

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	柳原 裕太
審査委員	主査 小林 直人 副査 三浦 裕正 副査 羽藤 高明 副査 原口 竜摩 副査 下川 哲哉

### 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

### 審査結果の要旨

【研究の背景】超高齢社会において QOL を改善して健康寿命を引き上げるために、骨粗鬆症の予防や治療は必須である。申請者らの研究室では、骨代謝のバランスを調節する機構を明らかにするため、破骨細胞の分化をエピジェネティックに制御する因子を探索し、その過程で新規転写因子として *Zinc finger and SCAN domain containing 10* (*Zscan10*) を同定した。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、マクロファージ様細胞株である RAW264 細胞を用いて CRISPR/Cas9 により *Zscan10* をノックアウトしたクローン (KO 細胞) を樹立し、その機能について解析した。さらに網羅的遺伝子発現解析により、*Zscan10* が転写を制御する遺伝子として *Haptoglobin* (*Hp*) を同定した。

【結果と考察】対照群と比較して 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 活性が顕著に増加していた。分化抑制に関与する因子の mRNA 発現量は RANKL による分化誘導の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。次に、*Zscan10* によって制御される遺伝子を同定するため、分化誘導前の RAW 細胞における 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

せて、統合的なゲノムワイド解析を行った。その結果、Zscan10 遺伝子のノックアウトにより発現が低下し、遺伝子座近傍ゲノム領域に結合モチーフおよ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。今回作成した 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* を添加したところ、破骨細胞の大きさと数、TRAP 活性および分化マーカーの mRNA 発現量が全て抑制された。

【結論】本研究の結果および既報から、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、*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。

#### 【審査結果】

公開審査会は、平成 30 年 12 月 28 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した。審査員からは、緻密にデザインされた研究でありプレゼンテーションも明解で分かりやすいというコメントの後、本研究に関する以下の質問がなされた。

- ・同じ研究室の先行研究では破骨細胞の分化を正に制御する報告もあり今回のデータとは異なるが、その違いは何に由来すると考えられるか。
- ・Zscan10 のそれぞれのドメインの機能について、相互作用するタンパクについて。
- ・*Hp* と骨代謝との関係について先行研究はあったか、溶血性貧血の患者での骨量減少の機序についてこれまでどのように説明されていたのか。
- ・ヒトの *Hp* 欠損症はかなり頻度が高いことが報告されているが、異常遺伝子がヘテロで *Hp* 濃度が低下した場合に骨代謝異常が生じると考えるか。
- ・Zscan10 をノックアウトしたマウスのフェノタイプ、特に骨量や *Hp* の血中濃度は。
- ・ゲノム編集の効率は標準的か。本研究で使用された 2 つのクローンを選択した理由は、使用されなかったクローンはあるか。クローン間でフェノタイプが異なる理由をどう考えるか。
- ・使用したリコンビナント *Hp* はヒト由来のものか、使用した細胞はマウス由来だがヒト由来の *Hp* が有効だったのはなぜか。*Hp* のタイプによる有効性の違いについてどう考えるか。
- ・Zscan10 の下流にある候補遺伝子が絞られてゆく解析過程の詳細、その過程で本研究では扱わなかった興味深い遺伝子があったか。
- ・申請者が所属する研究室でのテーマは破骨細胞のエピジェネティックな分化制御機構だが、その中で本研究が明らかにしたことはどのように位置付けられると考えるか。
- ・今後 *in vivo* での研究が必要と思われるが、ノックアウトマウス等を用いた計画があるか。
- ・Zscan10 や *Hp* による骨代謝保護効果の臨床的意義、特に治療薬への応用について。抗 RANKL 抗体と比較して効果はどのように期待されるか。

研究のデザインと具体的な方法、本研究の臨床的な背景や成果の臨床応用の可能性などに関する質問に対して、申請者は自らの研究の限界も踏まえて適切に回答した。

また、審査会場において申請者のラボノートを閲覧し、丁寧かつ適切に記載されていることを確認した。

以上、審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。