

Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation.

鍵谷, 忠慶

<https://hdl.handle.net/2324/1789443>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（歯学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）



氏 名 : 鍵谷 忠慶

論文名 : Expression profiling of microRNAs in RAW264.7 cells treated with a combination of tumor necrosis factor alpha and RANKL during osteoclast differentiation.
(Tumor necrosis factor alpha とRANKLをRAW264.7細胞へ作用させた破骨細胞分化過程におけるマイクロRNAの発現プロファイルについて)

区 分 : 乙

論文内容の要旨

硬組織は、口腔領域における主要な構成要素の1つである。その中でも骨組織は、支持組織としてだけでなく、カルシウムの貯蔵庫や造血の場としても重要である。その骨組織は、骨形成と骨吸収のバランスによって維持されている。つまり、厳格に制御された骨リモデリングによって骨量は維持されている。もし、そのバランスが崩壊すると、病的状態が引き起こされる。例えば、歯周病による歯槽骨の吸収は、骨形成よりも骨吸収の方にバランスが傾いたために引き起こされる疾患である。その骨吸収の役割を担う唯一の細胞は破骨細胞である。破骨細胞は、造血系幹細胞を起源とする単球/マクロファージ系に属する単核の preosteoclast が融合することで形成された細胞である。成熟した破骨細胞は、TRAP 陽性、大型かつ多核で骨吸収能を有している。

最近、microRNA (miRNA) と呼ばれる新しい RNA の存在が明らかとなった。miRNA は 22 塩基長程度の non-coding RNA で、主に mRNA の 3' UTR 領域に結合してタンパク質への翻訳を抑制することで、細胞の分化や増殖などの生命現象を調節している。また、細胞内のみならず細胞外小胞内にも存在するため、新しい細胞間情報伝達物質や疾患特異的マーカーの候補として注目されている。破骨細胞の分化では、miR-21, miR-155, および miR-223 の3つの miRNA が、分化に関与しているとされている。しかし、その分化過程における miRNA 発現プロファイルは、十分に解析されていない。そこで本研究では、RANKL と TNF- α を用いた 2 通りの方法で破骨細胞を分化させ、両方で共通に変動する miRNA を抽出し、分化に重要な miRNA を絞り込むことにした。

解析に先立って、TNF- α 単独で RAW264.7 細胞から破骨細胞を誘導できるか調べたところ、TNF- α 単独では、破骨細胞が形成されなかった。そこで、RAW264.7 細胞へ RANKL 単独で作用させる方法と、TNF- α と RANKL を組合せて作用させる方法 (TNF- α /RANKL) で破骨細胞を分化させた。まず、RAW264.7 細胞を用いて、TNF- α /RANKL で破骨細胞を誘導する系についてマイクロアレイ解析を行った。解析した 666 種類の miRNA のうち、2 倍以上変動した miRNA は 44 種類あった。このうち、miR-223 および miR-342-3p は時間依存的に減少し、miR-29b, miR-125a-3p, miR-378, miR-483, miR-680, および miR-721 は増加傾向を示した。また、miR-26a, miR-199a-3p, miR-210, miR-671-5p, miR-689, および miR-1224 は、TNF- α /RANKL 処理 24 時間後に一過性にその発現が減少したが、82 時間後には、増加に転じた。次に、マイクロアレイで得られた結果を代表的 miRNA について、qRT-PCR 法で検証した。miR-210, miR-378, および miR-1224 は TNF- α /RANKL 処理 82 時間後に有意な増加を示した。これに対して、miR-223 および miR-342-3p は、TNF- α /RANKL 処理によって時間依存的な減少を示した。miR-21 と miR-155 は、本マイクロアレイ解析で 2 倍以上の発現変動が認められなかったが、破骨細胞の分化に重要な働きをしているとされるため、これらの発現についても調べた。miR-155 については、TNF- α /RANKL 処理 12 時間後に一過性の有意な発現増加が認められた。miR-21 については、時間依存的に有意な増加を示した。また、これらの miRNA について、マウス初代骨髄細胞培養系でも同様な解析を行ったところ、miR-342-3p を除いて RAW264.7 細胞とほぼ同様な結果であった。

一方、RANKL 単独で破骨細胞を形成させた時の miRNA の変動もマイクロアレイで調べたところ、2 倍以上変動した miRNA は 52 種類であった。このうち、miR-23b, miR-146a, miR-146b, miR-223, および miR-342-3p は時間依存的に減少し、miR-125a-3p, miR-483, miR-680, miR-689, miR-714, および miR-721 は増加傾向を示した。また、miR-26a, miR-29b, miR-199a-3p, miR-210, miR-378, miR-671-5p, および miR-1224 は、RANKL 処理 24 時間後に一過性にその発現が減少したが、82 時間後には、増加に転じた。本培養系でも、マイクロアレイで得られた結果を qRT-PCR 法で検証した。miR-210 と miR-378 は RANKL 処理 82 時間後に有意な増加を示したが、miR-1224 では RANKL 処理によって増加傾向を示すものの、有意な増加には至らなかった。これに対して、miR-223 および miR-342-3p は、RANKL 処理によって時間依存的な減少を示した。miR-21 と miR-155 については、有意な発現変動は認められなかった。また、これらの miRNA について、マウス初代骨髄細胞培養系でも同様な解析を行ったところ、miR-342-3p を除いて RAW264.7 細胞とほぼ同様な結果であった。

いずれの誘導方法・培養系でも、miR-223 は破骨細胞の分化に伴ってその発現が減少した。また、破骨細胞の分化に伴って発現が増加した miRNA は多数あり、なかでも miR-378 は、顕著にその発現が増加した。以上のように、本研究により破骨細胞の分化には、多数の miRNA が関与している可能性が示唆された。