

## 論文要旨等報告書

氏	大河原 敏博
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 8 2 5 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	マイクロRNAによるCcn2遺伝子を介した軟骨細胞分化の制御機構の解明

論文審査委員 教授 山本 敏男 准教授 上岡 寛 教授 滝川 正春

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

CCN2/CTGF は哺乳動物では6つのメンバーからなる CCN ファミリータンパク質の古典的構成員である。この CCN2 は内軟骨性骨形成における中心的役割を担っており、その遺伝子発現は長管骨の正常な成長過程での転写および、転写後の両段階において厳密な制御下にある。過去数年の間に、*Ccn2* 遺伝子の 3'-UTR を通じての転写後調節機構については研究が進み、特にシスエレメントや、それらに特異的に結合するタンパク質の相互作用による新規の転写後調節機構が解明されてきた。また最近、この 3'-UTR を介して遺伝子発現抑制を司る因子として、非コード RNA(ncRNA)がかかわっていることが明らかになりつつある。それらの ncRNA の一種である、マイクロ RNA(miRNA)は、近年生理的および病理的観点から最も注目されてきている。

miRNA は成熟状態で 20 から 22 塩基長のタンパク質情報を持たない RNA である。この特異な RNA は、標的 mRNA の選択的分解および、mRNA の翻訳阻害という少なくとも 2 つの遺伝子制御を有していることが知られている。1 個の miRNA は 3'-非翻訳領域(3'-UTR)にほぼ相補的な配列をもつ何千もの遺伝子の転写後抑制因子として働く。miRNA は哺乳動物では少なくとも数百種知られているので、真核生物の生物学的営みのほとんどすべてにかかわると考えられている。よって本研究では、miRNA と軟骨分化との関わりという、いまだに報告の少ないテーマを主眼とした。

#### 【材料と方法】

##### 1. *in silico* 解析

オンラインプログラムである、Targetscan 4.1 を用いて、ヒト *Ccn2* mRNA を標的とする miRNA の予測を行った。

##### 2. 細胞培養

10%の牛胎児血清(FBS)を添加した DMEM 培地にて、ヒトの軟骨肉腫から確立された軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 細胞、ヒトの乳癌細胞株 MDA-MB-231(MDA-231)細胞、およびヒトの子宮頸癌由来の細胞株 HeLa 細胞を 37°C の 5%CO<sub>2</sub> 下にて培養した。

##### 3. マイクロアレイ解析

HCS-2/8 および HeLa 細胞を培養し、全 RNA を抽出した。その全 RNA から miRNA を精製し、マイクロアレイを用い miRNA の網羅的解析を行った。

##### 4. レポータープラスミドの構築

以前の研究で構築された pGL3L(+)/L(-)プラスミドを用いて、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子の下流にヒト *Ccn2* 3'-UTR cDNA 全長、あるいはそれを制限酵素 Hind III で切断した前半断片および後半断片を接続した pGL3UTRS、pGL3SA1 および pGL3SS3 を構築した。

## 5. miRNAs の合成、DNA/RNA 遺伝子導入、およびルシフェラーゼアッセイ

成熟 miRNA は B-Bridge International Inc.(Mountain View, 米国)に受託合成を依頼した。コントロールとしては、含有塩基の順序をランダムに入れ換えたスクランブル RNA を用いた。

遺伝子導入 24 時間前に、HCS-2/8 は 20 万、HeLa は 12 万の細胞数で 12 穴プレートに播種した。miRNA の細胞への遺伝子導入には、終濃度 50nM になるように遺伝子導入を行った。導入から 8 時間後に、上清の交換を行った後、レポーターアッセイを行うためのプラスミド DNA を遺伝子導入した。24 時間後に上清交換、48 時間後に、細胞の回収を行い通法に従いレポータージーンアッセイを行った。

## 6. リアルタイム RT-PCR

miRNA 導入 24 時間前に、HCS-2/8 を 50 万、MDA-231 を 20 万の細胞数で 6 穴プレートに播種し、終濃度 30 nM にて miR-18a およびスクランブル miRNA を導入した。24 時間後に上清交換し、導入 48 時間後に細胞を回収した。回収した細胞から、RNA の精製を行い、通法に従いリアルタイム RT-PCR にて、遺伝子発現を解析した。

## 7. 酵素免疫法(ELISA 法)

CCN2 タンパク質の定量は 2 個の異なる抗ヒトモノクロナル抗体(MAb8-64 と 8-86)を用いたサンドウィッチ ELISA 法によって行った。MAb8-64 をコーティングしたウェルにサンプルを加え、6 度の洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識した MAb8-86 を加えた。テトラメチルベンジンを発色基質として用いた酵素反応により、シグナルの定量化を行った。

### 【結果】

#### 1. CCN2 遺伝子を標的とする miRNA の *in silico* 予測

*in silico* 解析で、CCN2 mRNA を選択的に翻訳阻害に導く miRNA を予測したところ、脊椎動物種間で保存されている 5 種の miRNA を特定した。

#### 2. 軟骨細胞内で発現抑制されている miRNA のマイクロアレイによる網羅的解析

HCS-2/8 細胞から抽出した小分子 RNA を網羅的に解析したところ、5 個の miRNA の中で miR-18a の発現が、コントロールの HeLa 細胞に比して最も発現が低いことが分かった。

#### 3. *Ccn2* 3'-UTR のポリ(A)近位の miR-18a 標的部位の実験的な解明

合成 miR-18a を HCS-2/8 に導入し、レポーター遺伝子を用いた実験で miR-18a の標的部位を確認したところ、*in silico* 解析で予測した標的部位と一致した。

#### 4. HCS-2/8 と MDA-231 における miR-18a の *Ccn2* 抑制機構

軟骨細胞と乳癌細胞との間で miR-18a の抑制機構の比較を行ったところ、miR-18a は軟骨細胞では翻訳レベルで *Ccn2* 発現を抑制する一方、乳癌細胞では *Ccn2* mRNA の分解を促進することも明らかになった。

#### 5. miR-18a が HCS-2/8 の成熟軟骨細胞形質に与える影響

miR-18a の強制導入が軟骨細胞の分化形質に与える影響を HCS-2/8 細胞を用いて解析したところ、軟骨の主要な分化マーカーであるアグリカンの遺伝子発現を有意に抑制することが分かった。

### 【考察および結論】

本研究により初めて miR-18a が CCN2 産生を抑制し、さらには軟骨細胞の表現型を抑制する重要な miRNA と同定した。無論 miR-18a の標的は *Ccn2* だけではないため、今回見られた軟骨細胞の表現型に対する効果はそれ以外の標的遺伝子を介する可能性も残っている。しかしながら以上の所見は、いまだ生理的機能に未解明な点の多い miRNA の研究において、特定の miRNA が軟骨細胞分化、形質維持に深く関わることを示す重要な知見と言える。

## 論文審査結果の要旨

本研究は *Ccn2* 遺伝子を標的とするマイクロRNA(miRNA)を *in silico* 解析で予測し、予測されたmiRNAが実際にCCN2の発現を抑制することを確認した後、特定のmiRNAが *Ccn2* 遺伝子を介して、軟骨細胞の分化を抑制する一連の制御機構を探ったものである。

まず、*in silico* 解析により *Ccn2* mRNAを標的とする5個のmiRNAを特定し、軟骨細胞株HCS-2/8を用いた系では、micro RNA 18a(miR-18a)がマイクロアレイ解析によって軟骨細胞内での発現が低いことが分かった。また、*in silico* 解析により予測されたmiR-18aの標的部位をレポータージーンアッセイにより確認したところ、*in silico* 解析の予測通り *Ccn2* 3'-UTRのpoly(A)近傍の最下流域にmiR-18aの標的部位が存在することを確認した。さらに、実際に合成したmiR-18aを細胞へ遺伝子導入し、*Ccn2* mRNAレベルおよびCCN2タンパク質レベルに対する抑制効果を解析したところ、軟骨細胞においてはタンパク質レベルにおいて *Ccn2* 遺伝子の発現を抑制するのに対して、同じCCN2タンパク質を高発現する乳癌細胞においては *Ccn2* mRNAレベルでの発現の抑制が認められた。最後に軟骨の主要な分化マーカーであるアグリカンの遺伝子発現をmiR-18aがCCN2の発現レベルの抑制を介して抑制することを明らかにし、それによってmiR-18aが、軟骨細胞の表現型に影響を与えることを確認した。

これらの知見はmiRNAによる軟骨細胞分化の抑制という新規の制御機構を知るうえで非常に有用であり、よって、本研究は博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。