

氏 名	難波 裕生
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第7026号
学位授与の日付	令和6年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	ヒト長鎖ノンコーディング RNA の破骨細胞分化・機能への影響
論文審査委員	岡元 邦彰 教授 池亀 美華 准教授 寺町 順平 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

ヒト長鎖非コード RNA (lncRNA) の一つ Urothelial cancer associated 1 (UCA1) は、がん関連 lncRNA として知られているが、近年の研究では軟骨細胞分化を促進し、ヒト骨髄細胞でも発現していることが明らかにされている。また、Disrupted-In-Schizophrenia 1 fusion partner 1 (DISC1FP1) は統合失調症関連 lncRNA として知られており、単球と比較しヒト破骨細胞において発現が上昇することが明らかとなっている。以上のことから、UCA1 および DISC1FP1 は骨髄細胞由来の破骨細胞分化および機能に重要な役割を果たしている可能性がある。そこで本研究では、それらを解明することで、骨代謝における lncRNA の役割を明らかにすることを目指した。

【材料ならびに方法】

化学合成した UCA1 cDNA および DISC1FP1 cDNA を、pMX-puromycin レトロウイルスベクターにサブクローニングし、マウス骨髄細胞より採取した破骨細胞前駆細胞に導入後、ピューロマイシンにてセレクションを行い、それぞれの lncRNA 強制発現系を樹立した。そして、得られた細胞株にサイトカイン macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) と Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) 刺激により破骨細胞へと分化させ、lncRNA の強制発現による破骨細胞形成・機能への影響を解析した。具体的には、lncRNA を強制発現させた際のマウス骨髄細胞から破骨細胞への分化を、TRAP 染色、定量リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法により解析し、コントロールベクター導入群と比較した。

【結果と考察】

UCA1 はヒト特異的な lncRNA である。そこで我々は初めに、UCA1 をマウス骨髄由来のマクロファージに強制発現しうるかどうか確認した。そして、実際に UCA1 をマウス骨髄由来のマクロファージに強制発現できることが明らかとなったため、UCA1 が破骨細胞への分化にどのような影響を与えるか解析した。まず、マクロファージに UCA1 を強制発現させた場合の破骨細胞への分化を TRAP 染色によりコントロール群と比較した。TRAP 染色後に破骨細胞数を計測したところ、コントロール群と比較し、UCA1 強制発現群において有意に破骨細胞数が増加した。さらに、マクロファージに UCA1 を強制発現させて、定量リアルタイム PCR 法に

よる解析を行ったところ、破骨細胞マーカーであるNFATc1の発現が亢進する傾向が確認された。これらの結果からUCA1の強制発現はマクロファージからの破骨細胞形成を分化初期のステージから促進することが示唆された。また、マクロファージにUCA1を強制発現させて、TRAP染色を行い、核数が3核以下の破骨細胞数と3核より多い破骨細胞数を計測したところ、コントロール群と比較しUCA1強制発現群において、いずれも増加していた。この結果から、UCA1は多核細胞形成にも影響を与えており、細胞融合にも関与していることが示唆された。

DISC1FP1に関しても、その遺伝子はマウス等のげっ歯類において現在までに登録されていない。そこで、DISC1FP1がマウス由来マクロファージに強制発現できるかを確認した。そして、実際にマウス骨髓由来マクロファージにDISC1FP1が強制発現できたため、DISC1FP1が破骨細胞への分化にどのような影響を与えているか、解析を進めた。まずUCA1と同様にTRAP染色により、マクロファージにDISC1FP1を強制発現させた場合の破骨細胞への分化をコントロール群と比較した。TRAP染色後に破骨細胞数を計測したところ、コントロール群と比較しDISC1FP1強制発現群において有意に破骨細胞数が上昇した。そして、マクロファージにDISC1FP1を強制発現させて、定量リアルタイムPCR法による解析を行ったところ、破骨細胞マーカーである、

NFATc1の発現が亢進した。次に、マクロファージにDISC1FP1を強制発現させてウエスタンブロット法による解析を行ったところ、コントロール群と比較し、破骨細胞マーカーである、NFATc1, c-Fos, Cathepsin Kの発現亢進が認められた。これらの結果から、DISC1FP1の強制発現は、マクロファージからの破骨細胞形成を分化初期ステージから促進することが示された。また、マクロファージにDISC1FP1を強制発現させて、TRAP染色を行い、核数が3核以下の破骨細胞数と3核より多い破骨細胞数を計測したところ、コントロール群と比較し、DISC1FP1強制発現群において、いずれも増加していた。この結果から、DISC1FP1は多核細胞形成に影響を与えており、細胞融合にも関与していることが示唆された。

しかしながら、これらのlncRNAが破骨細胞分化および機能への影響を明らかにするためには、NFATc1や他の破骨細胞マーカーに加え、アクチンリングや骨片上での骨吸収窩形成能などといった破骨細胞の機能面についても解析を行う必要がある。さらに、UCA1およびDISC1FP1はともにヒト特異的なlncRNAであり、ヒトにおける発現が確認されていることから、ヒト末梢血より単離したマクロファージにて、これらのlncRNAノックダウンによる破骨細胞分化能の解析により、骨粗鬆症等や歯周病等、骨代謝に関する疾患における基礎的研究となることが期待される。

【結論】

本研究において、レトロウイルスベクターを用い、マウス骨髓由来マクロファージにlncRNAであるUCA1およびDISC1FP1を強制発現させる実験系を確立した。そして、UCA1およびDISC1FP1の強制発現は、マクロファージからの破骨細胞形成を分化初期から促進し、破骨細胞の多核化にも影響を与える可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

【緒言】

ヒト長鎖非コードRNA(lncRNA)の一つUrothelial cancer-associated 1 (UCA1)は、がん関連lncRNAとして知られているが、近年の研究では軟骨細胞分化を促進し、ヒト骨髄細胞でも発現していることが明らかにされている。また、Disrupted-In-Schizophrenia 1 fusion partner 1 (DISC1FP1)は 統合失調症関連lncRNAとして知られているが、単球と比較し、ヒト破骨細胞において発現が上昇することが明らかとなっている。以上のことから、UCA1およびDISC1FP1は、骨髄細胞由来の破骨細胞分化および機能に重要な役割を果たしている可能性がある。そこで本研究では、それらを解明することで、骨代謝におけるlncRNAの役割を明らかにすることを目指した。

【方法】

化学合成したUCA1 cDNAおよびDISC1FP1 cDNAを、pMX-puromycinレトロウイルスベクターにサブクローニングし、マウス骨髄細胞より採取した破骨細胞前駆細胞に導入後、ピューロマイシンにてセクションを行い、それぞれのlncRNA強制発現系を樹立した。そして、得られた細胞株にサイトカインMacrophage-colony stimulating factor (M-CSF) と Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) 刺激により破骨細胞へと分化させ、lncRNAの 強制発現による破骨細胞形成および機能への影響を解析した。具体的には、lncRNAを強制発現させた際のマウス骨髄細胞から破骨細胞への分化を、TRAP染色、定量リアルタイムRT-PCR法、ウエスタンブロット法により解析しコントロールベクターによる発現系と比較した。

【結果および考察】

UCA1およびDISC1FP1は定量リアルタイムPCR法の結果、ヒトに特異的であるUCA1およびDISC1FP1はマウス骨髄由来のマクロファージにおいても強制発現しうることが明らかとなった。また、TRAP染色、定量リアルタイムPCR法、ウエスタンブロット法による解析の結果、UCA1およびDISC1FP1はマクロファージからの破骨細胞形成を分化初期の段階から促進することが示唆された。さらに、UCA1およびDISC1FP1は多核細胞形成に影響を与えており、細胞融合に関与している可能性が示唆された。

これらの結果は、lncRNA が破骨細胞分化および機能に関与することを示唆する有用な知見であり、得られた成果は新規性に富んでいるものである。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。