

## 学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏名 柳原 裕太

学位論文名 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

---

### 学位論文の要約

骨の恒常性は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスによって保たれている。このバランスの破綻は様々な骨疾患を引き起こす。骨疾患の1つである骨粗鬆症は、主に骨吸収が骨形成を大きく上回ることにより生じることから、破骨細胞の機能、分化や寿命を制御することが、治療法開発につながってきた。これまで破骨細胞について多くの知見があるものの、更なる新規治療法開発には新たな治療標的分子の発見が必須である。そこで、我々は、新規治療標的の探索を目的として、破骨細胞分化過程におけるクロマチンリモデリングに注目して研究を行ってきた。その結果、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、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、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 活性が増加しており、破骨細胞分化が顕著に促進されていた。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、減少遺伝子群には免疫システムに関連する遺伝子が含まれていた。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ことが示唆された。そこで減少遺伝子群の中から Zscan10 により転写が制御されている遺伝子を検索するために、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 の欠損により遺伝子発現が低下し、遺伝子座近傍ゲノム領域に Zscan10 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、リコンビナント *Hp* で処理した KO 細胞および骨髄細胞由来初代培養破骨細胞を解析した。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、*Hp* は破骨細胞分化を負に制御することが明らかとなった。

本研究の結果から Zscan10 は *Hp* の転写制御を介して、破骨細胞分化を負に制御していることが明らかとなった。

また、*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、生体においても *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。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文 : Yanagihara Y, Inoue K, Saeki N, Sawada Y, Yoshida S, Lee JW, Iimura T, Imai Y: Zscan10 suppresses osteoclast differentiation by regulating expression of *Haptoglobin*. *Bone*, 2019 DOI: 10.1016/j.bone.2019.02.011.