

審査の結果の要旨

氏名 荒井 誠

本研究は骨組織の大多数を占めながらも近年までその多様な機能が明らかにされてこなかった骨細胞を対象にしている。そして、長鎖ノンコーディング RNA というこれもまたその多彩な作用機構とそれによる生命現象への関与が最近続々と明らかになってきたノンコーディング RNA に着目し、骨細胞由来の長鎖ノンコーディング RNA が骨代謝に果たしている役割を、骨芽細胞から骨細胞への分化という点に関して検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 骨細胞が EGFP 標識された *Dmp1-Cre; EGFP* マウスの大腿骨から、フローサイトメトリーを用いて EGFP 陽性および陰性細胞を分取し、RNA シークエンスに供することで、骨細胞に特徴的な長鎖ノンコーディング RNA を複数同定した。
2. 上記の長鎖ノンコーディング RNA をマウスの骨細胞の細胞株である IDG-SW3 細胞に遺伝子導入し、骨芽細胞から骨細胞への分化に及ぼす影響を比較した。その中で、新規の長鎖ノンコーディング RNA である 9530026P05Rik を恒常的に発現する IDG-SW3 細胞 (9530026P05Rik 恒常発現株) では骨細胞への分化が強力に抑制されることを発見した。
3. 9530026P05Rik 恒常発現株では、骨形成に重要な転写因子である Osterix およびそれ以降の骨形成マーカー遺伝子の発現が低下していた。
4. 通常の IDG-SW3 細胞における内因性の 9530026P05Rik のノックダウンによって、Osterix およびそれ以降の骨形成マーカー遺伝子の発現が上昇した。
5. Wnt/ β カテニン経路は骨芽細胞から骨細胞への分化に重要で、かつ Osterix の発現調節にも関与する経路であるが、9530026P05Rik 恒常発現株では同経路が抑制されていることを、活性型 β カテニンの蛋白質質量および Wnt/ β カテニン経路のレポーターアッセイで示した。
6. 9530026P05Rik は主に核内に局在することを FISH で示した。
7. RNA プルダウンを行い質量分析に供することで、9530026P05Rik は核内蛋白質である CCAR2 と結合することを明らかにした。この結果は抗 CCAR2 抗体を用いた RNA 免疫沈降によって裏付けられた。
8. CCAR2 は Wnt/ β カテニン経路を亢進させることで骨芽細胞から骨細胞への分化を促進することを、CCAR2 の過剰発現もしくはノックダウンした細胞の解析で

明らかにした。また、9530026P05Rikによって低下した Wnt/ β カテニン経路のプロモーター活性が CCAR2 によって回復することから、9530026P05Rik と CCAR2 は一部共通した経路を介して Wnt/ β カテニン経路を調節していることが示唆された。

9. CCAR2 とヒストン脱アセチル化酵素である HDAC1 が結合することを免疫沈降で示した。
10. *Osterix* 遺伝子のプロモーター上で Wnt/ β カテニン経路の転写因子である TCF/LEF の結合領域を対象としてクロマチン免疫沈降を行い、9530026P05Rik 恒常発現株ではプロモーターのポジティブマークである H3K27 のアセチル化のレベルが同領域で低下していることを明らかにした。このために、9530026P05Rik 恒常発現株では *Osterix* 遺伝子の転写が抑制されていると推測された。
11. 一方で、同領域に対する CCAR2 や HDAC1 のリクルートメントには大きな差は認められなかったことと、9530026P05Rik 恒常発現株では HDAC 阻害薬の作用が減弱していたという結果からは、Wnt/ β カテニン経路の促進因子である CCAR2 が HDAC1 を阻害する作用が 9530026P05Rik 恒常発現株で減弱している理由は蛋白質の量的な問題というよりはむしろ、9530026P05Rik が過剰に存在することによる機能障害が原因と推測された。

以上、本論文は近年重要性が増しているにも関わらず長鎖ノンコーディング RNA の報告がなかった骨細胞に着目し、骨細胞由来の長鎖ノンコーディング RNA である 9530026P05Rik がエピジェネティックな作用を介して骨芽細胞から骨細胞への分化に重要な *Osterix* 遺伝子の発現を制御することを明らかにした。骨細胞の長鎖ノンコーディング RNA が骨粗鬆症をはじめとした高齢化とともに増加の一途にある骨代謝疾患の新たな治療標的になる可能性を提示した重要な知見であり、学位の授与に値するものと考えられる。