

(第3号様式)

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 柳原 裕太

論 文 名 *Zscan10* はハプトグロビンの転写を介して破骨細胞分化を負に制御する

---

### 学位論文要旨

我々は、ゲノムワイドなクロマチン構造変換情報解析から、破骨細胞分化における新規転写因子として Zinc finger and SCAN domain containing 10 (*Zscan10*) を同定してきた (Inoue K et al. JBMR 2014)。*Zscan10* は多能性幹細胞の未分化性やゲノム安定性の維持に関与することが報告されているものの、その分子機能には未だ議論の余地がある。また他の細胞種における役割については大部分が不明である。本研究では、*Zscan10* による破骨細胞分化制御機構の解明を目的とし、CRISPR/Cas9 により *Zscan10* をノックアウトしたマクロファージ様細胞株である RAW264 細胞 (KO 細胞) を樹立し、その機能について解析した。コントロール細胞 (Ctrl 細胞) および KO 細胞に対し、RANKL 刺激による分化誘導前後の経時的な破骨細胞分化マーカー及び分化抑制因子の mRNA 発現量を RT-qPCR により測定した。また、成熟した破骨細胞において、その大きさ、数および TRAP 活性を測定した。その結果、Ctrl 細胞と比較して KO 細胞では破骨細胞分化マーカーの mRNA 発現量、破骨細胞の大きさと数、TRAP 活性は顕著に増加していた。さらに、分化抑制に関与する因子の mRNA 発現量は RANKL による分化誘導前から変動していた。以上の結果から、*Zscan10* は破骨細胞分化を負に制御することが示唆された。また、分化誘導前から分化抑制因子の減少が認められたことから、KO 細胞では分化誘導前の遺伝子発現プロファイルの変化が破骨細胞分化促進に寄与しているのではないかと考えられた。そこで、RNA-seq により分化誘導前の RAW 細胞における網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、Ctrl 細胞と比較して KO 細胞では 173 遺伝子の発現量が 1/2 以下に減少、87 遺伝子の発現量が 2 倍以上に増加していた。これらの遺伝子群の Gene ontology 解析を実施した結果、減少した遺伝子群は B 細胞と脾臓に発現が多いこと、免疫系システムに関与していることが明

らかとなった。破骨細胞は免疫系の細胞である単球/マクロファージから分化することが知られており、減少遺伝子群が破骨細胞分化に深く関与していると考えられた。

そこで発現が減少した遺伝子群が、転写因子である *Zscan10* により直接制御されるのか検索するため、RNA-seq データに加え、*Zscan10* 結合塩基配列モチーフのゲノムワイド情報および RAW264 細胞のクロマチン構造変換を解析した DNase-seq データを組み合わせ、統合的なゲノムワイド解析を行った。その結果、*Zscan10* の KO により遺伝子発現が低下し、遺伝子座近傍ゲノム領域に結合モチーフ及びクロマチン構造変換を伴う遺伝子として *Haptoglobin* (*Hp*) を同定した。実際に *Zscan10* が *Hp* の遺伝子座近傍に結合しているのか確認するために ChIP-qPCR を行った結果、*Zscan10* は *Hp* 遺伝子座の 3' 末端以遠と転写開始点に結合することが明らかとなった。以上の結果から、*Zscan10* は *Hp* の転写を活性化させることで、破骨細胞分化を負に制御している可能性が示唆された。

*Hp* は主に肝臓で産生され、血中の酸化ストレスの原因となる遊離ヘモグロビンと結合し、マクロファージに取り込まれることで、酸化ストレスから生体を保護する重要な役割を担っている。また、*Hp* は破骨細胞を活性化させることが報告されている。一方で *Hp* KO マウスは骨量の減少と破骨細胞数の増加を示し、破骨細胞分化の抑制に関与していることが報告されている。このように破骨細胞における *Hp* の役割は依然として議論の余地がある。そこで、*Hp* が破骨細胞分化に及ぼす影響を確認するため、KO 細胞および骨髄細胞由来初代培養破骨細胞にリコンビナント *Hp* を添加し解析した。その結果、破骨細胞の大きさ、数、TRAP 活性及び分化マーカーの mRNA 発現量がすべて抑制された。さらに、*Hp* が低値を示す溶結性貧血の患者では、骨量の減少を引き起こすことが報告されていることから、*in vivo* においても *Hp* が骨代謝に対し保護的作用を示すことが示唆された。

本研究の結果および過去の報告から、*Zscan10* は *Hp* の転写を直接的に制御することで、破骨細胞分化を負に制御していることが、*Zscan10* KO 細胞における分化促進の一因であることが明らかとなった。また、本研究において *Hp* が破骨細胞分化を負に調節し、骨代謝への保護効果があることが明らかとなった。

【本研究における倫理委員会の承認】

本研究は愛媛大学医学部遺伝子組換え実験委員会及び愛媛大学動物実験委員会の承認を得ている。

キーワード (3~5)	<i>Zscan10</i> ハプトグロビン 破骨細胞分化 破骨細胞 転写因子
-------------	---