

論 文 内 容 要 旨

題 目 MiR-494-3p induced by compressive force inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 cells
MC3T3-E1細胞における圧縮応力誘導性miR494-3pによる細胞増殖の阻害

著 者 岩脇 有軌

内容要旨

生体内環境におけるメカニカルストレスは、骨組織の生物学的変化において最も重要な要因の1つである。骨芽細胞はメカニカルストレスの応答細胞であり、骨機能調節の中心的な役割を担う。メカニカルストレスが骨芽細胞に作用して骨分化に影響を及ぼすことはよく知られているが、その他の生理作用やシグナル分子については、未だ不明な点が多い。近年、新たな遺伝子発現制御因子としてmicroRNA (miRNA) が注目されている。本研究では、持続的圧縮応力 (CF: Compressive Force) を負荷した骨芽細胞で変動するmiRNAを同定し、そのmiRNAの骨芽細胞への作用について検討した。

マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1細胞) に294 Paの持続的圧縮応力を24 時間負荷した際のmiRNA発現変動をマイクロアレイ解析によって検討した。発現上昇を認めた14種のmiRNAについて定量的PCR解析を行い、CF負荷により有意に発現が上昇するmiRNAとしてmiR-494-3p, miR146a-5p, miR-210-3p, miR-1247-3pを同定した。このうち、MC3T3-E1細胞で発現量が多く、変化量も顕著であったmiR-494-3pの細胞増殖への関与について、MTT Assayにより検討した。miR-494-3pの過剰発現はMC3T3-E1細胞の細胞増殖を抑制した。さらに24時間のCFを負荷したMC3T3-E1細胞をトリプシン処理と遠心により回収し再播種した細胞で、miR-494-3pの発現上昇の維持と増殖の抑制を認めた。次にmiR-494-3pの標的遺伝子候補をmiRDB、Target Scan、microRNA-orgの3種のデータベースを用いて検索した。得られた標的遺伝子候補のうち、fibroblast growth factor receptor 2 (Fgfr2) とRho-associated coiled-coil kinase 1 (Rock1) について検討を行った。CF負荷やmiR-494-3pの過剰発現はMC3T3-E1細胞でのFgfr2のmRNAレベルとタンパク質レベルを低下させた。一方、Rock1の発現抑制はmRNAレベルでのみ認められた。Fgfr2あるいはRock1のsiRNAによる発現低下はMC3T3-E1細胞の増殖を抑制した。さらにFgfr2とRock1の両方の発現低下は、相乗的な増殖抑制を示した。Fgfr2とRock1 mRNAの3'-非翻訳領域には、それぞれ2箇所のmiR-494-3p結合部位が存在することがmiRDBのアルゴリズムにより予測されたが、ルシフェラーゼアッセイを用いた検討において、miR-494-3pによるFgfr2遺伝子の発現抑制には、2つの結合予測部位の両方が必要で、Rock1遺伝子の発現抑制には5'側の結合予測部位のみが必要であることが示された。

以上より、骨芽細胞でCFにより誘導されるmiR-494-3pは、Fgfr2とRock1の発現抑制を介して骨芽細胞の増殖を抑制することが示された。CFによる骨芽細胞の増殖抑制にmiR-494がシグナル分子として関与している可能性が考えられる。