

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：臓器連関の視点から俯瞰した閉経後骨粗鬆症の病態解明と新規骨代謝マーカーの同定—臓器連関のメディエーターとしての分泌型 miRNA の意義—

2. 研究開発代表者： 竹田 秀（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野）

3. 研究開発の成果

これまでに申請者らは交感神経系、感覚神経系及び神経ペプチドが骨代謝に関わることを世界で初めて見出し、骨が骨以外の臓器により代謝調節を受けるという新規パラダイム「神経と骨のネットワーク」を提唱してきた。一方、近年、蛋白質をコードしないマイクロ RNA (miRNA) が様々な生命現象に関連することが示され、申請者らも筋骨格系における miRNA の意義を報告してきた。

従来、miRNA は細胞内で機能するとされてきたが、近年 miRNA がエクソソームに含有され、細胞外へ放出されることが示された。このことは、miRNA が新たな臓器連関メディエーターとして全身の機能調節をしている可能性を示唆するものである。

本研究では、閉経後骨粗鬆症をエストロゲン低下に伴う骨局所の疾患という概念から解き放ち、女性ホルモンの変化に伴う全身的な代謝変化の結果として発症した全身疾患として捉えなおす。なかでも分泌型 miRNA に着目し、エストロゲンによる miRNA の発現変動解析を通じて、閉経に伴う全身的代謝変化において miRNA が果たす役割を解明し、従来の骨代謝マーカーとは一線を画した骨粗鬆症発症予測マーカーとしての miRNA の意義を探索する。さらに、骨芽細胞、破骨細胞が分泌型 miRNA を用いて骨代謝を調節する可能性、すなわち、骨代謝のカップリング因子としての miRNA の意義を解明することを目的とする。

本年度（2015 年度）はまず、女性ホルモン欠乏性骨粗鬆症モデル動物である、卵巣摘出マウスを用いて、卵巣摘出後に血中で変動する miRNA の同定を試みた。

卵巣摘出前、卵巣摘出後 3、7、14 日目に血液を採取後、血清より miRNA を含む RNA を抽出し、マイクロアレイによる網羅的 miRNA 発現解析を実施した。統計学的解析により、術後 14 日目において、約 350 種類の miRNA が術前と比較して有意に変動していることが明らかとなった。これらの miRNA のうち、女性ホルモン欠乏状態に反応するマーカーの探索・同定を目的として、術後早期（術後 3 日目）に変動が大きな miRNA を 60 種類同定した。現在 real time PCR による発現解析を行い、エストロゲン欠乏に反応する真のターゲット miRNA の同定を実施中である。今後これらの同定された miRNA の骨芽細胞および破骨細胞に対する影響ならびに全身の代謝に及ぼす影響を検討する予定である。

また、本年度、骨組織における新規カップリング因子の同定を目的として、骨芽細胞、破骨細胞、そして骨細胞、各細胞における miRNA の網羅的発現解析を実施した。骨芽細胞および骨細胞の単離には、各細胞を蛍光タンパク質でラベルしたマウスの骨組織から FACS を用いて、蛍光タンパク陽性細胞を単離し、それぞれ RNA を抽出した。破骨細胞に関しては、破骨細胞培養系を用いて RNA を抽出した。これらの RNA を用いて次世代シーケンサーならびにマイクロアレイにより網羅的 miRNA 発現解析を実施し、各細胞特異的に発現している miRNA を同定した。今後これら miRNA のカップリング因子としての機能を解析する予定である。