

氏 名	加藤 壮真
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7028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	Expression and function of CCN2-derived circRNAs in chondrocytes (軟骨細胞における CCN2 に由来する環状 RNA の発現とその機能)
論文審査委員	山本 直史 教授 長塚 仁 教授 寺町 順平 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】 Cellular communication network factor2 (CCN2)は、insulin-like growth factor binding protein-like module (IGFBP)、von Willebrand factor type C module (VWC)、thrombospondin-1 type 1 repeat module (TSP1)、C-terminal cystine knot module (CT)の4つのモジュールから構成されており、軟骨細胞、血管内皮細胞など様々な間葉系細胞に発現する。一方、circRNAはpre-mRNAの成熟過程でback-splicingを介して生成されるポリA構造を持たない環状のRNAである。circRNAの機能は多彩であり、例えばmiRNAスポンジとして機能し、miRNAに結合してその機能を阻害する。*CCN2*に由来するcircRNA (*CCN2*-derived circRNA)も、ヒト血管内皮細胞で発現していることが確認されているが、軟骨細胞においては、その存在や生物学的機能は不明なままである。そこで本研究では、軟骨細胞における*CCN2*-derived circRNAの発現とその機能について検証した。

【材料・方法】① ヒト軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 細胞における *CCN2*-derived circRNA を検出するために、既知の *CCN2*-derived circRNA の back-splicing junction を挟む3つの primer を設計し、*hCCN2*TSP1-BA、*hCCN2*UTR-BS の組み合わせを UTR-TSP1 primer set とし、*hCCN2*UTR-BS と *hCCN2*IGFBP-BA の組み合わせを UTR-IGFBP primer set とした。HCS-2/8 細胞から RNA を精製し、RNaseR (0U、1U、5U、10U) 処理後に各 primer set を用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動にて増幅産物の塩基対数を計測し、予想値と比較した。さらに DNA シークエンシングにより増幅産物の塩基配列を調べた。② マウス軟骨前駆細胞株 ATDC5 細胞においても、*Ccn2*-derived circRNA を検出するため同様に、*mCcn2*TSP1-BA primer と *mCcn2*UTR-BS primer を設計した。まず、ATDC5 細胞分化段階の確認のため、細胞分化誘導後3日ごとに RNA を回収し RT-qPCR で分化日数ごとの *Col2a1*、*Col10*、*Acan* mRNA の発現量を定量した。この RNA を用いて、*mCcn2*TSP1-BA primer と *mCcn2*UTR-BS primer により PCR を行った後のアガロースゲル電気泳動により増幅産物の塩基対数を計測した。これらについても DNA シークエンシングにより塩基配列を調べた。③ HCS-2/8 細胞における *CCN2*-derived circRNA の機能を検討するために、*CCN2*-derived circRNA を siRNA により特異的にノックダウンし、RNA を精製し *SOX9*、*ACAN*、*COL2A1*、*COL10A1*、*CCN2* mRNA の発現量を qPCR にて定量した。さらに *SOX9*、aggrecan、type II collagen、*CCN2* の産生量を immunoblotting でも確認した。また glycosaminoglycan (GAG) assay は、siRNA 添加48時間後、HCS-2/8 細胞の培養上清および細胞抽出液に対して行った。続いて機能を解明するため、この *CCN2*-derived circRNA が吸着しうる miR-181-5p に対する reporter gene assay を行った。具体的には、miR-181-5p の標的配列を有する pGL3-181TS を siRNA と同時に HCS-2/8 細胞にトランスフェクションし、そのルシフェラーゼ活性を測定した。

【結果】① UTR-TSP primer setを用いたPCRではRNaseR濃度に関わらず予想よりも短い一定の鎖長をもつ増幅産物を認めた。UTR-IGFBP primer setにおいては予想よりも短い複数の増幅産物を認めた。DNA シークエンシングによりこれらの塩基配列を解析したところ、UTR-TSP primer set より1つの circRNA [*CCN2*-derived circRNA (A)]、UTR-IGFBP primer set より2つの circRNA [*CCN2*-derived circRNA (B-1, B-2)]が検出された。*CCN2*-derived circRNA (A)に相当する増幅産物では3'-UTR領域とTSP1領域とが隣接しており、3'-UTR領域の3'末端で塩基番号1784から始まりGTGTGTG配列を経て塩基番号1860に終止する領域と、TSP1領域の5'末端の塩基番号693から始まりGTGTGTG配列を経て塩基番号802に終止する領域を含んでおり、増幅産物の塩基対数は180bpであった。*CCN2*-derived circRNA (B-1, B-2)では、3'-UTR領域とIGFBP領域とが隣接しており、塩基対数はそれぞれ226bp、402bpであった。*CCN2*

pre-mRNAの二次構造をUNAFoldで予測した結果、37℃で-707.33 kcal/molのギブス自由エネルギー変化を伴う安定な構造をとりうるということがわかった。さらに*CCN2*-derived circRNA (A)のback-splicing donor (BSD)は予測される二次構造の不安定な部分に位置しており、コンフォーメーション障害によってback-splicingが起りやすくなっていると示唆された。② 分化誘導を行ったATDC5細胞の軟骨分化マーカー遺伝子発現レベルは、*Col2a1*、*Col10a1*、*Acan* mRNAにおいて分化日数を経るごとに増加していった。この分化条件下で*Ccn2*-derived circRNAを検出したところ、200bpから600bpの範囲で複数の増幅産物を認め、それらの量は分化誘導後12日目でも、有意に高いことがわかった。これら増幅産物のDNAシーケンシングでは複数のcircRNAが確認され、一部には塩基の挿入や欠失を伴うものも認められた。③ siRNAにより*CCN2*-derived circRNA (A)が特異的にノックダウンできていることを確認したRNAを用いた、qPCRにより*SOX9*、*ACAN*、*COL2A1*、*COL10* mRNAの発現量を定量したところ、*ACAN*においてのみ、*CCN2*-derived circRNA (A)ノックダウン群でその発現量が有意に減少していた。ImmunoblottingではSOX9、aggrecan、type II collagenの産生量に明瞭な差は確認されなかったが、GAG assayではculture supernatantおよびcell lysateともにGAGの蓄積量が*CCN2*-derived circRNA (A)ノックダウン群で有意に減少していた。さらにpGL3-181TSを用いたreporter assayでは*CCN2*-derived circRNA (A)ノックダウン群においてルシフェラーゼ活性が有意に減少していた。

【考察】本研究でHCS-2/8細胞とATDC5細胞において*CCN2*-derived circRNAが発現していることが明らかになった。このcircRNAの生合成経路はまだ不明であるが、circRNAの生合成メカニズムとしてintron paringやRNA binding proteinによりback splicing acceptor (BSA)とBSDが引き寄せられ環状化を受けるモデルが考えられている。*CCN2*遺伝子にはback-splicingを促進する*Alu*配列のようなshort interspersed nuclear elements (SINEs)は確認されていないが、UNAFoldを用いた二次構造解析により、BSDとBSAは*CCN2* pre-mRNAの安定した構造の周辺に集まっていることが示唆された。したがって、この複雑な二次構造が、構造を安定化させるRBPの作用と共に環状化を導くと考えられる。circRNAには様々な機能があるが、その1つにmiRNAスポンジとしての機能がある。本研究では、*CCN2*-derived circRNA(A)をノックダウンすると、軟骨細胞分化マーカー遺伝子である*ACAN* mRNAの発現レベルが有意に減少することが分かった。すなわち、*CCN2*-derived circRNA (A)は軟骨細胞の表現型を支持する*ACAN* mRNAの発現を促進することが明らかとなった。重要なことに*CCN2*-derived circRNA (A)の3'-UTR領域には*ACAN* mRNAの発現を阻害するmiR-181-5pの結合部位が存在している。本研究でのpGL3-181TSを用いたreporter assayにより、miR-181-5pの標的mRNAへの結合は、*CCN2*-derived circRNA (A)によって競合されることが示された。したがって、*CCN2*-derived circRNA (A)は、miRNAスポンジとしてmiR-181-5pの*ACAN* mRNAへの結合を阻害し、*ACAN* mRNAの分解を防ぐことにより、その発現を促進する可能性がある。

【結論】本研究により確認された*CCN2/Ccn2*-derived circRNAは、ヒトのものとマウスのものとで構造が異なることから、種により異なるcircRNAが産生されていることが示唆された。また、ヒト*CCN2*-derived circRNAにおいては、*ACAN*の発現のみを制御していたことから、軟骨細胞分化マーカー遺伝子により、それを制御するcircRNAが異なる可能性を示している。さらには、マウス*Acan* mRNAではmiR-181-5pの標的配列が見つかっていないことから、種により異なるcircRNAによる軟骨細胞分化制御機構が存在していると考えられる。

論文審査結果の要旨

【緒言】 Cellular communication network factor (CCN) 2分子は軟骨細胞の分化や増殖を促進する。一方、環状RNA (circRNA)は遺伝子のバックスプライシングによって生成され様々な機能を示す。CCN2からもヒト血管内皮細胞ではcircRNAの生成は確認されているが、軟骨細胞においてはこれまでに報告はない。そこで今回我々は、軟骨細胞における CCN2由来circRNAの発現とその機能について検証した。

【材料・方法】 ヒト軟骨細胞様細胞株HCS-2/8細胞からRNAを抽出し、RNaseR処理により直鎖状RNAを除去した後、CCN2由来circRNAを検出するプライマーを用いてRT-PCRを行った。その後、アガロース電気泳動により増幅産物の塩基対長を推定し、予想した長さと比較した。さらに、DNAシーケンシングによりその塩基配列を特定した。また、マウス軟骨前駆細胞株ATDC5細胞を分化させつつ経時的にRNAを回収しRNaseR処理後、Ccn2由来circRNAを検出するプライマーによりRT-PCRを行った。次に、siRNAによりCCN2由来circRNAをノックダウンし軟骨分化マーカー遺伝子の発現量をRT-qPCRにより測定した。またglycosaminoglycan (GAG) assayによりGAGの蓄積量を比較した。Reporter gene assayでは、miR-181-5pの標的配列を含むCCN1 mRNAにルシフェラーゼ遺伝子を連結して構築したpGL3-181TSを用い、miR-181-5p機能をルシフェラーゼ活性で測定した。

【結果】 HCS-2/8細胞において、PCR後の電気泳動でRNaseR処理を行ったものについても一定の位置にバンドが確認され、環状RNAの特徴を有するCCN2由来circRNAの発現が示唆された。また、ATDC5細胞においてもCcn2由来circRNAが複数存在することが示唆され、分化誘導後9、12日目にこれらcircRNAの発現量がピークに達していた。さらに、CCN2由来circRNAの1つをsiRNAによりノックダウンすると、Aggrecan (ACAN) mRNAの発現量が有意に減少した。GAG assayではGAGの蓄積量がノックダウン群で有意に減少していた。Reporter gene assayではノックダウン群においてmiR-181-5p機能の増強が観察された。

【考察・結論】 HCS-2/8細胞とATDC5細胞においてCCN2由来circRNAが発現していることが明らかになった。ヒトCCN2由来circRNAのノックダウンによりACAN mRNAとGAG発現量が低下したが、これはこのcircRNAがmiR-181-5pのmiRNAスポンジとして機能するためと考えられる。

本研究にて検出されたcircRNAは、これまでに報告されていない新規のものであり軟骨分化に関わる遺伝子の制御に関与していることが明らかになった。得られた成果は軟骨代謝にcircRNAがもたらす影響および分子メカニズムを紐解く上で重要な知見であり、今後は*in vivo*実験を通してcircRNAの更なる生物学的機能の解明が期待される。本論文はすでに、Journal of Cell Communication and Signalingにて掲載されており、国際的にも評価されている。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。