HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	破骨細胞の機能とRNA結合タンパクHuRの関連［全文の要約］
Author(s)	伊藤, 啓介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13490号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74111
Type	doctoral thesis
File Information	Keisuke_Ito_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

破骨細胞の機能と RNA 結合タンパク HuR との関連

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　伊藤　啓介

破骨細胞は骨組織で骨吸収を担う細胞で，骨芽細胞と共に骨のリモデリングやモデリングの主役を果たす多核巨細胞である．破骨細胞は造血幹細胞由来の単球・マクロファージ系の前駆細胞が骨芽細胞から分泌されるサイトカイン等の働きにより分化することにより形成される．核数は 2〜10 数個と変化に富み，その形態と大きさは極めて多様である．破骨細胞の異常は骨病変の発症と密接に関連しており，骨吸収能の異常を原因とする疾患や病変が多数存在する．骨吸収抑制が原因で発症する大理石骨病，逆に骨吸収の過剰亢進が主因の骨 Paget 病，骨粗鬆症，歯周病や関節リウマチにおける炎症性骨破壊等がその代表例である．

単球マクロファージ前駆細胞はその表面に RANK (Receptor Activator NF- kβ) を発現しており，骨芽細胞表面に発現している RANKL (Receptor Activator NF-kβ Ligand)が結合する事で分化シグナルが伝達されて破骨細胞前駆細胞に分化し、破骨前駆細胞同士で融合を繰り返しながら多核の破骨細胞に分化して骨吸収を行う．その過程で AP-1 (FOS+JUN), NF-kβ, Mitf, NFATc1 などの転写因子が活性化され破骨細胞の分化や骨吸収に必要な遺伝子が転写される．これらの転写因子やタンパクをコードする mRNA の中に AU-Rich Elements (ARE) と呼ばれる RNA エレメントを持つものが多数存在することを我々は見出した．

ARE とは mRNA の 3’非翻訳領域に存在するアデニンとウラシルを多く含む領域で，がん原遺伝子やサイトカイン等，細胞の増殖や分化に関わる遺伝子から転写される mRNA に多く存在している．その役割は転写後調節であり, ARE は mRNA の分解シグナルとして働いている．通常 ARE-mRNA は転写後すぐに分解されるが，細胞に分化シグナルや何らかのストレスが加わった時に一時的に核外輸送され，安定化される．

ARE-mRNA の分解や安定化の制御には, ARE に結合する RNA 結合タンパクが重要な役割を果たすことが知られている. TTP や AUF などのタンパクは, ARE に結合すると ARE-mRNA の分解を促進する．一方, HuR は ARE に結合すると mRNA を核外へ移動させ, ARE-mRNA を安定化させる．従って, HuR の細胞質局在はその細胞における ARE-mRNA の安定化を示す証拠となる．がん細胞や分化中の筋芽細胞など，細胞分裂が活発な細胞や，分化途中の細胞では HuR の細胞質局在が認められる事が知られており，これらの生命現象と ARE-mRNA が関連することがわかっている．しかしながら，破骨細胞と HuR との関連についてはこれまで報告がない．

本研究では，破骨細胞の HuR の局在を調べ，骨吸収に関わる因子との関連を調べることにより，破骨細胞の HuR 局在が骨分解能とどのように関わるかを解明することを目的とした．

7 週齢オスのラットの頸骨を材料として，破骨細胞における HuR の細胞質局

在を免疫染色で検討した．また、顎骨各部位における破骨細胞の HuR の細胞質局在を解析し，骨吸収の活性度と HuR 細胞質局在との関連を検討し、さらに、骨吸収に関わるハウシップ窩やカテプシン K の発現と HuR との関わりも検討した．

対象は 7 週齢および 30 週齢のラット (オス)，脛骨の近位端とした．EDTA-2Na10%溶液に 3 週間浸漬させて標本を脱灰し，通法に従ってパラフィン包埋標本を作製した．作製したパラフィン包埋標本は薄切して厚さ 4.5μm の連続切片として，それぞれ必要に応じて HE および TRAP 染色, HuR およびカテプシン K に対する免疫組織染色を行い, TRAP 染色陽性を示した破骨細胞の HuR およびカテプシン K 発現を観察した．

約 70%の破骨細胞で HuR の細胞質局在が認められた．次に 7 週齢のラット脛骨骨端を関節軟骨下，骨端板上端，海綿骨，骨膜下の 4 か所に区分けし，それぞれの領域における HuR の細胞質局在を調べた．その結果，関節軟骨下および骨端板上端，海綿骨では HuR の細胞質局在を示す破骨細胞の割合が 70%から 90%以上に達したのに対して，骨膜下では 18.6%と低い値を示した．関節軟骨下および骨端線上端，海綿骨は骨吸収活性が高い部位である事から，これらの結果は，HuR が破骨細胞の骨吸収に関わっている事を示していると考えられた．一方で骨膜下では HuR の細胞質局在を示す破骨細胞の割合が低かったが，これは観察範囲内に骨吸収活性が高い部位と骨吸収活性が低い部位が混在しているためと考えられた．

次に HuR が破骨細胞の持つ骨吸収活性のどの過程に関わっているか検討した．骨はヒドロキシアパタイトとI型コラーゲンに代表されるタンパク質から構成される．ヒドロキシアパタイトを分解するために必要な酸の生成および分泌，アクチンリングの形成とそれに伴う外部環境からの遮断によるハウシップ窩内の酸性状態の維持に関する評価は，ハウシップ窩と HuR の細胞質局在との関連を観察する事で行った．観察範囲は骨膜下とし、ハウシップ窩は破骨細胞下の骨面の陥凹をハウシップ窩とみなした．ハウシップ窩の有無の判定は連続切片 4 枚のうち最低 1 枚に陥凹を認められれば「ハウシップ窩あり」と判定した．

その結果, HuR の細胞質局在の有無に関わらず観察した全ての破骨細胞下の骨面にハウシップ窩が認められた．この事は破骨細胞における酸の生成，分泌および酸性環境の維持に関わる因子は HuR による ARE-mRNA の核外輸送および安定化機構と関係が低いことを示している．

一方, I型コラーゲン分解と HuR との関連を検討するために，破骨細胞でのカテプシン K の発現の強弱と, HuR の細胞質局在との関連を調べた．観察範囲は前述の関節軟骨下，骨端板上端，海綿骨，骨膜下の 4 か所全てとした．その結果，HuR の細胞質局在を認めた破骨細胞のほぼ全ての細胞で，カテプシン K の強く

発現する事が確認された．従って，カテプシン K 発現の強弱には HuR の細胞質局在が強く関わっていることがわかった．カテプシン K の mRNA が転写されるためには，AP-1 (FOS+JUN), NF-kβ などの複数の転写因子が必要とされるが，それらの転写因子の多くは ARE-mRNA によってコードされている．これらの事実から，破骨細胞での HuR の細胞質局在による ARE-mRNA の核外輸送および安定化機構は，カテプシン K の発現を介して骨吸収に関わっていることが予想できる．

本研究により，破骨細胞の HuR の細胞質局在は，カテプシン K などの分子の発現の活性化して介して，骨吸収に関わることが初めて明らかになった．