2 誘導による runt-related transcription factor 2 (Runx2) 発現や転写活性の調節, 骨基質タンパクの osterix 発現に関与している転写因子 Distal-less homeobox 5 (Dlx5) を, miRNA-208 が osteocalcin, parathyroid hormone-related protein-C (PTHrP), collagen I, Runx2 の発現を制御している転写因子 v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (Ets1) をそれぞれ標的としていることを明らかにした<sup>2,3)</sup>。本研究では, 骨芽細胞分化関連 miRNAs の一つとして同定した miR-294 の標的遺伝子を探索している中, この miRNA-294 を前駆骨芽細胞に導入するだけで (BMP-2 刺激無し) 骨芽細胞の分化が誘導されるという非常に特異な機能を発見した。BMP-2 のような強力な骨分化誘導因子は, 強い骨誘導作用がある一方, 筋肉等の軟部組織をも骨化させてしまうことから, 医薬品として用いることが非常に難しい。miRNA-294 の骨芽細胞分化機構を示すことができれば, 非コード RNA マシナリーを活かした新しい RNA 創薬開発につながると考えた。

### 方法、結果および考察

はじめに, マウス頭蓋骨由来前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞にリポフェクション法により precursor-miRNA294 (Life Technologies 社製: P/N AM17111) を導入した (処理濃度 40 nM)。処理後 24 時間に細胞を回収し, Trizol にて全 RNA を抽出した。比較対照として無処理の MC3T3-E1 細胞からも全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA は Agilent 2100 bioanalyzer により品質を確認後, 東レ株式会社 3D-Gene<sup>®</sup>アレイ (組織・細胞 mRNA 解析) に供した。アレイ解析の結果, 無処理の細胞と比較して logFC (FC: fold-change) が 2 以上または -2 以下に変化した遺伝子について *in silico* 解析を行った (表 1)。 *in silico* 解析の結果, 骨芽細胞分化に関連する分子 eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eEF1A1), ribosomal protein L41 (Rpl41), および dentin matrix 1 (Dmp1) に着目し, それぞれについて作業仮説を立て検討を行った。

表 1. マウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞に miRNA-294 を導入することにより発現変動した遺伝子群

LogFC	Gene
3.0 < LogFC	<i>Mrpplf3, Mrpplf4, Gsta1, Gsta2</i>
2.0 < LogFC < 3.0	<i>Dmp1, Cxcl12, Aldh3a1, Ppfibp, 2 Slc7a11, Klk8, Gpnmb, Gng13, Ttll11</i>
LogFC < -2.0	<i>Bdkrb1, Eef1a1, Psmb8, Mxd3, Rpl41, Rps2</i>

miRNA-294 を導入した 24 時間後のマウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞から全 RNA を抽出後、東レ(株) 3D-Gene® mRNA Oligo chip に供した。

【仮説 1】 miRNA-294 処理骨芽細胞分化における eEF1A1 の役割

マウス由来骨芽細胞の単一培養系には nitric oxide synthase (NOS) のうち endothelial NOS (eNOS) が存在し、非炎症条件下で eNOS が働くことで一酸化窒素 (Nitric acid, NO) が産生される<sup>4)</sup>。この NO は骨芽細胞を分化促進し、分化マーカーである alkaline phosphatase (ALP) の活性と osteocalcin (OCN) の発現を上昇させる。しかし、eEF1A1 は、この骨芽細胞分化を促進させる NO の産生に関わる eNOS の 3'-非翻訳領域に結合することで eNOS の発現を抑制するため、miRNA-294 処理細胞における eEF1A1 の発現低下が、NO の産生深く関与しているのではないかと推察した。そこで、miRNA-294 を導入した MC3T3-E1 細胞における経時的な NO の産生量を Griess 試薬 (Promega, code#G2930) により生成するアゾ化合物の吸光度を測定することで評価した。その結果、miRNA-294 導入した骨芽細胞の培地中の NO 濃度は、未導入細胞のものと全く変化しておらず、miRNA-294 導入することによる NO 産生は誘導されていなかった (図 1)。また、eNOS のタンパク発現をウエスタンブロット法により検討したが、miRNA-294 導入による発 eNOS タンパク発現は認められなかった。これら結果から、miRNA-294 導入による eEF1A1 の遺伝子発現低下が骨芽細胞分化に影響を与えないと判断し、この仮説を棄却した。

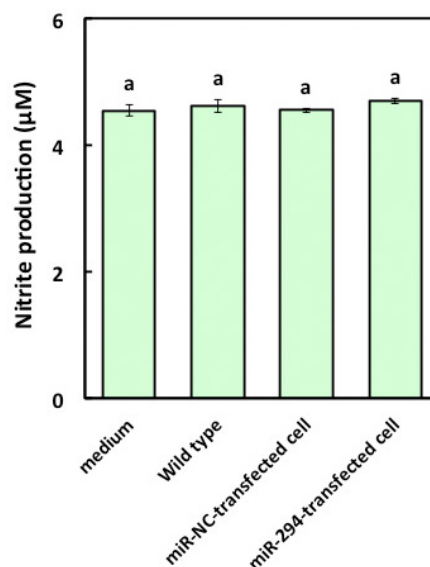


図 1. miRNA-294 導入による MC3T3-E1 細胞における細胞内一酸化窒素濃度の変化。

マウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞に miRNA-294 を導入した 24 時間後の細胞培養液中の一酸化窒素濃度を Griess 試薬により測定した。測定値は、平均 ± 標準誤差で示した。多群間の比較は、一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法により検定を行った ( $p < 0.05$ )。

### 【仮説 2】 miRNA-294 処理骨芽細胞における Rpl41 の役割

ガン細胞は様々なストレスを受容した際、そのストレスを回避し、生存するための重要な転写因子 activating transcription factor 4 (ATF4) を発現上昇させる。25 のアミノ酸から構成される小さいペプチドである Rpl41 (3,456 kDa) は、この ATF4 をリン酸化し、素早くプロテアソームによる分解を行うことでガン細胞の生存を妨げると報告されている<sup>5)</sup>。骨芽細胞分化過程において ATF4 は、 $\beta$ -catenin や discoidin domain receptor-2, OCN の発現を調節する重要な分子である。Wang らの研究では、miRNA-214 が ATF4 の 3'-非翻訳領域に結合することで ATF4 の発現を抑制すると骨密度が低下すると報告している<sup>6)</sup>。したがって、miRNA-294 の導入によりこの Rpl41 の発現低下が、ATF4 を高めるように機能しているのではないかと推測した。miRNA-294 を導入した MC3T3-E1 細胞と未導入細胞における *Rpl41* 遺伝子の発現と *ATF4* の細胞内発現レベルについて Real time-PCR 法にて検討した。ATF4 についてはタンパク発現レベルについても western blot 法にて確認した（※マウス Rpl41 抗体については市販されておらず、自作する必要があったため、本研究では Rpl41 のタンパク発現については確認していない）。その結果、miRNA-294 導入により *Rpl41* 遺伝子はおよそ 0.44 倍、*ATF4* 遺伝子についてはおよそ 1.4 倍に変化した（図 2 上）。ATF4 のタンパク発現レベルについてもわずか（1.21 倍）ではあるが変化した（図 2 下）。これら結果から、miRNA-294 導入による *Rpl41* の遺伝子発現低下が骨芽細胞分化に関与していることが分かった。

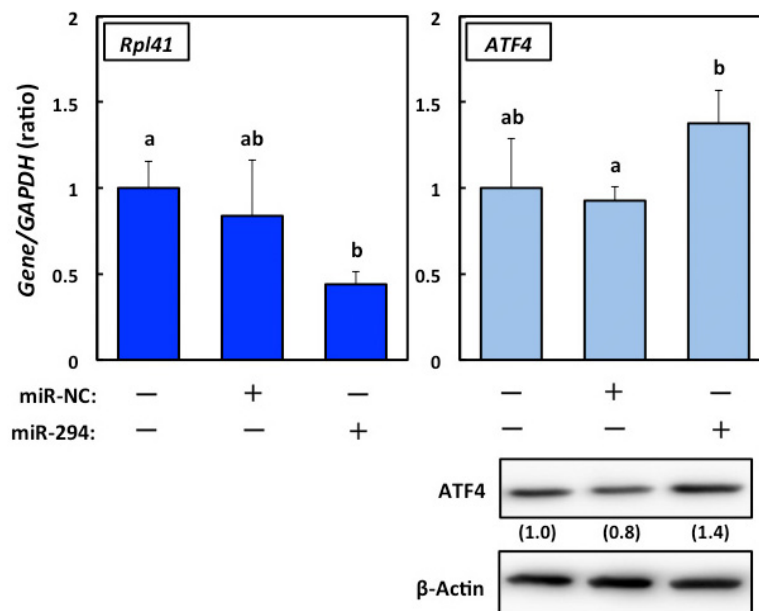


図 2. miRNA-294 導入による MC3T3-E1 細胞における *Rpl41* および *ATF4* 遺伝子の発現変化。

miRNA-294 導入処理後 24 時間経過した MC3T3-E1 細胞を回収し、全 RNA を抽出した。cDNA へ逆転写後、定量的 Real time-PCR にてそれぞれの遺伝子発現変化を解析した。同時にタンパク発現解析用に、miRNA-294 導入処理後 24 時間経過した MC3T3-E1 細胞を RIPA 緩衝液にて溶解後、ウエスタンブロット法に供した (25  $\mu$ g protein /Lane)。グラフ下段のプロット像は、miRNA-294 導入処理による ATF4 タンパク発現変化を示している。測定値は、平均 $\pm$ 標準誤差で示した。多群間の比較は、一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法により検定を行った ( $p < 0.05$ )。

### 【仮説 3】 miRNA-294 処理骨芽細胞における Dmp1 の役割

骨細胞に高く発現している骨の非コラーゲン性酸性リンタンパク質である Dmp1 は骨芽細胞の分化を促進させることが知られている<sup>7)</sup>。Runx2 によって初期の分化ステージに移行した骨芽細胞では DMP1 は核内に存在し、骨形成に重要な遺伝子の発現調節をする。また、石灰化のシグナルを活性化させた骨芽細胞では、Dmp1 のリン酸化が進み、成熟した Dmp1 を細胞外へ放出することで石灰化を開始する。したがって、miRNA-294 を導入した MC3T3-E1 細胞において、*Dmp1* 遺伝子の発現が無処理の細胞に比べ LogFC 2.01 と高発現したことは Dmp1 を介した骨芽細胞分化を誘導したことを意味することから、これらの分子について詳細に検討した。まず、アレイ結果と相関するか確認するために miRNA-294 を導入した MC3T3-E1 細胞と未導入細胞における *Dmp1* 遺伝子と Dmp1 タンパクの発現を Real time-

PCR 法および western blot 法によりそれぞれ検討した。その結果、miRNA-294 導入により *Dmp1* 遺伝子はおよそ 1.82 倍に変化し (図 3A, 上), タンパク発現量も 1.63 倍増加した (図 3A, 下)。次に、*Dmp1* により骨芽細胞を刺激すると mitogen-activated protein kinases (MAPKs: extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), p38 MAPK (p38), stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (JNK)) を活性化することから、これらシグナル分子の活性化について検討した。その結果、ERK1/2 および p38 は導入 15 分後から、JNK は導入 30 分後から活性化し、導入後 3 時間後には活性はいずれも低下した (図 3B)。これら結果から、miRNA-294 導入直後に MAPKs の活性化が骨芽細胞の分化および *Dmp1* 遺伝子の発現に深く関与していることが推察された。現在、これら MAPKs を各種阻害剤により不活化することで miRNA-294 導入による骨芽細胞分化や *Dmp1* 遺伝子の発現がどのように変化するか確認している。

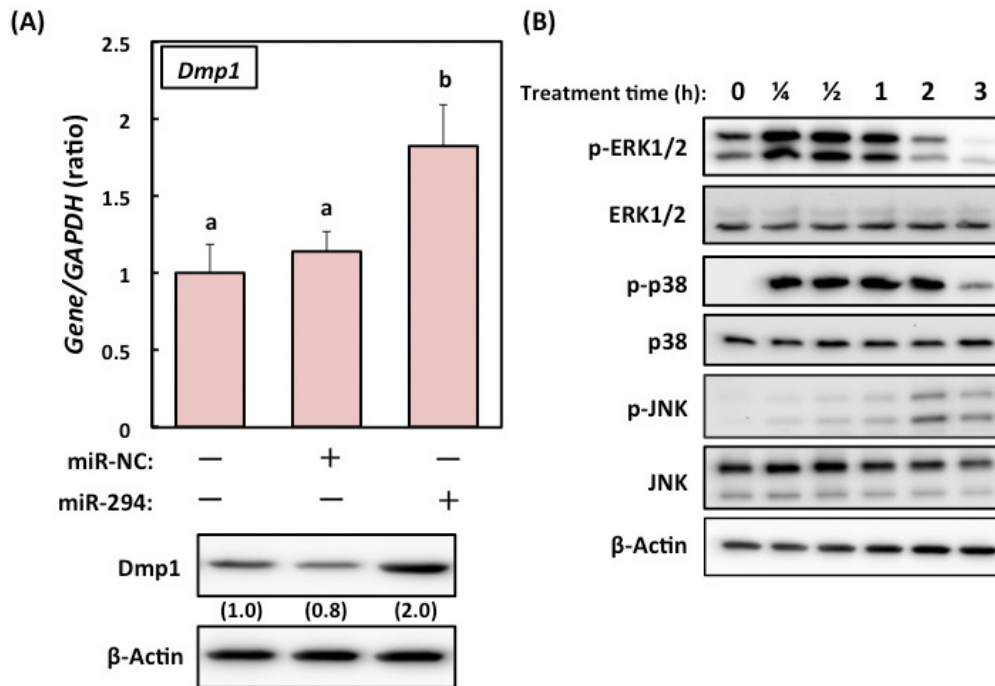


図 3. miRNA-294 導入 MC3T3-E1 細胞における *Dmp1* 遺伝子と MAPKs の変化.

(A) miRNA-294 導入による MC3T3-E1 細胞における *Dmp1* 遺伝子および *Dmp1* タンパク発現変化。グラフ下段のプロット像は、miRNA-294 導入処理による *Dmp1* タンパク発現変化を示している。miRNA-294 導入処理後 24 時間経過した MC3T3-E1 細胞を回収し、全 RNA を抽出した。cDNA へ逆転写後、定量的 Real time-PCR にて *Dmp1* 遺伝子発現変化を解析した。同時に *Dmp1* タンパク発現解析用に、miR-294 導入処理後 24 時間経過した MC3T3-E1 細胞を RIPA 緩衝液にて溶解後、ウエスタンブロット法に供した (25  $\mu$ g protein/Lane)。測定値は、平均  $\pm$  標準誤差で示した。多群間の比較は、一元配置分散分析後、Tukey-Kramer 法により検定を行った ( $p < 0.05$ )。 (B) miRNA-294 導入初期における MAPKs (ERK1/2, p38, JNK) の活性化。MC3T3-E1 細胞に miRNA-294 を導入し、各時間経過後の細胞を回収後、RIPA 緩衝液にて溶解した。MAPKs の活性化状況を検討するために、各種リン酸化抗体を用いてウエスタンブロット法に供した (10  $\mu$ g protein /Lane)。

以上の作業仮説実験の結果をまとめると、miRNA-294 導入直後に MAPKs の活性化が起き、24 時間後の *Rpl41* の遺伝子発現低下および *Dmp1* の遺伝子発現上昇を生じることで骨芽細胞の分化が誘導されたという機構が推察された。骨芽細胞は物理的的刺激を感受すると、インテグリンシグナルを介した MAPKs が活性化し、分化の方向に動き出す<sup>8)</sup>。したがって、miRNA-294 導入直後からの MAPKs の活性化により分化シグナルのスイッチが「ON」になったことは、非常に重要な点である。しかし、なぜ (何が) MAPKs が活性化したのか (MAPKs を活性化させているのか) の原因については、本研究では明確にすることはできていない。また、*Rpl41* の発現低下により ATF4 の発現量が miRNA-294 細胞で若干高まっていたことから、*Rpl41* による ATF4 の分解が阻害されたのではないだろうかと推察できた。しかし、この事象により誘導される骨基質タンパクの OCN 発現や ribosomal S6 kinase 2 を介した I 型コラーゲンの原料となるアミノ酸 (チロシン, プロリン, グリシン) 取り込みの促進についても明らかにできていない<sup>9)</sup>。 *Dmp1* の発現

上昇についても同様に、Dmp1 を介したカルシウムシグナルの活性化が Runx2 とや OCN の発現が高め、分化促進に作用することが報告されているが<sup>10)</sup>、細胞内カルシウム濃度変化など検討できていない。したがって、本研究課題で明らかにすることができた事象（点）を線で結びつけることができるのか、さらに検討が必要である（図4）。

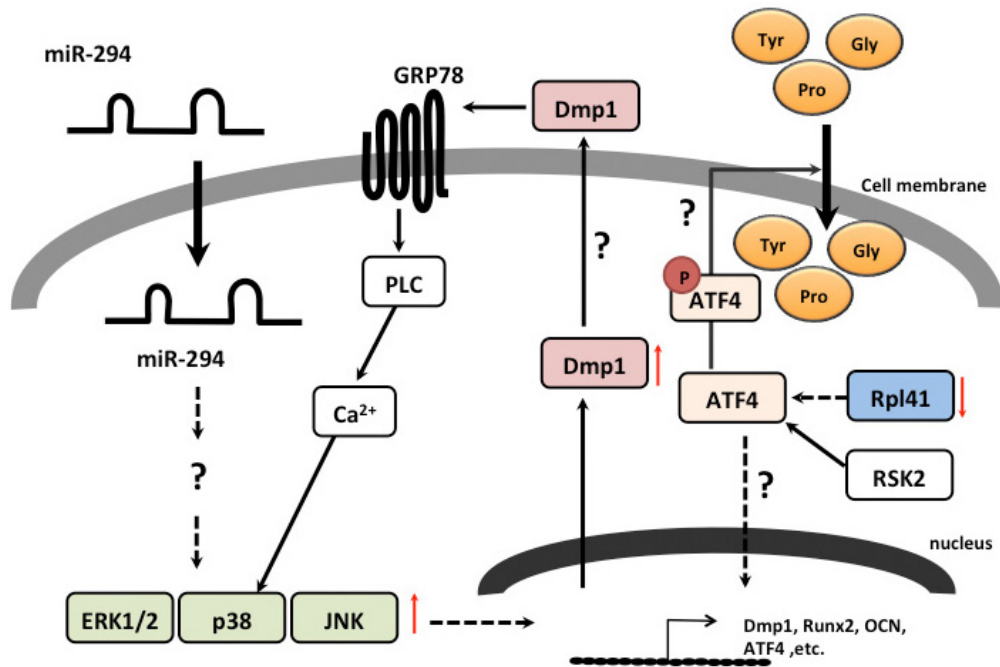


図4. 本研究課題より推察された miRNA-294 導入マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞分化メカニズム. miRNA-294 を細胞内に導入すると、導入初期に MAPKs (ERK1/2, p38, JNK) が活性化し、分化シグナルを活性化する。その結果、*Dmp1*, *Runx2*, *OCN* などの遺伝子発現が上昇し、骨芽細胞分化を誘導する。*Rpl41* 遺伝子についても発現が下方制御されることで ATF4 の機能が活性化されることが推察された。実線矢印は、これまでの報告で示されたシグナルの流れを示している。点線矢印は、さらに検討が必要な部分を示している。

また、本研究では miRNA-294 を骨芽細胞に導入をしているため、導入した miRNA-294 precursor が標的遺伝子の 3'-非翻訳領域に結合し、そのタンパク発現が低下しなければならない。本研究の cDNA アレイ解析結果で得られた LogFC-2 以下に発現が変化した遺伝子群と TargetScan6.2 および miRanda による miR-294 の標的遺伝子の *in silico* 解析とを用いて解析したところ、肥満制御遺伝子として知られる *MAX dimerization protein 3 (Mxd3)* が候補として挙げられた（図5）。現在、この *Mxd3* の骨芽細胞分化への影響についてさらに検討を進めている。

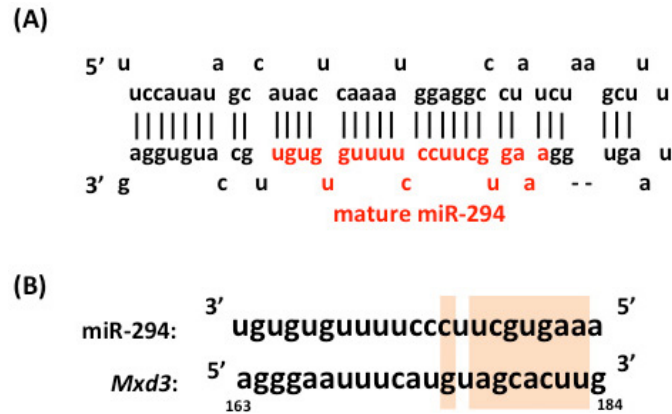


図5. miRNA-294 導入 MC3T3-E1 細胞における変動遺伝子群から推察された標的遺伝子。

(A) miRNA-294 のシーケンス. (B) *in silico* 解析から推察された候補表的遺伝子 *Mxd3* の 3'-非翻訳領域における miRNA-294 の結合サイト.

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科教授赤尾幸博である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

### 文 献

- 1) He, L. & Hannon, G. J. : MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.*, **5** : 522-531, 2004.
- 2) Itoh, T., Nozawa, Y. & Akao, Y. : MicroRNA-141 and -200a are involved in bone morphogenetic protein-2-induced mouse pre-osteoblast differentiation by targeting distal-less homeobox 5. *J. Biol. Chem.*, **284** : 19272-19279, 2009.
- 3) Itoh, T., Takeda, S. & Akao, Y. : MicroRNA-208 modulates BMP-2-stimulated mouse preosteoblast differentiation by directly targeting V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1. *J. Biol. Chem.*, **285** : 27745-27752, 2010.
- 4) Yan, G., You, B., Chen, S. P., Liao, J. K. & Sun, J. : Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1. *Circ. Res.*, **103** : 591-597, 2008.
- 5) Wang, A., Xu, S., Zhang, X., He, J., Yan, D., Yang, Z. & Xiao, S. : Ribosomal protein RPL41 induces rapid degradation of ATF4, a transcription factor critical for tumour cell survival in stress. *J. Pathol.*, **225** : 285-292, 2011.
- 6) Wang, X., Guo, B., Li, Q., Peng, J., Yang, Z., Wang, A., Li, D., Hou, Z., Kan, G., Cao, H., Wu, H., Song, J., Pan, X., Sun, Q., Ling, S., Li, Y., Zhu, M., Zhang, P., Peng, S., Xie, X., Tang, T., Hong, A., Bian, Z., Bai, Y., Lu, A., Li, Y., He, F., Zhang, G. & Li, Y. : miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation. *Nat. Med.*, **19** : 93-100, 2013.
- 7) Wu, H., Teng, P. N., Jayaraman, T., Onishi, S., Li, J., Bannon, L., Huang, H., Close, J. & Sfeir C. Dentin matrix protein 1 (DMP1) signals via cell surface integrin. *J. Biol. Chem.*, **286** : 29462-29469, 2011.
- 8) Eapen, A., Ramchandran, A., Pratap, J. & George A. : Activation of the ERK1/2 mitogen-activated protein kinase cascade by dentin matrix protein 1 promotes osteoblast differentiation. *Cells Tissues Organs*, **194** : 255-260, 2011.
- 9) Yang, X., Matsuda, K., Bialek, P., Jacquot, S., Masuola, H. C., Schinke, T., LI, L., Brancorsini, S., Sassone-Corsi, P., Townes, T. M., Hanauer, A. & Karsenty G. : ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome. *Cell*, **117** : 387-398, 2004.
- 10) Eapen, A., Sundivakkam, P., Song, Y., Ravindran, S., Ramchandran, A., Tirupathi, C. & George A. : Calcium-mediated stress kinase activation by DMP1 promotes osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.*, **285** : 36339-36351, 2010.