



Title	RNA-sequencing を用いた骨細胞におけるメカニカルストレス応答機構の解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	藤田, 尚正
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15026号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85660
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Naomasa_Fujita_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 藤田 尚正

学位論文題名

RNA-seqを用いた骨細胞におけるメカニカルストレス応答機構の解析

キーワード（5つ） 骨細胞, 低出力超音波パルス, 運動負荷, RNA-seq, CCN1

生体は、生体内外において常に生化学的および物理的・力学的なさまざまな作用・ストレスを受け、細胞・組織はこれらの作用に対して応答し、生理機能を調節させ恒常性を維持している。これらのストレスの中で、メカニカルストレスは生体の組織・細胞に負荷される物理的・力学的な刺激である。骨組織においてメカニカルストレスは、骨のリモデリングを制御し骨量の維持に寄与することが知られている。また、身体運動時には、骨に対して力学的な負荷がかかり骨細胞にメカニカルストレスが付加されると考えられる。しかし、骨細胞におけるメカニカルストレスの詳細な分子応答メカニズムについては明らかではない。超音波刺激はメカニカルストレスの一つであり、低出力超音波パルス（LIPUS）は骨折治癒を促進するために臨床的に利用されてきた。これまでの研究から、骨細胞様細胞（MLO-Y4細胞）、メダカおよびゼブラフィッシュを用いた研究により、LIPUS刺激が骨細胞に作用し転写因子を制御することで骨折治癒を促進することが報告されている。本研究では、LIPUS刺激を加えたマウス骨細胞および運動刺激を加えたマウス大腿骨を用いてRNA-seq解析を行い、哺乳類の骨細胞におけるメカニカルストレス応答遺伝子を抽出することを目的とした。

MLO-Y4細胞を培養しLIPUSで1.5 MHz, 30 mW/cm²で20分間照射した。30分間のインキュベーション後、これらの細胞からtotal RNAを抽出した。これらを用いてRNAシーケン斯拉イブラリーを作成し、次世代シーケンサーHiSeq 2500 (Illumina社)を用いRNA-seqを行った。6週齢のC57BL/6Jマウスを通常のゲージ内で飼育した群とホイールケージを用いた走行運動を行わせた群とし6週間飼育した。これらのマウス大腿骨からtotal RNAを抽出したのち、同様にNovaSeq 6000を用いRNA-seqを行った。各RNA-seqの結果より算出された発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes; DEGs) について、Rを使いスクアッタープロットとボルケーノプロットによる可視化を行った。また、

MLO-Y4細胞のLIPUS刺激によるDEGsとマウスの運動刺激によるDEGsについてDAVID v6.8のFunctional Annotation Toolを用いて遺伝子アノテーションのエンリッチメント解析を行い機能的クラスタリングを行った。

LIPUS刺激および運動刺激で得られたDEGsはそれぞれ179個、146個であった。これらのクラスタリングを行ったところ、LIPUS刺激では「Defense response to virus」, 「proteinaceous extracellular matrix」, 「cellular response to interferon」, 運動刺激では「extracellular region」, 「proteinaceous extracellular matrix」, 「Thyroglobulin type-1」が上位であった。両者に共通する機能クラスターとして「proteinaceous extracellular matrix」, 「extracellular region」, 「insulin-like growth factor binding protein」が抽出された。また、LIPUS刺激したMLO-Y4細胞と運動負荷を加えたマウス大腿骨で共通するDEGsは、*Pim1*, *Ccn1*, *Fmod*, *Fabp4*の4つの遺伝子であり、これらが骨細胞においてメカニカルストレスに応答する際にキーとなる有力な候補遺伝子と考えられた。また、これらのうちLIPUS刺激および運動刺激で挙動が一致した遺伝子は*Ccn1*のみであった。

CCN1は細胞外分泌タンパク質であり、CCN1は増殖因子、サイトカイン、低酸素ストレスなどによって産生が誘導される分泌性タンパク質であり、様々な組織で細胞の増殖、分化、生存（アポトーシス）に関与するなど多様な機能を有していることが知られている。メカニカルストレスに応答した骨細胞がCCN1を分泌することで骨細胞の増殖、分化、生存（アポトーシス）を制御する可能性が考えられた。また、CCN1はSclerostinの産生を介して、骨芽細胞や骨細胞における古典的Wntシグナルを活性化し骨形成を制御し骨量を調節する機構が考えられている。CCN1は骨細胞においてメカニカルストレス応答によって産生が誘導され、Sclerostinを介し骨形成を調節することにより骨のリモデリングや骨量の維持に関与している可能性が考えられた。

本研究より、骨細胞におけるメカニカルストレス応答遺伝子が明らかになった。また、骨細胞がCCN1を産生することで骨のリモデリングや骨量の維持に関与している可能性があるという新たな知見が得られた。本研究で得られた骨細胞のメカニカルストレス応答遺伝子の解明は、骨リモデリングの理解を深めるとともに、運動器医療において重要な基礎的知見となり得ると考えられた。