



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 養田 稔

審 査 担 当 者	主査	教授	樋 田 京 子
	副査	教授	網 塚 憲 生
	副査	教授	田 村 正 人
	副査	准教授	東 野 史 裕

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

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われた。その内容を以下に記す。

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。しかしながら、破骨細胞の分化機構については不明な部分も多く、その分子メカニズムを理解することは、破骨細胞に関連する様々な疾患の治療につながる可能性がある。

破骨細胞の分化に関わる転写因子などのタンパクをコードするmRNAにはAU-Rich Element (ARE) と呼ばれるRNAエレメントをもつものが多い。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。一方、HuRにより恒常的に安定化されると、がん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、myoglobin mRNAなどの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。

ラットの脛骨連続切片を用いたTRAP染色, HuR免疫組織染色により, 破骨細胞におけるHuRの細胞質局在を認めた. さらに破骨細胞前駆細胞としてRAW264.7細胞を使用し, RANKLにより破骨細胞への分化誘導を行うとHuRが細胞質に局在することが示された. 次にHuRが破骨細胞分化への関与を検討するため, RAW264.7細胞に熱ショックによりHuRを分解すると, RANKLによるRAW264.7細胞の破骨細胞への分化が抑制された. さらにHuR阻害剤 (CMLD-2) によっても濃度依存的に破骨細胞への分化が抑制されることが示された. 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, 破骨細胞の骨吸収能の低下が示唆された. 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の免疫染色を行うと, 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.

本研究により, HuRを介したARE-mRNAの核外輸送・安定化が破骨細胞の分化, 破骨細胞の機能にも関与することことが示された. また, 分化からアポトーシスまでの破骨細胞の一生にHuRによるmRANの安定化が関与している可能性が示され, HuRが破骨細胞の分化マーカーの一つになりうる可能性が示唆された.

審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた. 以下にその項目を記す.

- (1) CMLD-2はどのような薬か?
- (2) アポトーシス時の核内HuRの減少は核が消失していることによるものではないのか?
- (3) Heat shockでHuR以外にユビキチン化するタンパク質はあるのか?
- (4) 破骨細胞以外の細胞でも同様の現象は起きているのか?
- (5) 破骨細胞前駆細胞においてHuRは核に存在するのか?
- (6) 筋細胞以外に分化時にHuRの核外輸送の報告はあるのか?
- (7) HuRを分化促進に使えるのか?

本研究の結果は, 破骨細胞研究において重要な基礎科学的情報を提供しており, また, 学術的にも高く評価されると考えられた. 加えて, 上記の質疑応答から, 申請者は本研究内容を中心とした専門分野はもとより, 関連分野について十分な理解と知識を有していることが確認された.

以上のことから, 審査担当者全員は学位申請者が博士 (歯学) の学位を授与するに値するものと認めた.