

# 骨芽細胞が産生するオステオカルシンは miR-140-3pにより促進される

川崎医科大学・医学部・公衆衛生学  
教授 勝山博信

(2019年11月14日)

## 本発明の特徴

- 臓器間ネットワークの関連を解析する過程でエクソソームに含まれるmiRNAに着目
- 骨芽細胞にwntを導入して発現の変動するmiRNAを検出
- wnt導入により抑制されたmiRNAのうち、miR140-3pの機能を解析

## 従来技術と問題点

- これまでの骨粗鬆症治療薬は副作用を含め、投薬に際して種々の制限が存在
- ビスフォスフォネート製剤・・・骨粗鬆症治療薬として主に使用  
破骨細胞機能を抑制 長期投与で大腿骨の非定型骨折
- 副甲状腺ホルモン製剤・・・骨芽細胞に作用して骨形成  
24ヶ月までの期間限定投与
- 選択的エストロゲン受容体モデュレーター・・・エストロゲン  
レセプターに作用

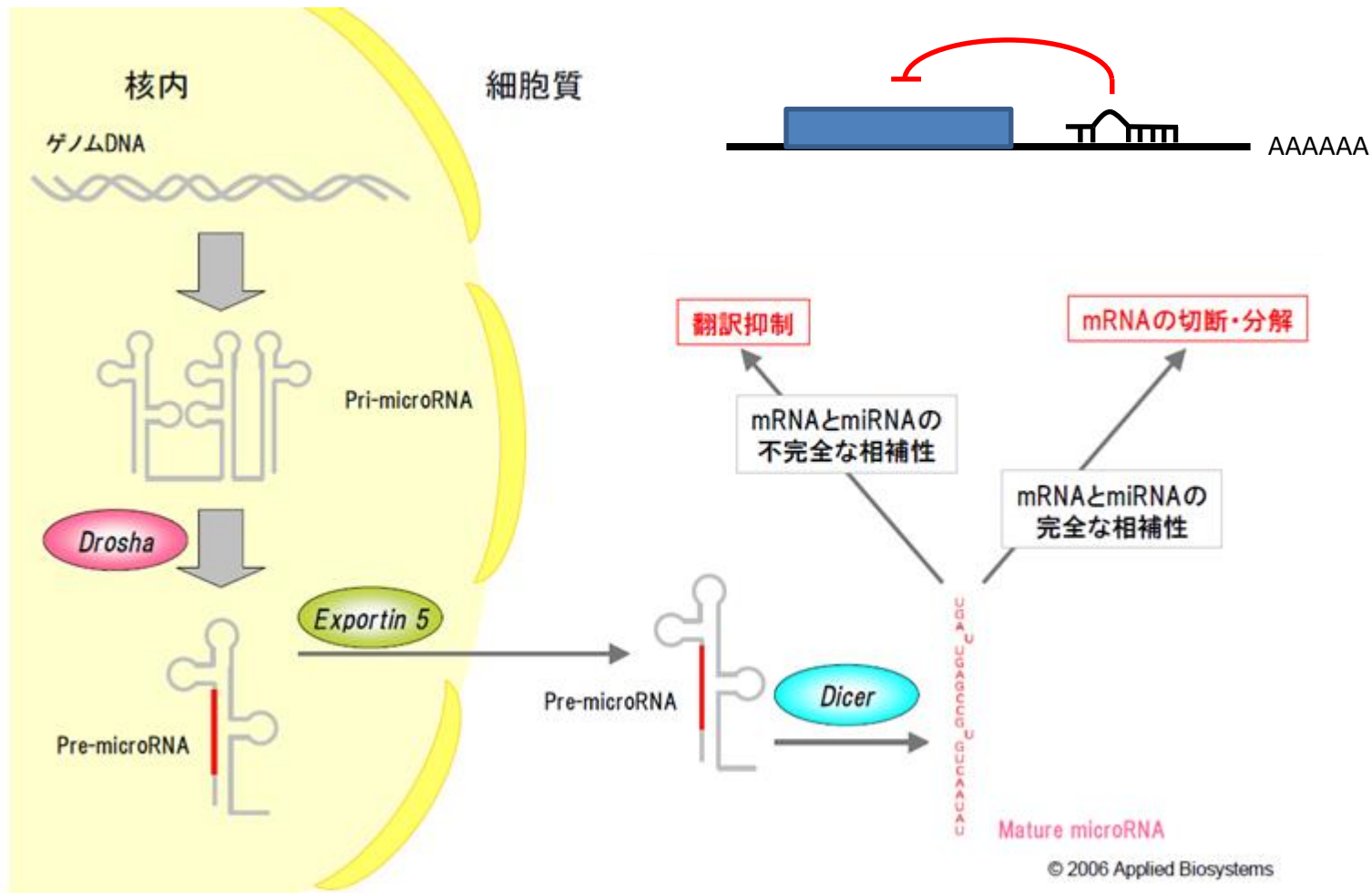
# エクソソームについて



図3 エクソソーム研究が拓く新しい疾患診断・治療:がん細胞のエクソソームを標的にした診断・治療法の開発(悪玉エクソソーム)。再生医療に用いられる間葉系幹細胞のエクソソームの治療応用が期待される(善玉エクソソーム)。このほか、エクソソームのDDS開発も重要な課題。

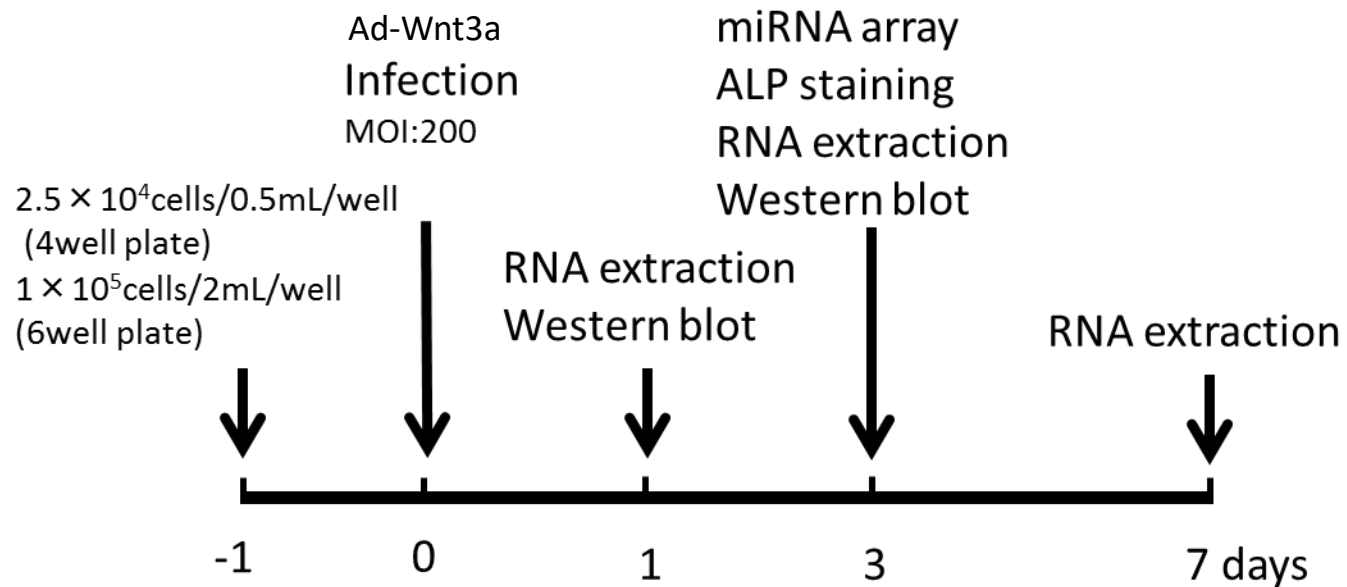
# microRNA

miRNAは約22塩基からなる1本鎖non-coding RNAで、標的遺伝子の3'UTR部に結合し転写後に遺伝子発現を調節する。



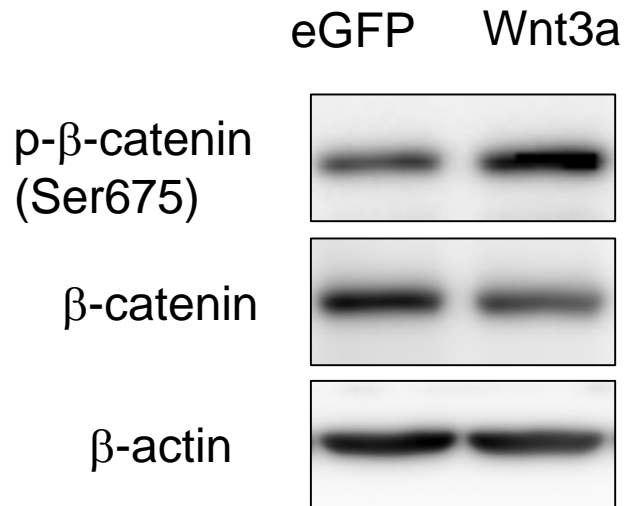
## 実験の概要

# I. 骨芽細胞へのWnt3a導入

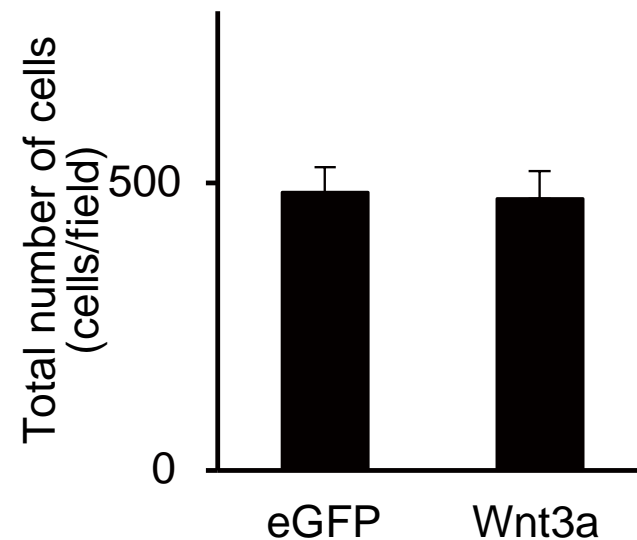


# Wnt3a導入による骨芽細胞分化への影響

Wnt経路の活性化

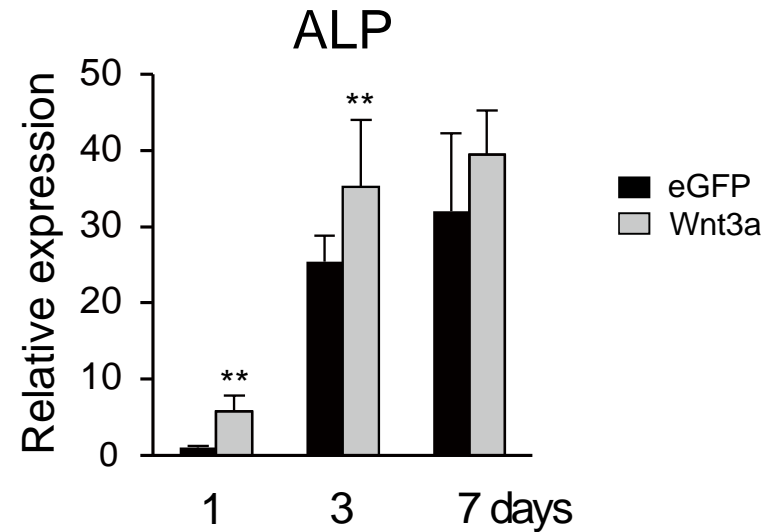
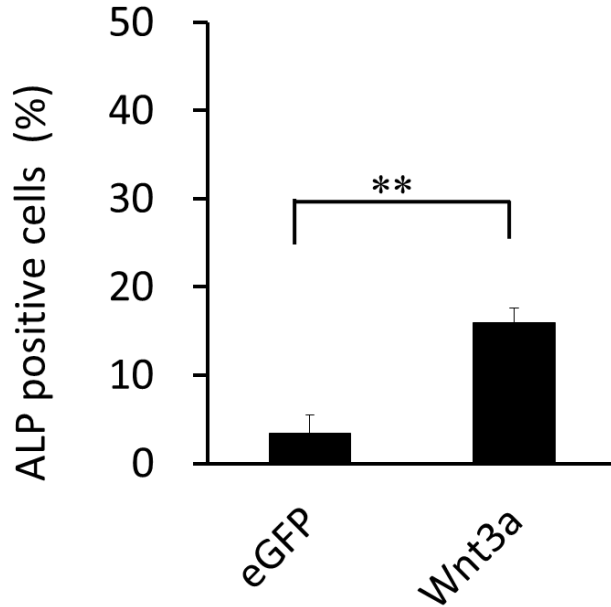
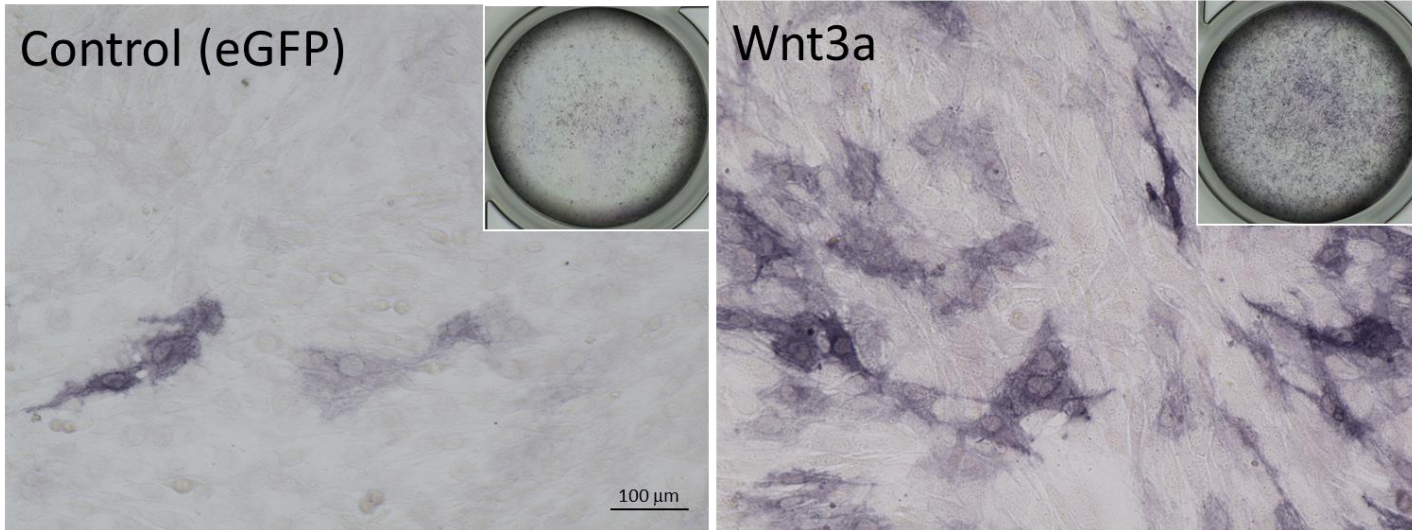


細胞増殖



Wnt3a の過剰発現はβ-catenin(Ser675) を亢進し、β-カテニン経路を活性化した。細胞増殖に影響を及ぼさなかった。

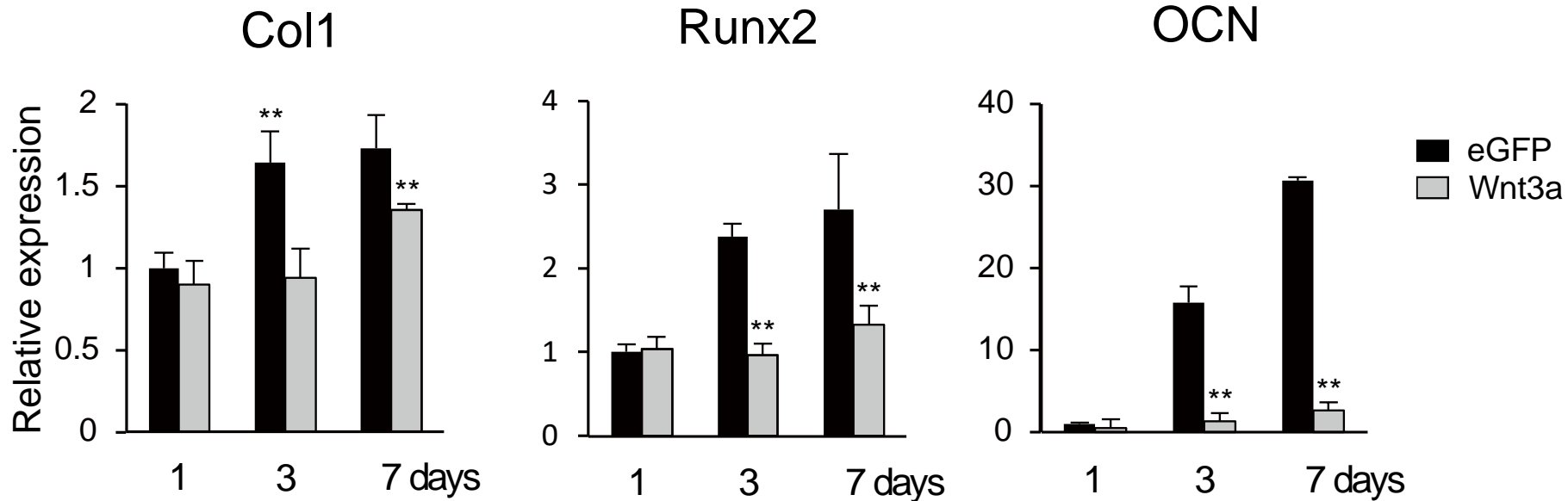
# 初期分化への影響



Wnt3a の過剰発現はALP活性を亢進した。

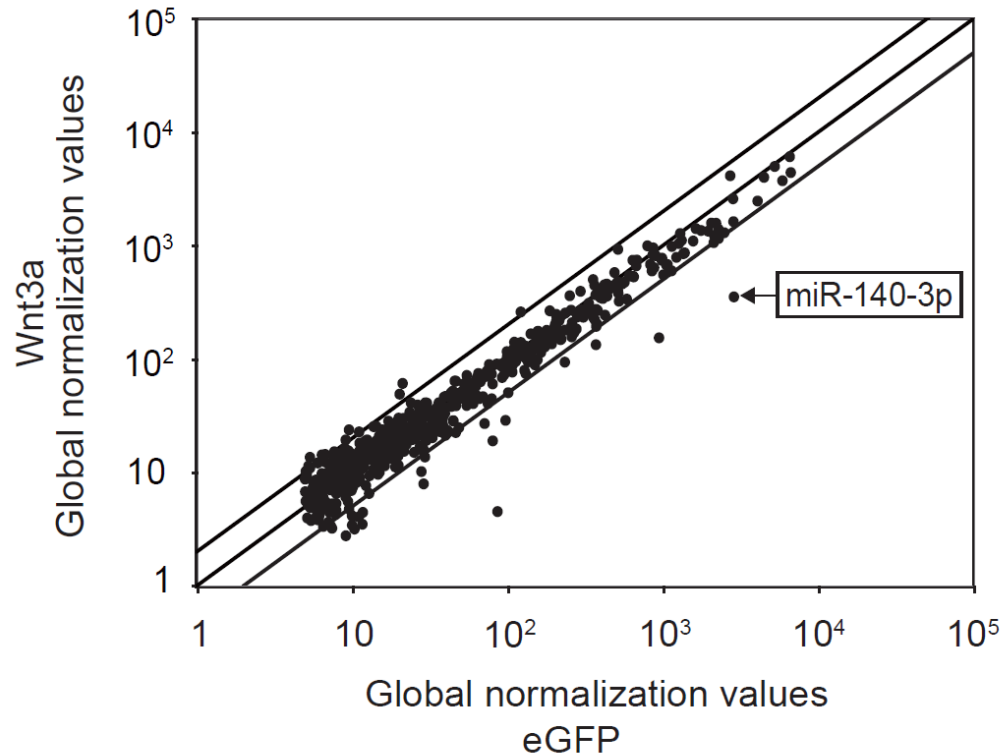


# Wnt3a導入による骨芽細胞特異的遺伝子の発現変化



Wnt3a の過剰発現は Col1, Runx2 , OCNの発現を抑制した。

# miRNA microarrayによるmiRNA発現プロファイル



Wnt3a過剰発現により2倍以上変動したmiRNA

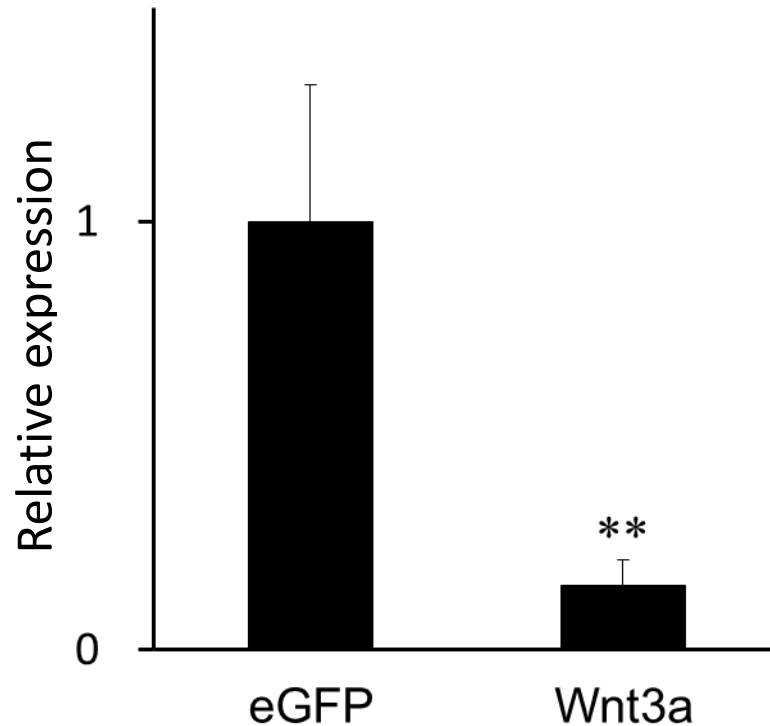
増加群 14種

減少群 21種

この中で変動が大きく、発現量の高いmiR-140-3pに注目

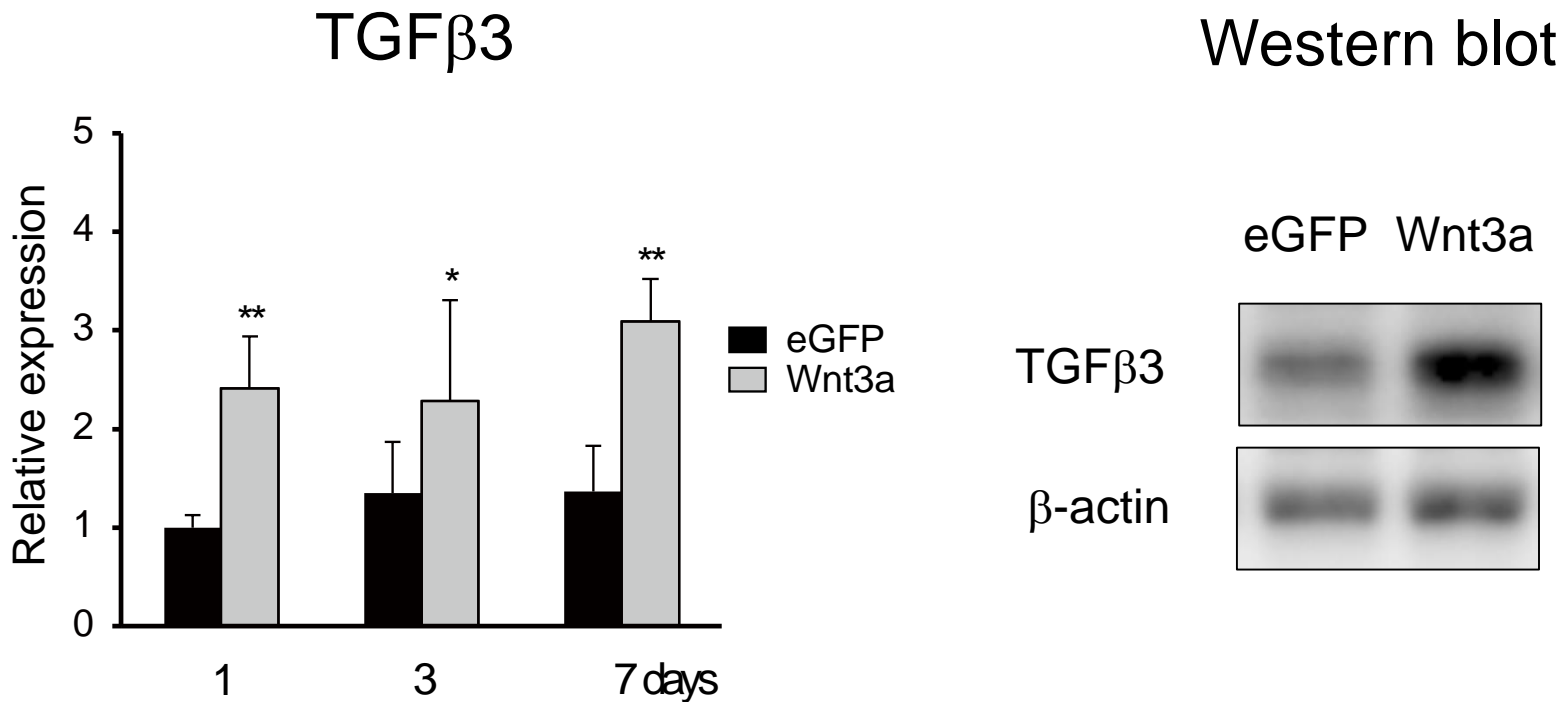
さらにデータベースでmiR-140-3pの標的遺伝子として*Tgfβ3*に注目

## Real-time PCRによるmiR-140-3pの発現解析



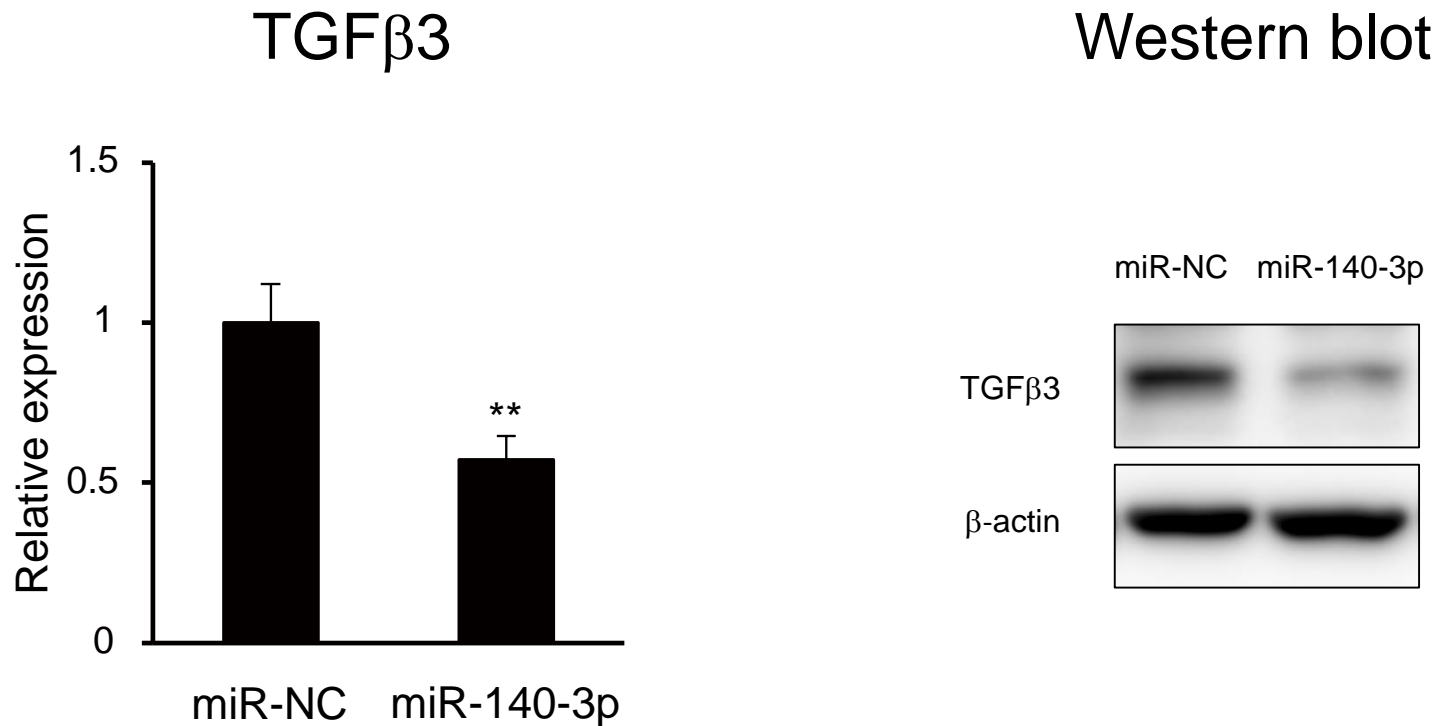
Wnt3a の過剰発現は miR-140-3p 発現を抑制した。

# Wnt3a導入によるTGFβ3の発現変化



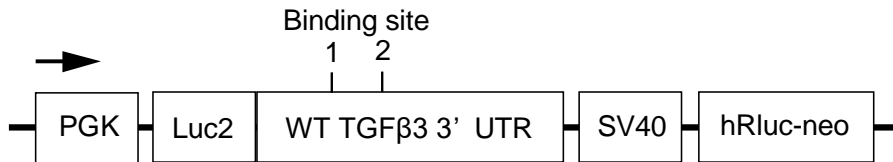
Wnt3a の過剰発現は TGFβ3 発現を亢進した。

# miR-140-3p mimic導入によるTGFβ3の発現変化

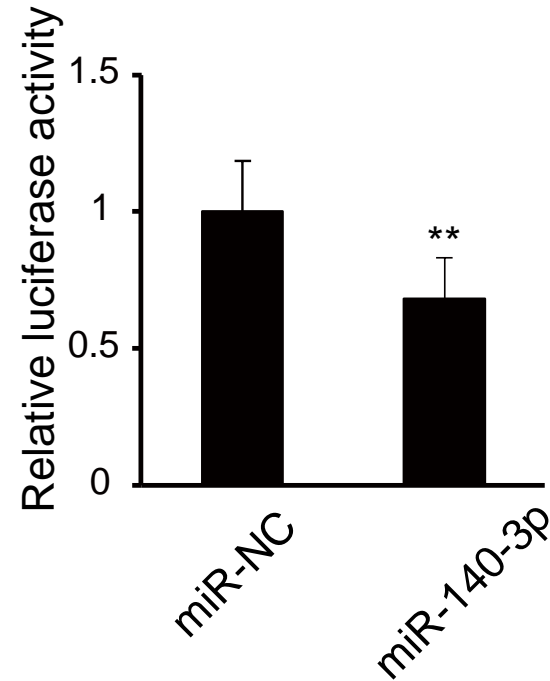


miRNA-140-3p mimic の導入は TGFβ3発現を抑制

# TGFβ3 3'UTRを用いた Luciferase assay

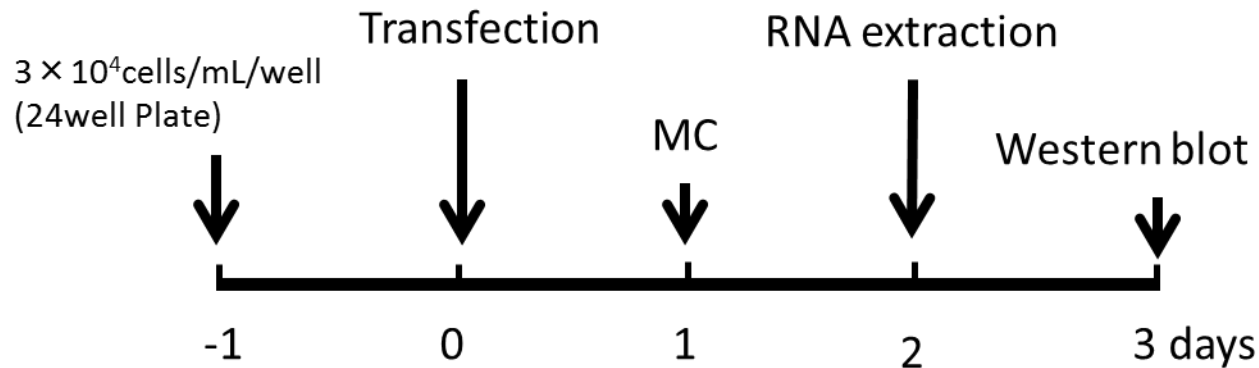


1. TGFβ3 3' UTR 161: 5' GCUUUGAGAAUCACUGUGGUA  
 miR-140-3p 3' GGCACCAAGAUGGGACACCAU  
 2. TGFβ3 3' UTR 223: 5' ACAUGGAAUU--UCUGUGGUG

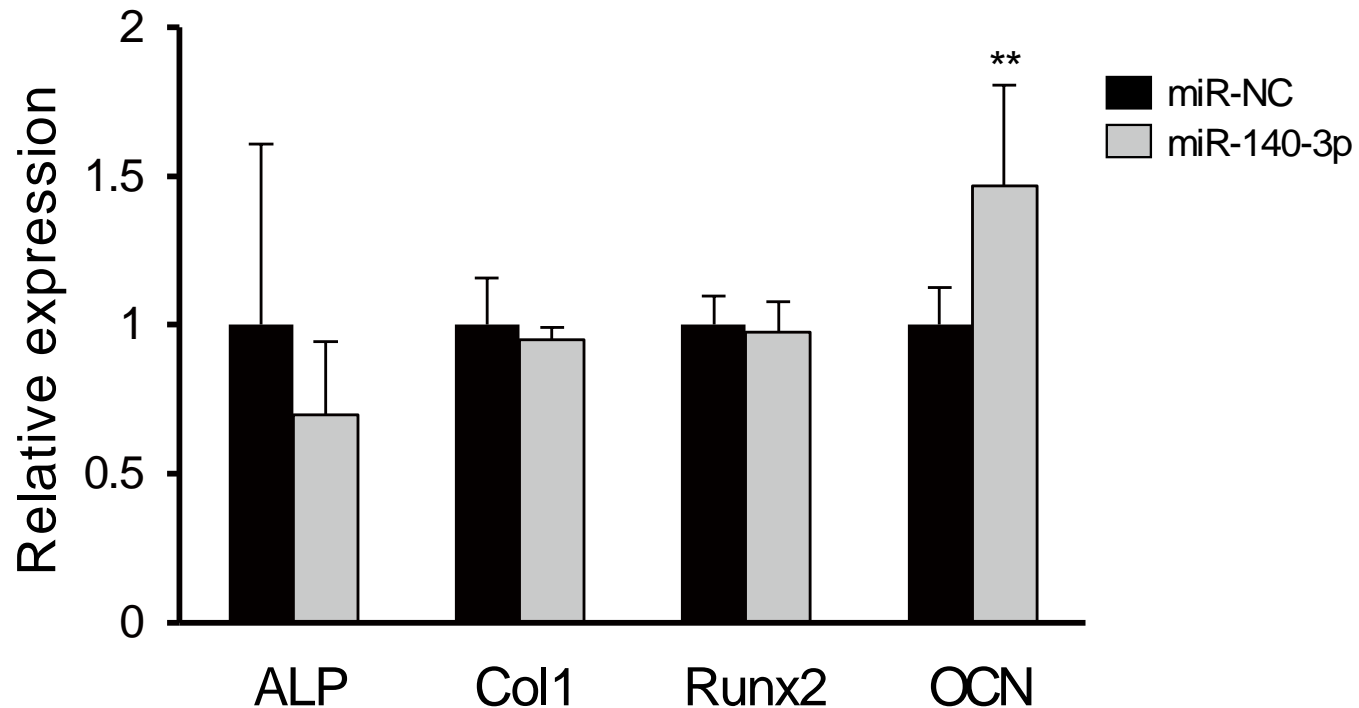


miR-140-3p はTGFβ3 の転写活性を32%抑制

## II. miR-140-3p mimic (10nM) 導入による 骨芽細胞機能の解析



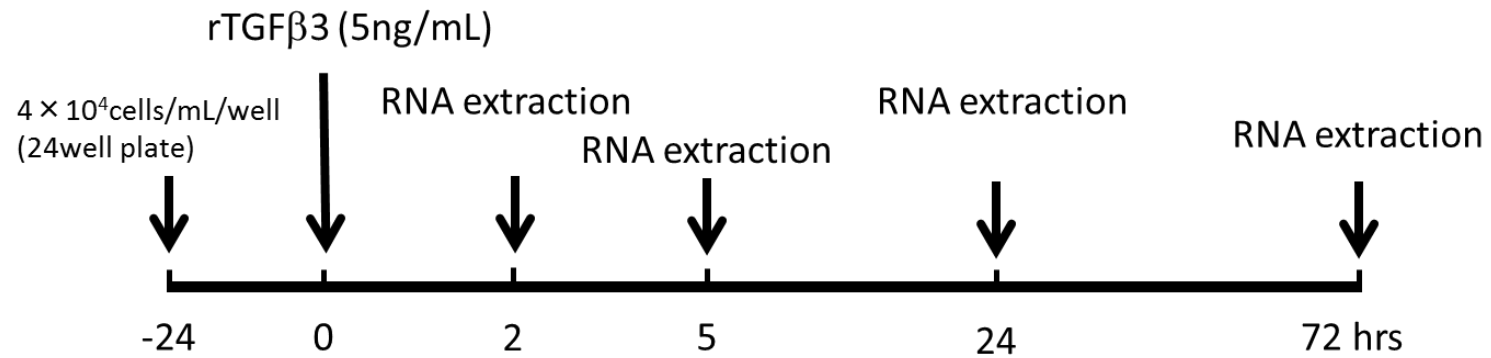
## 骨芽細胞分化への影響



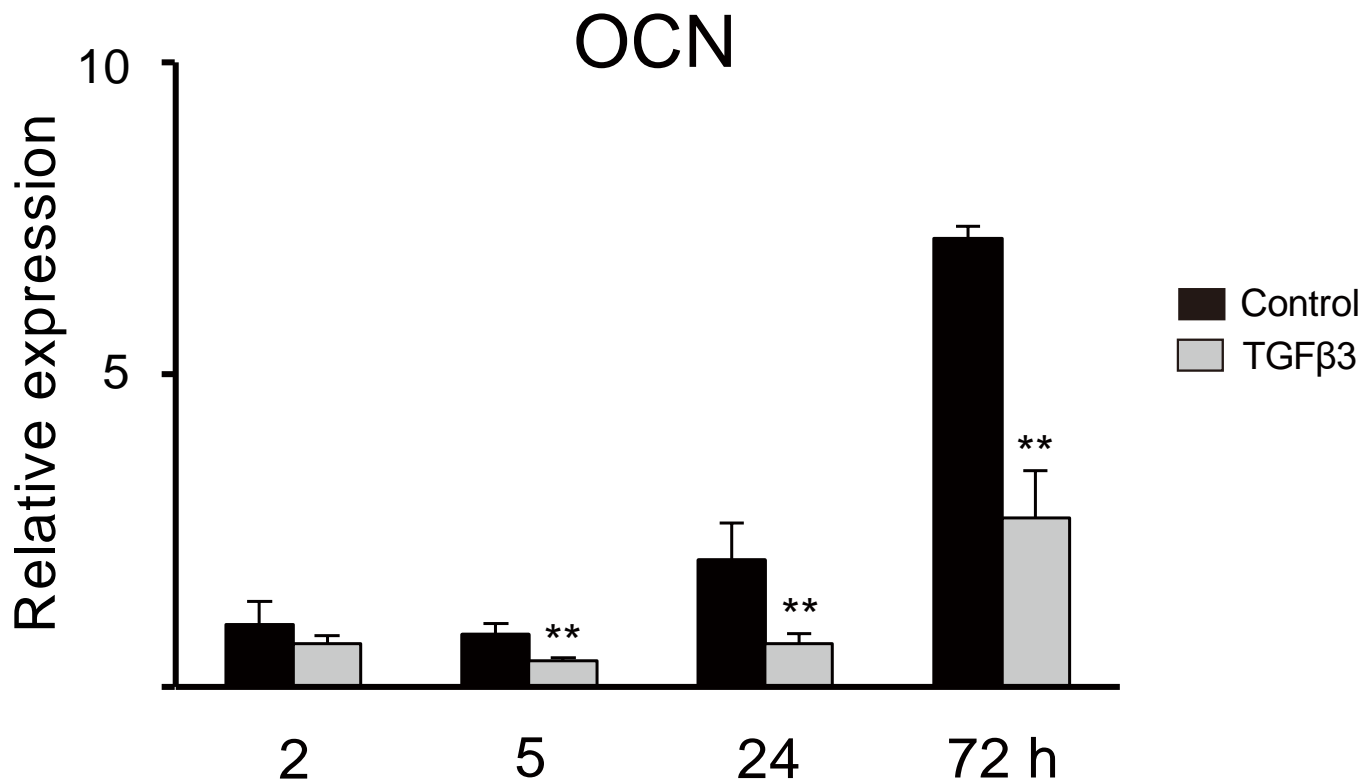
miRNA-140-3p mimic の導入は OCN遺伝子発現を亢進



### Ⅲ. rTGFβ3 (5ng/mL)導入による 骨芽細胞機能の解析

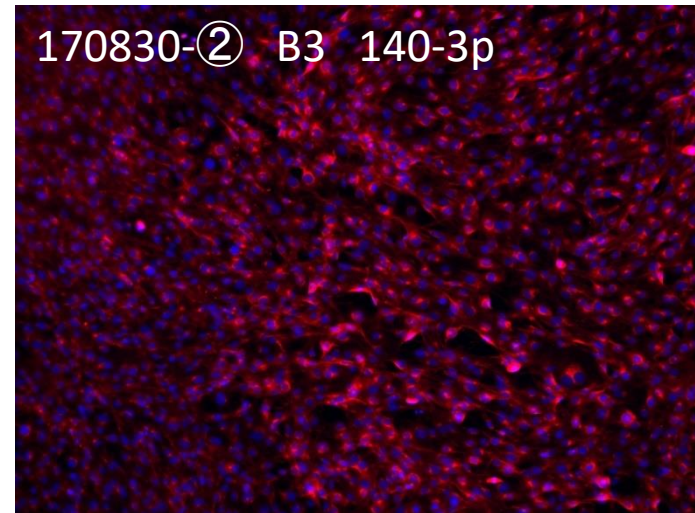
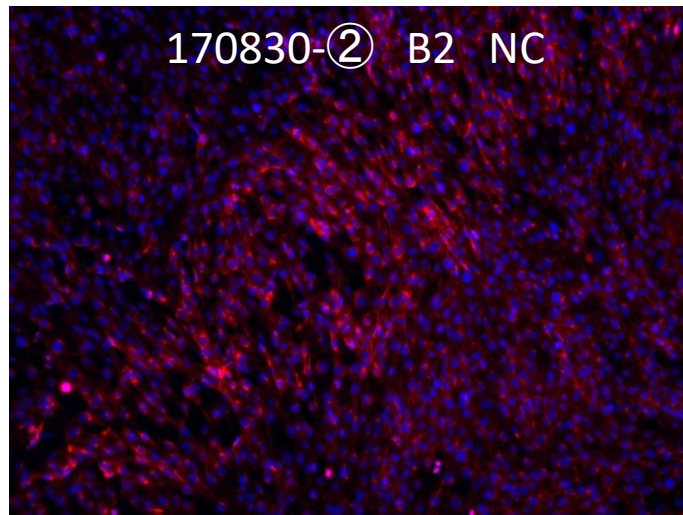


# OCN遺伝子発現変化



TGF $\beta$ 3投与はOCN発現を抑制

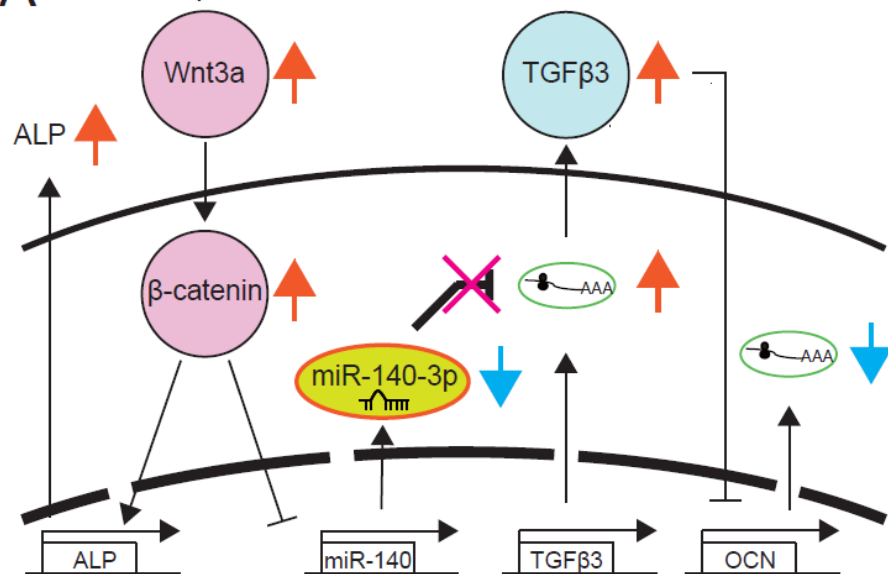
# miR-140-3p mimic導入6日後のOCN免疫染色



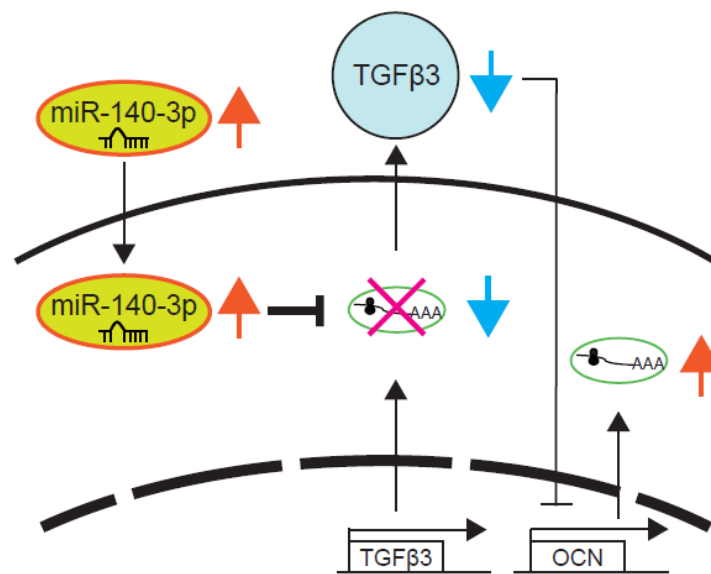
miR-140-3p mimicはOCNの発現を増強

# まとめ

A Overexpression



B Transfection



## オステオカルシンの作用

1. 骨基質中に存在するグラ化オステオカルシン(Gla)は破骨細胞により非カルボキシル化オステオカルシン(Glu)となる
2. Gluは膵臓に働いて $\beta$ 細胞の増殖とインスリンの分泌を促す
3. Gluは脂肪細胞のインスリン感受性を亢進させる
4. miR-140-3pはオステオカルシンの分泌を促進することより、新たな機序の骨代謝改善作用を有するだけでなく、全身の代謝を亢進させる可能性が示唆される

## まとめと考察

1. Wnt3aの過剰発現により2倍以上発現が増加したmiRNAを14種, 減少したmiRNAを21種同定
2. 発現の減少したmiR-140-3pに注目
3. miR-140-3pがTGF $\beta$ 3を標的遺伝子とすることを確認
4. miR-140-3p mimicを骨芽細胞に導入するとTGF $\beta$ 3は減少, OCNは増加
5. 免疫染色にてOCNの発現増強
6. rTGF  $\beta$ 3の投与は, OCNを減少

以上の結果より, miR-140-3pはWnt3a/TGF $\beta$ 3シグナル伝達経路に関与して骨芽細胞分化を調節することを明らかにした。また、miR-140-3pはTGF $\beta$ 3経路を抑制してOCNの発現を促進させることから、OCN産生促進剤の可能性が考えられる。(特開2019-59709)

## 企業への期待

1. 現在、miR-140-3pをナノベジクルに包含させる準備中である
2. 今後は骨芽細胞への投与と動物に投与して、生体内での効果を判定する予定である
3. miRNAを包含させる技術を有する企業と共同研究を希望
4. 実験動物へ投与する技術を有する企業との共同研究を希望

## 本技術に関する知的財産権

発明の名称: miR-140-3pによる骨芽細胞からの  
オステオカルシン産生促進

出願番号: 特願2017-188037

特許出願公開番号: 特開2019-59709

出願人: 学校法人 川崎学園

発明者: 勝山博信、伏見滋子、濃野勉



# お問い合わせ先

川崎医科大学 産学連携知的財産管理室

Tel: 086-462-1111 (内線26030・26049)

Fax: 086-464-1073

Email: [s-renkei@med.kawasaki-m.ac.jp](mailto:s-renkei@med.kawasaki-m.ac.jp)