

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 女性の健康の包括的支援実用化研究事業  
(英語) Project for Whole Implementation to Support and Ensure the Female Life - WISE
- 研究開発課題名： (日本語) 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—  
(英語) Elucidation of the pathology of postmenopausal osteoporosis and identification of novel bone metabolism markers through organ networks -Significance of secreted miRNA as a mediator of organ networks-
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野 講師 佐藤 信吾
- 所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Medical and Dental University, Graduate School, Dept. of Physiology and Cell Biology, Lecturer, Shingo Sato
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究開発課題名： (日本語) 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—  
(英語) Elucidation of the pathology of postmenopausal osteoporosis and identification of novel bone metabolism markers through organ networks -Significance of secreted miRNA as a mediator of organ networks-
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科細胞生理学分野 助教 越智広樹
- 所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Medical and Dental University, Graduate School, Dept. of Physiology and Cell Biology, Assistant Professor, Hiroki Ochi

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

### 和文

本研究では、従来骨局所での疾患として捉えられてきた閉経後骨粗鬆症を、女性ホルモンの低下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、臓器連関の視点から閉経後骨粗鬆症の病態解明へと取り組む。中でも、新たな臓器連関メディエーターとして分泌型 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、骨細胞および破骨細胞に由来する分泌型 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。

### ① 骨粗鬆症における分泌型 miRNA の病態生理的意義の解明および分泌型 miRNA の骨粗鬆症マーカーとしての有用性の解析

昨年度、マウス卵巣摘出後における血中 miRNA の網羅的発現解析において、卵巣摘出後早期（術後 3 日目）に血中での変動が大きな miRNA を 60 種類同定した。本年度はまず、エストロゲン欠乏に反応する真のターゲット miRNA を同定するために、これらの miRNA の発現を real time PCR を用いた発現解析を行い、定量的に解析した。さらに定量的発現解析の結果を基に、統計学的解析を用いて、エストロゲン欠乏に鋭敏に反応する miRNA の同定を行った。加えて、これら同定された 60 種類が血中エストロゲン濃度に依存して変化することを確認するために、卵巣摘出術を施したマウスに対して、エストロゲンの補充を行い、miRNA の発現変動を解析中である。さらに real time PCR において有意に発現が変動した miRNA の骨芽細胞、破骨細胞に対する効果を in vitro および in vivo において検討中である。

### ② カップリング因子としての miRNA 解析

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、骨芽細胞および骨細胞から抽出した 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解析を行った。網羅的 miRNA 発現解析の結果、各細胞特異的に発現している miRNA を同定した。骨細胞もしくは骨芽細胞に由来する miRNA を用い、骨芽細胞分化および骨細胞分化に及ぼす影響を検討した結果、骨芽細胞由来 miRNA は骨細胞分化を抑制し、一方で骨細胞由来 miRNA は骨芽細胞分化を抑制することが明らかとなった。このことは、骨芽細胞および骨細胞は、miRNA を介して互いの分化を調節し合っていることを示しており、骨形成を担う細胞間の新たなカップリング機構の存在を示唆するものであると考えられる。現在、これらの miRNA の標的遺伝子を明らかにするとともに、作用機序の詳細を解析中である。

### 英文

Postmenopausal osteoporosis has been considered as a bone disorder caused directly by estrogen deficiency. However, we recognize osteoporosis as a part of systemic metabolic disorder induced by estrogen deficiency. We are now trying to clarify the pathology of postmenopausal osteoporosis through organ networks, especially, focusing on secreted-miRNAs as an inter-organ or intercellular mediator. The purpose of this study is to assess the significance of secreted-

miRNA in the pathology of osteoporosis and to identify specific secreted-miRNAs as a novel marker that predicts osteoporosis. Moreover, we also plan to demonstrate the role of miRNA as a coupling factor in bone remodeling.

#### 1. Elucidating the role of secreted-miRNA in the pathology of osteoporosis and Identifying specific secreted-miRNAs as a predictive marker for osteoporosis.

We examined the expression profile of miRNAs in mouse serum by miRNA microarray and identified 60 miRNAs which were significantly altered at 3 days after ovariectomy. Furthermore, we performed a quantitative analysis of 60 miRNAs by real-time PCR to identify responsible miRNAs that have a sensitive reaction to estrogen deficiency. We also investigated the effect of estrogen administration on the expression of these miRNAs in mouse serum. We are now studying the effects of the identified miRNAs on osteoblast, osteocyte, or osteoclast differentiation *in vivo* and *in vitro*.

#### 2. Identifying miRNA as a coupling factor in bone remodeling

To identify a novel coupling factor in bone remodeling, we analyzed the comprehensive expression profile of miRNAs in osteoblast, osteocyte, and osteoclast to identify cell-specific miRNAs. We then examined the effect of osteoblast-specific or osteocyte-specific miRNAs on osteoblast or osteocyte differentiation *in vitro*. The *in vitro* experiments demonstrated that osteoblast-derived miRNAs inhibited osteocyte differentiation, and osteocyte-derived miRNAs impaired osteoblast differentiation. These findings suggest that osteoblasts and osteocytes regulate their differentiation each other through miRNAs secreted by the cells. We are now trying to identify the target genes of these osteoblast- or osteocyte-derived miRNAs and to elucidate the molecular mechanism of osteoblast or osteocyte differentiation regulated by miRNAs.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

### III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 7 件）

1. Yoshinori Asou, Munetaka Iwata, Hiroki Ochi, Maierhaba Ailixiding, Zulipiya Aibibula, Jinying Piao, Guangwen Jin, Yasushi Hara, Atsushi Okawa. Pleiotropic Functions of High Fat Diet in the Etiology of Osteoarthritis. PLoS ONE. 2016; 11(9); e0162794
2. Masanori Saito, Mieradili Mulati, S Zakiah A Talib, Philipp Kaldis, Shu Takeda, Atsushi Okawa, Hiroyuki Inose. The Indispensable Role of Cyclin-Dependent Kinase 1 in Skeletal Development. Sci Rep. 2016.02; 6; 20622

3. Yoichi Imai, Eri Ohta, Shu Takeda, Satoko Sunamura, Mariko Ishibashi, Hideto Tamura, Yan-Hua Wang, Atsuko Deguchi, Junji Tanaka, Yoshiro Maru, Toshiko Motoji. Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces calcineurin degradation in multiple myeloma. JCI Insight. 2016.04; 1(5); e85061
4. Shingo Sato, Tang YJ, Wei Q, Hirata M, Weng A, Han I, Okawa A, Takeda S, Whetstone H, Nadesan P, Kirsch DG, Wunder JS, Alman BA. Mesenchymal tumors can derive from Ng2/Cspg4-expressing pericytes with  $\beta$ -catenin modulating the neoplastic phenotype Cell Reports. 2016.07; 16(4); 917-927
5. Takashi Iezaki, Kakeru Ozaki, Kazuya Fukasawa, Makoto Inoue, Shigetaka Kitajima, Takeshi Muneta, Shu Takeda, Hiroyuki Fujita, Yuki Onishi, Tetsuhiro Horie, Yukio Yoneda, Takeshi Takarada, Eiichi Hinoi. ATF3 deficiency in chondrocytes alleviates osteoarthritis development. J. Pathol.. 2016.08; 239(4); 426- 437
6. Takeshi Takarada, Cheng Xu, Hiroki Ochi, Ryota Nakazato, Daisuke Yamada, Saki Nakamura, Ayumi Kodama, Shigeki Shimba, Michihiro Mieda, Kazuya Fukasawa, Kakeru Ozaki, Takashi Iezaki, Koichi Fu-jikawa, Yukio Yoneda, Rika Numano, Akiko Hida, Hajime Tei, Shu Takeda, Eiichi Hinoi. Bone Resorption Is Regulated by Circadian Clock in Osteoblasts. J. Bone Miner. Res.. 2017; 32(4); 872-881
7. Masahiro Niimura, Tsuyoshi Sato, Yuichiro Enoki, Masahiko Okubo, Shoichiro Kokabu, Shu Takeda, Tetsuya Yoda. Semaphorin 3A Promotes Dendrite Elongation of Osteocytes in Association with Down- regulation of CDK6. In Vivo. 30(3); 231-236
8. Sato S, Takeda S. The regulation of various organs by osteoblasts. Clin Calcium. 26(5), 721-727, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 竹田 秀. 骨粗鬆症治療薬の使い分け-病態に応じた最適治療を探る-. 第3回Geriatric Diseases Seminar 2016. 01. 28 神戸市立医療センター中央市民病院、神戸市
2. Yukihiro Tamura, Setsuko Mise, Yasutaka Sugamori, Md. Zahirul Haq Bhuyan, Mariko Takahashi, Tomoki Uehara, Yuki Arai, Michiyo Miyashin, Noriyuki Wakabayashi, Kazuhiro Aoki. A pharmaco- logical role of metallothionein in zinc-treated cartilage-progenitor cells. APFP 2016(The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologists Meeting) 2016. 02. 01 The Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok (Thailand)
3. 竹田 秀. 臓器ネットワークからみた骨粗鬆症の病態と治療. 第37 回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会2016. 02. 06 仙台サンプラザ、仙台市
4. 竹田 秀. 原発性、続発性骨粗鬆症の病態と治療-ステロイド性骨粗鬆症ガイドラインをふまえて-. 第18 回 多摩骨代謝研究会2016. 02. 13 吉祥寺東急REI ホテル
5. 竹田 秀. 骨粗鬆症の病態と治療-RANKL 阻害薬の位置付け-. 第31 回立川整形外科開業医会学術講演会 2016. 02. 16 パレスホテル立川、東京
6. 佐藤信吾. 骨軟部腫瘍の起源とこれから. 第242 回関東骨軟部腫瘍研究会2016. 03. 08 東京
7. 佐藤信吾. 血管周皮細胞 (ペリサイト) の生物学的特性と肉腫起源細胞の可能性. 第13 回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会2016. 04. 09 ホテルサンバレー富士見, 伊豆の国市

8. 竹田 秀. 骨粗鬆症. 第89 回日本整形外科学会学術総会2016.05.14 パシフィコ横浜、横浜市  
竹田 秀. 高齢者ネフローゼ症候群の病態－骨代謝に注目して－. 第59 回日本腎臓学会学術総会2016.06.17 パシフィコ横浜、横浜
9. 佐藤信吾, 平井高志, 請川大, 松本誠一, 竹田 秀, 大川淳. 医歯学融合集学的骨転移診療体制構築による緊急手術削減効果. 第49 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会2016.07.14 東京ドームホテル, 東京
10. 平川弘幸, 佐藤信吾, 越智広樹, 砂村聡子, 瀧永博之, 竹田 秀. 抗HIV 薬による骨折リスク上昇のメカニズムの解明. 第16 回東京骨関節フォーラム2016.07.30 東京医科歯科大学, 東京  
器官システム制御学講座
11. 橋本恭子, 越智広樹, 佐藤信吾, 加藤茂明, 竹田 秀. 脂肪組織特異的ビタミンD 受容体欠損マウスにおける代謝解析. 第2 回Neo Vitamin D Workshop 2016.08.26 TKP ガーデンシティ品川, 東京
12. 佐藤信吾. 骨軟部肉腫の起源と下垂体腫瘍の起源は同一か? . 骨・軟部腫瘍の基礎を語る会 2016 2016.10.13 福岡サンパレス, 福岡市
13. 佐藤信吾, Benjamin Alman, 竹田 秀, 大川淳. 骨軟部肉腫の起源と下垂体腫瘍の起源は同一か? . 第31 回日本整形外科学会基礎学術集会2016.10.13 福岡国際会議場, 福岡市
14. 橋本恭子, 砂村聡子, 越智広樹, 二口充, 竹田 秀, 佐藤信吾. がん細胞由来分泌型マイクロRNA が造骨型骨転移を惹起する. 第14 回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会2016.10.29 イイノホール&カンファレンスセンター, 東京
15. Shingo Sato, Yuning J. Tang, Qingxia Wei, Makoto Hirata, Ilkyu Han, Shu Takeda, David G. Kirsch, Jay S. Wunder, Benjamin A. Alman. Mesenchymal tumors can derive from NG2-expressing pericytes with beta-catenin modulating the neoplastic phenotype. Connective Tissue Oncology Society Meeting 2016 2016.11.11 Lisbon, Portugal
16. 佐藤信吾, 越智広樹, 竹田 秀. 臓器連関の視点から俯瞰した骨の老化の新たなメカニズム. 第39 回日本分子生物学会年会2016.12.02 パシフィコ横浜, 横浜市
17. 佐藤信吾, 越智広樹, 竹田 秀. 骨を基軸とする臓器間ネットワーク機構. 第20 回日本心血管内分泌代謝学会 2016.12.16 東京コンベンションホール, 東京
18. 佐藤信吾. 骨転移患者の骨折や麻痺を防ぐために整形外科医ができること. 第 45 回 Kyoto Orthopaedic Seminar. 2017.3.7. 京都大学芝蘭会館, 京都市

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 東京医科歯科大、がんの骨転移促す新物質、「造骨型」診断・治療に光, 2016 年08 月「造骨型」と呼ばれるタイプのがんの骨転移とマイクロRNA の関連について (日経産業新聞 平成28 年8月30 日8 面)
2. 佐藤信吾. -がん治療update- 整形外科「骨転移専門外来」をご活用ください! 第3回「がんを考える」市民公開講座. 2017.1.15. 東京医科歯科大学, 東京.

(4) 特許出願

該当なし