

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

難波 裕生

緒言

哺乳類のゲノムは、多くの種類の RNA に転写される。しかしながら、タンパク質情報をもつ mRNA は RNA 全体のごく一部である¹⁾。そして、それ以外の RNA はノンコーディング RNA (ncRNA) に分類される。もともと、研究者の多くが「ゲノムのがらくた」とみていた ncRNA であるが、あまりの量の多さから「何らかの機能をもつのでは」と考えられるようになり、近年注目されるようになってきた。その結果、核内の低分子 RNA や 20 塩基程度のマイクロ RNA には、発生、分化、代謝、発がんなどさまざまな機能が秘められていることがわかってきた²⁾³⁾⁴⁾。一方、数百から数千塩基対に達する長鎖 ncRNA (lncRNA) においての研究はやや出遅れた感があったが、近年研究が進み、現在までに 20,000 種類を超えるヒト lncRNA が確認されている⁵⁾。そして、DNA 複製、RNA 転写、タンパク質翻訳、および細胞発生などに関与し⁶⁾⁷⁾⁸⁾、マイクロ RNA などと同様に、発生、分化、代謝、発がんなどの機能を有することが明らかにされている⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。

本研究において、対象とした lncRNA は以下に示す、Urothelial cancer-

associated 1 (UCA1) および Disrupted-In-Schizophrenia 1 fusion partner 1 (DISC1FP1) である。これらについては、現在までに一部の機能や特定の疾患との関連は明らかとされているが、骨における機能、特に破骨細胞形成における機能は明らかとされていない。

UCA1 はヒト膀胱がんで最初に同定された lncRNA の一種¹²⁾である。UCA1 はヒト 19 番染色体にある、ヒト内因性レトロウイルスゲノムから転写されており¹³⁾、現在までに膀胱がん、乳がんをはじめ、様々なヒトの悪性腫瘍との関連が指摘されている¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。膀胱がん細胞においては、UCA1 はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ/プロテインキナーゼ B 依存性シグナル伝達経路を介して、cAMP 応答配列結合タンパク質の発現を増加させることにより、細胞周期の進行と細胞増殖を促進する¹⁷⁾。乳がん細胞においては、UCA1 がヘテロ核リボヌクレオタンパク質との相互作用によって細胞増殖を促進させることが分かっている¹⁸⁾。さらに、UCA1 は代謝にも関与しており、ヘキソキナーゼ 2(HK2)を制御することにより、膀胱がん細胞の好気性解糖を促進することも明らかとなっている¹⁹⁾。また、UCA1 がヒト線維芽細胞の細胞老化に関連していることも示唆されている²⁰⁾。National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベースによると UCA1 はヒトの骨髄にも発現している。先行研究において、UCA1 サイレンシングは、ヒト軟骨細胞における SOX9 の産生を抑制し、軟骨

細胞の表現型を減弱させることが報告されている²¹⁾。さらに、ヒト骨芽細胞における UCA1 サイレンシングは、骨形成のマスター転写因子および主要な細胞外マトリックス構成遺伝子の発現に影響があることも明らかにされている。しかしながら、上述の通り、UCA1 は悪性腫瘍との関連については研究が進んでいるが、骨と関連する報告は少なく、破骨細胞との関連においては皆無に近い。そこで、我々は、UCA1 が破骨細胞分化に及ぼす影響について検討した。

DISC1 はスコットランドの精神疾患多発家系から最初に同定された遺伝子である²²⁾²³⁾。その後、統合失調症をはじめとする、様々な精神疾患に関与することが明らかにされてきた²⁴⁾。その DISC1 の転写産物として同定された lncRNA が DISC1FP1 であり²⁵⁾²⁶⁾、ミトコンドリアの機能不全を引き起こすことが報告されている²⁷⁾。この DISC1FP1 の機能に関しては、統合失調症関連の報告が多くある一方で、その他のことは明らかとなっていない。しかしながら、lncRNA に関する先行研究で、単球から破骨細胞への分化の際に DISC1FP1 の発現量が増加する²⁸⁾という興味深い報告があった。当該研究によればヒト末梢血から単離した単球を破骨細胞に分化させ、発現が変動する RNA を網羅的に解析した結果、この lncRNA の発現は破骨細胞分化によって 10 倍以上に上昇したとされる。しかしながら、現在までに DISC1FP1 が破骨細胞形成に与える影響についての報告はされていない。そこで我々は、DISC1FP1 の破骨細胞への分化および機能

における影響を詳細に検討した。

材料と方法

1. マウス

本研究では C57BL/6J マウス（日本クレア株式会社, Tokyo, Japan, 10 週齢, メス）を使用した。また, 本研究は, 岡山大学動物実験委員会承認（許可番号 OKU- 2023054）の下で実施した。

2. 破骨細胞培養

マウス大腿骨から骨髓を採取し²⁹⁾, 37°C, 5% CO₂気相下で培養した。培地は 10% ウシ胎児血清およびペニシリンを添加した, alpha-Minimum Essential Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用した。これに macrophage colony stimulating factor (M-CSF: 50 ng/ml) を添加して骨髓細胞を培養し, 培養シャーレの接着性を指標にマクロファージを単離した。破骨細胞への分化は, 採取したマクロファージ 1.0×10^5 cells/ml に対して, receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL); (100 ng/ml) および M-CSF (50 ng/ml) を添加し, 誘導した。

3. 骨髓細胞への lncRNA 強制発現

UCA1 および DISC1FP1 を強制発現させるために、それぞれの cDNA を pMXs (Cell Biolabs) ベクターへ挿入し、そのプラスミドをパッケージング細胞 (Platinum-E (Plat-E); Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) へトランスフェクションした²⁹⁾。この際に使用したプライマーは表 1 に示す。ウイルスを回収後、そのウイルスを前述のマウス大腿骨より採取した骨髓に M-CSF を 48 時間添加した細胞 (破骨細胞前駆細胞) へ感染させた。導入は 1 回/1 日、2 日間行った。導入の際には、M-CSF (50 ng/ml) および polybrene (4 µg/ml ; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を添加した。その後 puromycin (2 µg/ml ; Merck KGaA) の環境下で、薬剤耐性遺伝子を利用して、lncRNA 強制発現細胞の選択を行った。48 時間後に細胞数を 1.0×10^5 cells/ml に揃えて播種し、RANKL (100 ng/ml) および M-CSF (50 ng/ml) を添加し、37°C, 5% CO₂ 気相下で 4~6 日間培養した。比較対象として、empty vector (pMXs) の導入も行い、同様にして培養した。

4. 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色および破骨細胞数測定

UCA1 および DISC1FP1 遺伝子を導入した細胞へ、RANKL (100 ng/ml) および M-CSF (50 ng/ml) を添加し、37°C, 5% CO₂ 気相下で 5 日間培養した。

その後、4%PFA にて 20 分間固定し、TRAP 染色液 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) を用いて染色を行い、光学顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) 下で観察した。その後、破骨細胞の 1 ウェル (96 ウェルプレート) あたりの総数を計測した。さらに、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それぞれ計測した。

5. RNA 単離

それぞれの lncRNA を発現させた細胞を破骨細胞に分化させ、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System キット (Promega, Madison, WI, USA) を使用し、製造元のプロトコルに従って mRNA を分離した。RNA の濃度測定には、NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

6. 定量リアルタイム RT-PCR (RT-qPCR)

それぞれの lncRNA を発現させた細胞を破骨細胞に分化させ、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を製造元のプロトコルに従って使用し、Total RNA を抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。そして、得られた cDNA は SYBR Green Real time PCR Master Mix (TOYOBO) および、CFX96 real time system

(Bio-Rad Hercules, CA, USA)を使用して解析した。本研究で使用したプライマーの塩基配列を表 2 に示す。

7. ウェスタンブロット

分化させた破骨細胞を 0.1% Halt Protease & Phosphatase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) を含む RIPA Lysis Buffer(Millipore, Billerica, MA, USA)にて溶解した。その後、BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) でタンパク質を定量し、1 列あたり 50 μ g となるよう調整した。各サンプルを SDS-PAGE によって分離し、フッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜に転写した。転写したメンブレンを TBS-T に溶解した室温の 5%スキムミルクで 60 分間ブロッキングし、一次抗体 NFATc1 ; sc-7294 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), c-Fos ; 61421 (Active Motif, Carlsbad, CA, USA), Cathepsin K ; C8243 (Sigma-Aldrich) と 4°Cで一晩反応させた。ローディングコントロールとして、 β アクチン抗体 ; A5441 (Sigma-Aldrich) を使用した。4°Cで一晩反応させた後、メンブレンを洗浄し、抗マウス二次抗体 ; AP124P (Millipore) または抗ウサギ二次抗体 ; #7074 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) と室温で 1 時間反応させた。そして、結合した抗体を 20 $\times$ LumiGLO 化学発光試薬 (Cell Signaling Technology) を用いて ChemiDoc システム(Bio-Rad)にて、検出した。

8. 統計解析

各実験系におけるデータは平均±標準偏差(SD)として表した。2 群間の比較は Unpaired t-test で行った。差は $p < 0.05$ の場合に有意差有りとみなした。

結果

1. マウス骨髄由来マクロファージにおける UCA1 の強制発現

前述の方法で作製したレトロウイルスを、マウス破骨細胞前駆細胞に感染させ、ベクターに組み込んだ薬剤耐性遺伝子を利用して UCA1 強制発現細胞のセレクションを行い、RT-qPCR による解析を行った結果、マウス骨髄由来のマクロファージに UCA1 を強制発現できることが確認された (図 1)。

2. UCA1 強制発現による破骨細胞形成能の上昇

UCA1 を強制発現させたマウス骨髄由来のマクロファージに、RANKL と M-CSF を添加し、破骨細胞へと分化させ、TRAP 染色を行った。染色結果を光学顕微鏡で確認したところ、UCA1 遺伝子を強制発現させた場合、コントロール群と比較して、マクロファージの破骨細胞への分化が促進されていることが確認された (図 2A)。1 ウェルあたりの破骨細胞数を計測したところ、コントロール

群と比較して UCA1 強制発現群において、破骨細胞数が有意に増加していた (図 2B)。さらに、コントロール群と UCA1 強制発現群において、破骨細胞数を核数が 3 以下のものと 3 より多いものに分けて計測したところ、双方の総数が増加するとともに、UCA1 強制発現細胞はコントロール群と比較して有意に TRAP 陽性細胞数が増加していた (図 2C)。続いて、同様にして UCA1 を強制発現させたマウス骨髄由来マクロファージを破骨細胞へと分化させ、RT-qPCR による解析を行った。コントロール群と比較し、UCA1 強制発現させた場合に、破骨細胞へ分化した 4 日目の NFATc1 の発現が有意に上昇した (図 2D)。

3. マウス骨髄由来マクロファージにおける DISC1FP1 の強制発現

UCA1 と同様に作製した DISC1FP1 を発現する pMXs ベクターを、マウス破骨細胞前駆細胞に感染させ、ベクターに組み込んだ薬剤耐性遺伝子を利用して DISC1FP1 強制発現細胞のセレクションを行い、RT-qPCR による解析を行った結果、マウス骨髄由来のマクロファージに DISC1FP1 が強制発現していることが確認された (図 3)。

4. DISC1FP1 強制発現による破骨細胞形成能の上昇

DISC1FP1 を強制発現させたマウス骨髄由来のマクロファージに、RANKL と

M-CSF を添加し、破骨細胞へと分化させ、TRAP 染色を行った。染色結果を光学顕微鏡で確認したところ、DISC1FP1 を強制発現させた場合、マクロファージの破骨細胞への分化が促進されていることが確認された (図 4A)。1 ウェルあたりの破骨細胞数を計測したところ、コントロール群と比較して DISC1FP1 強制発現群において、破骨細胞数が有意に増加した (図 4B)。さらに、コントロール群と DISC1FP1 強制発現群において、破骨細胞数を核数が 3 以下のものと 3 より多いものに分けて計測したところ、双方の総数が増加するとともに、DISC1FP1 強制発現細胞はコントロール群と比較して有意に TRAP 陽性細胞数が増加していた (図 4C)。続いて、同様にして DISC1FP1 を強制発現させたマウス骨髄由来マクロファージを破骨細胞へと分化させ、RT-qPCR による解析を行った。コントロール群と比較し、DISC1FP1 を強制発現させた場合に、NFATc1 の発現が有意に上昇した (図 4D)。さらに、ウェスタンブロットによる解析を行ったところ、コントロール群と比較し、DISC1FP1 強制発現群において、NFATc1, c-Fos, Cathepsin K の発現が亢進していた (図 4E)。

考察

本研究では、lncRNA である、UCA1 および DISC1FP1 が破骨細胞に与える影響について解析を行った。UCA1 はヒト特異的な lncRNA であるが、マウス

軟骨前駆細胞株（ATDC5）に強制発現させると、UCA1 を持たない、げっ歯類においても機能分子として作用し、軟骨内骨化過程中的軟骨細胞の挙動を変えることがすでに示されている²¹⁾。

そこで我々は、初めに、UCA1 をマウス由来のマクロファージに強制発現しうかどうか確認した。そして、実際に UCA1 をマウス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、TRAP 染色により、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コントロール群と比較した。TRAP 染色の結果、UCA1 強制発現群において明らかに破骨細胞数が多く認められたため、実際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上昇した。さらに、マクロファージに UCA1 を強制発現させて、RT-qPCR による解析を行ったところ、破骨細胞マーカーである NFATc1 の発現亢進が確認された。NFATc1 は破骨細胞分化の初期のステージで発現が認められる因子である。従って、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、細胞融合に関与している可能性が示唆された。

DISC1FP1 遺伝子も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。そこでまず、DISC1FP1 がマウス骨髄由来マクロファージに強制発現できるか確認した。そして、実際にマウス骨髄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、解析した。

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 染色の結果、DISC1FP1 強制発現群において明らかに破骨細胞数の増加が認められた。そして、マクロファージに DISC1FP1 を強制発現させて、RT-qPCR による解析を行ったところ、破骨細胞マーカーである NFATc1 の発現が有意に亢進した。続いて、マクロファージに DISC1FP1 を強制発現させてウェスタンブロット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、UCA1 と同様に 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 は多核細胞形成にも影響を与えており、細胞融合に関与している可能性も示唆された。

我々は、本研究において、レトロウイルスベクターを用い、マウス骨髄由来のマクロファージに lncRNA を強制発現させる実験系を確立した。そして、lncRNA の中で、UCA1 および DISC1FP1 が破骨細胞分化および多核化を促進することが明らかとなった。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とするためには、NFATc1 あるいは他の破骨細胞マーカーに作用しているかについてさらに RT-qPCR やウエスタンブロットによる解析を進め、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、マウス骨髄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することが明らかとなった。そして、UCA1 および DISC1FP1 は細胞融合にも関与する可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました岡山大学学術研究院医歯薬学域口腔生化学分野の久保田聡教授、歯科矯正学分野の上岡寛教授に心より感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し、ご指導、ご協力いただきました岡山大学学術研究院医歯薬学域歯科矯正学分野の井澤俊准教授、石川崇典助教、徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔分子病態学分野の常松貴明准教授に謹んで感謝の意を表します。最後に、本研究を行うにあたり多くの貴重なご教授とご協力をいただきました岡山大学学術研究院医歯薬学域口腔生化学分野および矯正学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Suresh V, Liu L, Adjero D, Zhou X. RPI-Pred: predicting ncRNA-protein interaction using sequence and structural information. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(3): 1370-1379.
- 2) Chen CK, Blanco M, Jackson C, Aznauryan E, Ollikainen N, Surka C, Chow A, Cerase A, McDonel P, Guttman M. Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing. *Science.* 2016; 354(6311): 468-472.
- 3) Wu D, Huang Y, Kang J, Li K, Bi X, Zhang T, Jin N, Hu Y, Tan P, Zhang L, Yi Y, Shen W, Huang J, Li X, Li X, Xu J, Wang D. ncRDeathDB: A comprehensive bioinformatics resource for deciphering network organization of the ncRNA-mediated cell death system. *Autophagy.* 2015; 11(10): 1917-1926.
- 4) Rearick D, Prakash A, McSweeney A, Shepard SS, Fedorova L, Fedorov A. Critical association of ncRNA with introns. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(6): 2357-2366.
- 5) Volders PJ, Helsens K, Wang X, Menten B, Martens L, Gevaert K, Vandesompele J, Mestdagh P. LNCipedia: a database for annotated human lncRNA transcript sequences and structures. *Nucleic Acids Res.* 2013;

41(Database issue): 246-251.

- 6) Iyer MK, Niknafs YS, Malik R, Singhal U, Sahu A, Hosono Y, Barrette TR, Prensner JR, Evans JR, Zhao S, Poliakov A, Cao X, Dhanasekaran SM, Wu YM, Robinson DR, Beer DG, Feng FY, Iyer HK, Chinnaiyan AM. The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat Genet.* 2015; 47(3): 199-208.
- 7) Ferrè F, Colantoni A, Helmer-Citterich M. Revealing protein-lncRNA interaction. *Brief Bioinform.* 2016; 17(1): 106-116.
- 8) Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev.* 2009; 23(13): 1494-1504.
- 9) Zhao W, Geng D, Li S, Chen Z, Sun M. LncRNA HOTAIR influences cell growth, migration, invasion, and apoptosis via the miR-20a-5p/HMGA2 axis in breast cancer. *Cancer Med.* 2018; 7(3): 842-855.
- 10) McHugh CA, Chen CK, Chow A, Surka CF, Tran C, McDonel P, Pandya-Jones A, Blanco M, Burghard C, Moradian A, Sweredoski MJ, Shishkin AA, Su J, Lander ES, Hess S, Plath K, Guttman M. The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature.* 2015 May; 521(7551): 232-236.

- 11) Chen X, Yan CC, Zhang X, You ZH. Long non-coding RNAs and complex diseases: from experimental results to computational models. *Brief Bioinform.* 2017; 18(4): 558-576.
- 12) Wang XS, Zhang Z, Wang HC, Cai JL, Xu QW, Li MQ, Chen YC, Qian XP, Lu TJ, Yu LZ, Zhang Y, Xin DQ, Na YQ, Chen WF. Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(16): 4851-4858.
- 13) Wang F, Li X, Xie X, Zhao L, Chen W. UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion. *FEBS Lett.* 2008; 582(13): 1919-1927.
- 14) Xue M, Chen W, Xiang A, Wang R, Chen H, Pan J, Pang H, An H, Wang X, Hou H, Li X. Hypoxic exosomes facilitate bladder tumor growth and development through transferring long non-coding RNA-UCA1. *Mol Cancer.* 2017; 16(1): 143.
- 15) Zhang X, Zhu Y, Wu JD, Zhou Y, Chen W, Gu W. Two lncRNAs, MACC1-AS1 and UCA1, co-mediate the expression of multiple mRNAs through interaction with individual miRNAs in breast cancer cells. *Noncoding RNA Res.* 2022; 7(3): 164-170.

- 16) Gu L, Lu LS, Zhou DL, Liu ZC. UCA1 promotes cell proliferation and invasion of gastric cancer by targeting CREB1 sponging to miR-590-3p. *Cancer Med.* 2018; 7(4): 1253-1263.
- 17) Yang C, Li X, Wang Y, Zhao L, Chen W. Long non-coding RNA UCA1 regulated cell cycle distribution via CREB through PI3-K dependent pathway in bladder carcinoma cells. *Gene.* 2012; 496(1): 8-16.
- 18) Huang J, Zhou N, Watabe K, Lu Z, Wu F, Xu M, Mo YY. Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death Dis.* 2014; 5(1): e1008.
- 19) Li Z, Li X, Wu S, Xue M, Chen W. Long non-coding RNA UCA1 promotes glycolysis by upregulating hexokinase 2 through the mTOR-STAT3/microRNA143 pathway. *Cancer Sci.* 2014; 105(8): 951-955.
- 20) Abdelmohsen K, Gorospe M. Noncoding RNA control of cellular senescence. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2015; 6(6): 615-629.
- 21) Ishikawa T, Nishida T, Ono M, Takarada T, Nguyen HT, Kurihara S, Furumatsu T, Murase Y, Takigawa M, Oohashi T, Kamioka H, Kubota S. Physiological role of urothelial cancer-associated one long noncoding RNA in human skeletogenic cell differentiation. *J Cell Physiol.* 2018; 233(6): 4825-

4840.

- 22) St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, Gosden C, Evans HJ. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet*. 1990; 336(8706): 13-16.
- 23) Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(9): 1415-1423.
- 24) Ma TM, Abazyan S, Abazyan B, Nomura J, Yang C, Seshadri S, Sawa A, Snyder SH, Pletnikov MV. Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via D-serine depletion. *Mol Psychiatry*. 2013; 18(5): 557-567.
- 25) Eykelenboom JE, Briggs GJ, Bradshaw NJ, Soares DC, Ogawa F, Christie S, Malavasi EL, Makedonopoulou P, Mackie S, Malloy MP, Wear MA, Blackburn EA, Bramham J, McIntosh AM, Blackwood DH, Muir WJ, Porteous DJ, Millar JK. A t(1;11) translocation linked to schizophrenia and affective disorders gives rise to aberrant chimeric DISC1 transcripts that encode structurally altered, deleterious mitochondrial proteins. *Hum Mol Genet*.

2012; 21(15): 3374-3386.

- 26) Zhou X, Chen Q, Schaukowitch K, Kelsoe JR, Geyer MA. Insoluble DISC1-Boymaw fusion proteins generated by DISC1 translocation. Mol Psychiatry. 2010; 15(7): 669-672.
- 27) Norkett R, Lesept F, Kittler JT. DISC1 Regulates Mitochondrial Trafficking in a Miro1-GTP-Dependent Manner. Front Cell Dev Biol. 2020; 8: 449.
- 28) Liu W, Li Z, Cai Z, Xie Z, Li J, Li M, Cen S, Tang S, Zheng G, Ye G, Su H, Wang S, Wang P, Shen H, Wu Y. LncRNA-mRNA expression profiles and functional networks in osteoclast differentiation. J Cell Mol Med. 2020; 24(17): 9786-9797.
- 29) Izawa T, Zou W, Chappel JC, Ashley JW, Feng X, Teitelbaum SL. c-Src links a RANK/ α v β 3 integrin complex to the osteoclast cytoskeleton. Mol Cell Biol. 2012; 32(14): 2943-2953.

脚注

本論文の一部は以下の学会において発表した。

第 43 回 日本骨形態計測学会 (2023 年 7 月)

第 41 回 日本骨代謝学会学術集会 (2023 年 7 月)

図表の説明

表 1 cDNA を作製する際に用いたプライマーの塩基配列

表 2 リアルタイム PCR に用いたプライマーの塩基配列

図 1 マウス骨髄由来マクロファージにおける UCA1 の強制発現

UCA1 pMXs, control pMXs ベクターをマウス骨髄由来マクロファージに導入後, RT-qPCR を用いて, マウス骨髄由来マクロファージに UCA1 が強制発現することを確認した。縦軸は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 発現量で標準化した相対値を示す。(* $p < 0.05$, $n=3$)

図 2 UCA1 強制発現による破骨細胞形成能の上昇

(A) UCA1 を強制発現させたマウス骨髄由来のマクロファージに, RANKL と M-CSF を添加し, 破骨細胞へと分化させ, TRAP 染色にてコントロール群と比較した。Scale bar : 500 μm 。(B) 1 ウェルあたりの破骨細胞数をコントロール群と UCA1 強制発現群で比較。アスタリスクはスチューデント t 検定にお

けるコントロール群との有意差を示す。(* $p < 0.05$, $n=3$) (C) 核数 ≤ 3 および核数 > 3 の破骨細胞数をそれぞれ計測し, コントロール群と UCA1 強制発現群とで比較した。アスタリスクはスチューデント t 検定の p 値を示す。(* $p < 0.05$, $n=3$) (D) UCA1 を強制発現させたマウス骨髄由来のマクロファージに, RANKL と M-CSF を添加し, 破骨細胞へと分化させ, RT-qPCR による解析を行い, NFATc1 の発現量をコントロール群と UCA1 強制発現群で比較した。縦軸は GAPDH mRNA 発現量で標準化した相対値を示す。(* $p < 0.05$, $n=4$)

図 3 マウス骨髄由来マクロファージにおける DISC1FP1 の強制発現

DISC1FP1 pMXs, control pMXs ベクターをマウス骨髄由来マクロファージに導入後, RT-qPCR を用いて, マウス骨髄由来マクロファージに DISC1FP1 が強制発現することを確認した。縦軸は GAPDH mRNA 発現量で標準化した相対値を示す。(* $p < 0.05$, $n=3$)

図 4 DISC1FP1 強制発現による破骨細胞形成能の上昇

(A) DISC1FP1 を強制発現させたマウス骨髄由来のマクロファージに, RANKL と M-CSF を添加し, 破骨細胞へと分化させ, TRAP 染色にてコント

ロール群と比較した。Scale bar : 500 μ m。(B) 1 ウェルあたりの破骨細胞数をコントロール群と DISC1FP1 強制発現群で比較した。アスタリスクはスチューデント t 検定の p 値を示す。(*p < 0.05, n=3) (C) 核数 $\leq$ 3 および核数>3 の破骨細胞数をそれぞれ計測し、コントロール群と DISC1FP1 強制発現群とで比較した。アスタリスクはスチューデント t 検定の p 値を示す。(*p < 0.05, n=3) (D) DISC1FP1 を強制発現させたマウス骨髄由来のマクロファージに、RANKL と M-CSF を添加し、破骨細胞へと分化させ、RT-qPCR による解析を行い、NFATc1 の発現量をコントロール群と DISC1FP1 強制発現群で比較した。縦軸は GAPDH mRNA 発現量で標準化した相対値を示す。

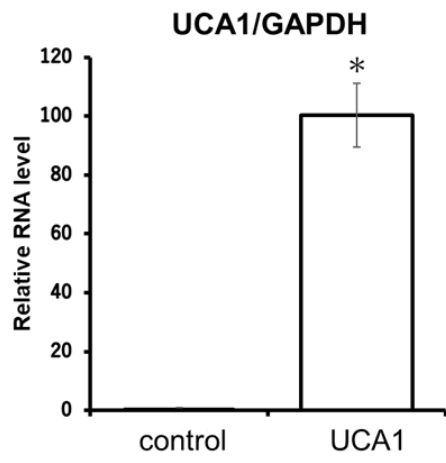
(*p < 0.05, n=3) (E) DISC1FP1 を強制発現させたマウス骨髄由来のマクロファージに、RANKL と M-CSF を添加し、破骨細胞へと分化させ、ウェスタンブロットによる解析を行い、NFATc1, c-Fos, Cathepsin K の発現をコントロール群と DISC1FP1 強制発現群で比較した。 β -actin : ローディングコントロール。

表 1

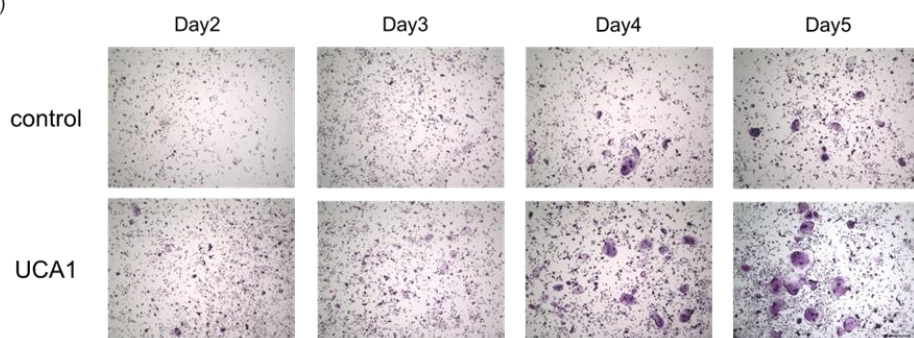
Primer	Direction	Sequence
UCA1	forword	5'-GTGTGGTGGTACGGGGGTTTAGTGAACCGTCAGATC-3'
	reverse	5'GACCACTGTGCTGGCTGTAACTCTAGAGGATCCGC-3'
DISC1FP1	forword	5'-GTGTGGTGGTACGGGGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'
	reverse	5'-GACCACTGTGCTGGCATTTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

表 2 RT-qPCR に用いたプライマーの塩基配列

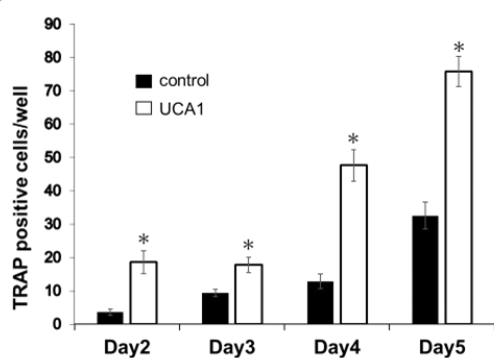
Primer	Direction	Sequence
NFATc1	forword	5'-CCCGTCACATTCTGGTCCAT-3'
	reverse	5'-CAAGTAACCGTGTAGCTGCACAA-3'
GAPDH	forword	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'
	reverse	5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3'
UCA1	forword	5'-TCTAAAACGCTTAGGCTGGCA-3'
	reverse	5'-ATGCTGGTCTGGTTGCCAAA-3'
DISC1FP1	forword	5'-GAAGAAGCTACCTGGGCCTG-3'
	reverse	5'-AGCATTGAAACACGGAGGCT-3'



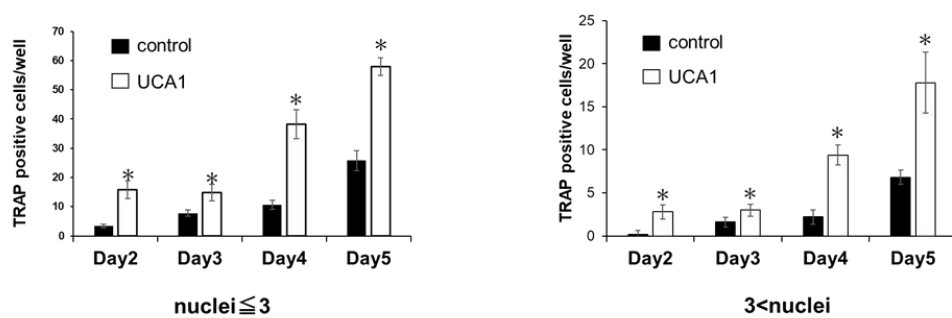
(A)



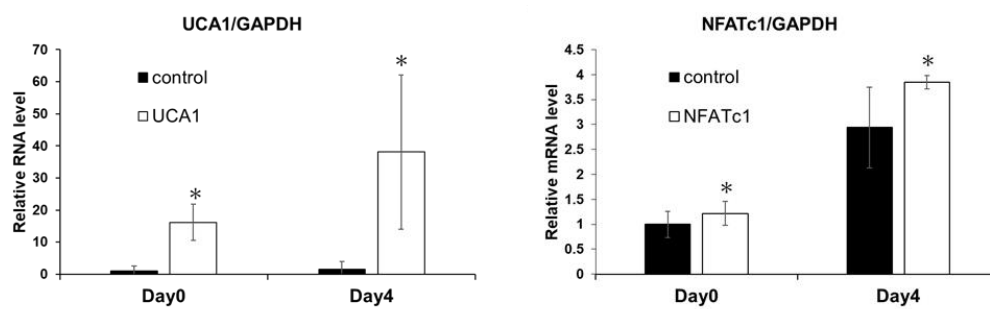
(B)

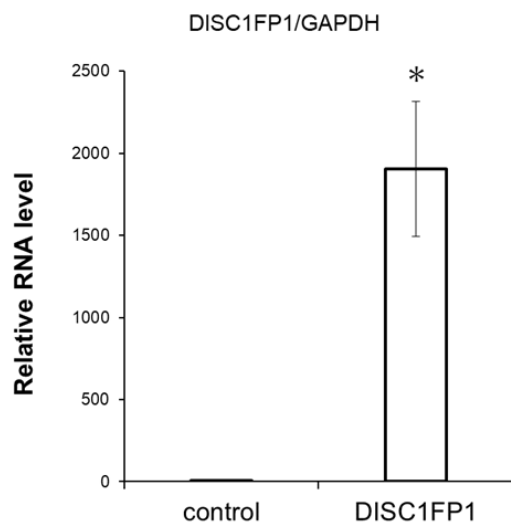


(C)

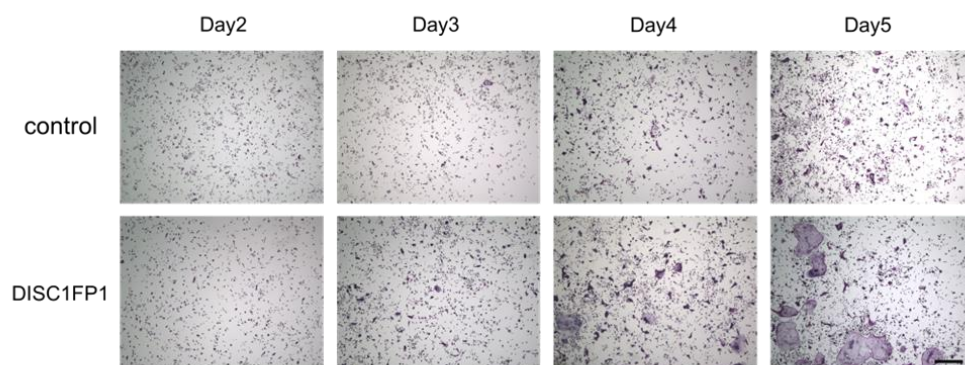


(D)

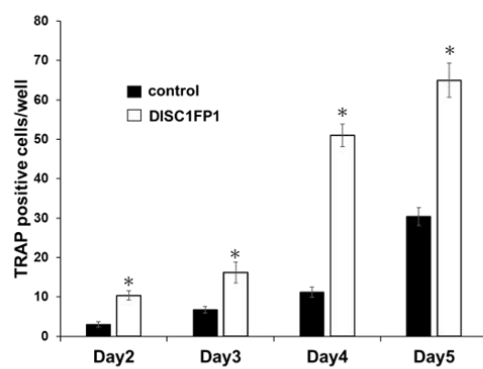




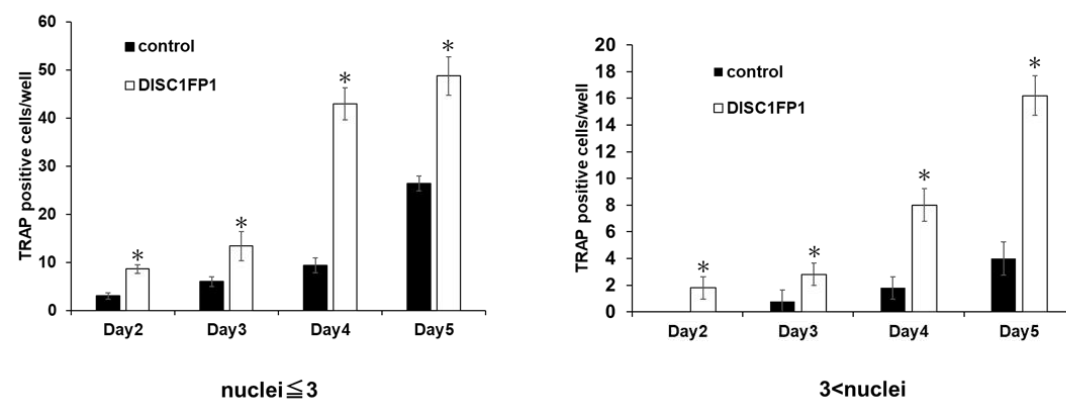
(A)



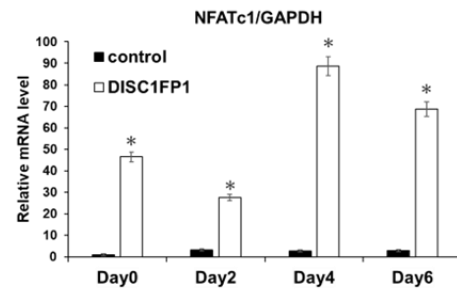
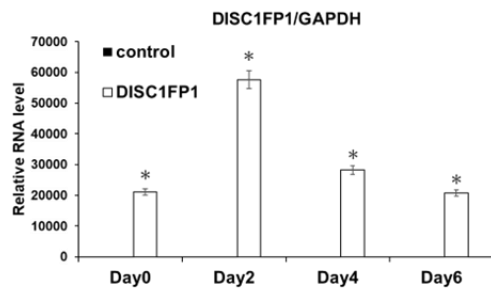
(B)



(C)



(D)



(E)

