



Title	破骨細胞の分化とRNA結合タンパクHuRとの関連 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	養田, 稔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13880号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78648
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Minoru_Yohda_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 養 田 稔

学 位 論 文 題 名

破骨細胞の分化と RNA 結合タンパク HuR との関連

キーワード(5 つ) 破骨細胞, HuR, ARE-mRNA, RAW264. 7, CMLD-2

破骨細胞は生体内で骨吸収を行う唯一の多核巨細胞で、骨髄由来の単球・マクロファージ系の前駆細胞に由来し、外部からの様々な刺激により破骨細胞へと分化する。破骨細胞前駆細胞はその表面に RANK を発現しており、骨芽細胞表面に発現する RANKL が結合することで分化シグナルが伝達される。分化の過程では、様々な転写因子が重要な役割を果たし、分化後骨表面に接着し、融合しながら成熟破骨細胞へと成長する。しかし、破骨細胞分化の分子メカニズムについてはまだ完全には不明である。その分化メカニズムを解明することは、破骨細胞に関連する様々な疾患の治療につながる。破骨細胞の転写因子や様々な分化関連因子のタンパクをコードする mRNA には AU-Rich Element (ARE) と呼ばれる RNA エLEMENTをもつものが多い。

ARE は, mRNA の分解シグナルで, ARE-mRNA は通常転写後すぐに分解されるが, ARE に RNA 結合タンパク HuR が結合すると, ARE-mRNA は核外輸送され安定化される. 従って, HuR の細胞内での局在は ARE-mRNA の安定化を予想でき, HuR が細胞質に局在している細胞では ARE-mRNA が安定化されていると考えられる. 細胞にストレスなどの刺激が加わると, ARE-mRNA は一時的に核外輸送・安定化されるが, HuR により恒常的に安定化されると, 細胞の老化や様々な疾患に関与することが知られている. また, ARE-mRNA は細胞の分化にも関与することが報告されており, 例えば, 分化中の骨格筋細胞では HuR が細胞質に局在し, ARE-mRNA が安定化されている.

そこで本研究では, 破骨細胞の分化に HuR がどのように関わるかを明らかにすることを目的とした.

ラットの脛骨から連続切片を作成し, TRAP 染色, HuR の免疫組織染色を行ったところ, 破骨細胞における HuR の細胞質局在を認めた. HuR 局在を検討するため, 破骨細胞前駆細胞として RAW264.7 細胞を使用し, RANKL で分化誘導を行い, TRAP 染色および HuR の免疫細胞染色を行ったところ, RAW264.7 細胞より分化した破骨細胞でも HuR の細胞質局在が認められた. 次に HuR が破骨細胞の分化に関わっているかを検討するため, RAW264.7 細胞に熱ショックによる HuR の分解を促し, RANKL による破骨細胞への分化を検討したところ,

RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化が抑制された。熱ショックの HuR の分解以外の作用を否定するために、HuR 阻害剤 (CMLD-2) を用いて破骨細胞へ分化を検討したところ、CMLD-2 で HuR を阻害しても、CMLD-2 の濃度依存的に破骨細胞への分化が抑制され、さらに分化した破骨細胞で形成される Actin ring の形成も抑制された。また、破骨細胞の機能と HuR の関連を検討するため、デンチンスライスを用いて Pit (吸収窩) 数を計測することにより、骨吸収能を検討したところ、CMLD-2 で HuR 阻害した系では Pit 数が減少し、骨細胞の骨吸収能が低下した。破骨細胞のアポトーシスと HuR の関連を検討するため、Capase-3 と HuR の免疫染色を行い、アポトーシスを起こしている破骨細胞と HuR の局在との関連を検討したところ、アポトーシスをおこしている破骨細胞では核に局在する HuR の減少を認めた。

破骨細胞で HuR の細胞質局在を認めたことは、破骨細胞の分化に HuR を介した ARE-mRNA の核外輸送・安定化が関与することを示している。また、HuR 阻害すると Actin ring の形成や骨吸収能が抑制されたことは、HuR が破骨細胞の分化だけではなく、細胞骨格形成や細胞接着にも関連することを示している。また、アポトーシスを起こしている破骨細胞では、核に局在する HuR の低下を認めたことにより、分化からアポトーシスまでの破骨細胞の一生に HuR が寄与

していることが示された。これらの結果より、HuR が破骨細胞分化のマーカーとして利用できる可能性が示された。

本研究より、HuR が破骨細胞の分化に重要な役割を果たすことが明らかになり、破骨細胞の分化の始まりからアポトーシスまで、HuR が関与することが明らかになった。