



Title	Roles of Enhancer RNAs in RANKL-induced Osteoclast Differentiation Identified by Genome-wide Cap-analysis of Gene Expression using CRISPR/Cas9
Author(s)	阪口, 友香子
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/70722
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"> 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 阪口 友香子

	(職)	氏名
論文審査担当者	主査	大阪大学教授 石井 優
	副査	大阪大学教授 熊御 淳
	副査	大阪大学教授 竹田 潔

論文審査の結果の要旨

近年、様々な細胞分化に関わる遺伝子がゲノム領域で双方向性に発現するエンハンサーRNA (eRNA)によって制御されていることが明らかにされているが、破骨細胞においてはeRNAの存在や機能についての報告例はない。

本研究は破骨細胞分化に伴い誘導されるeRNAの探索を行い、破骨細胞制御における役割を明らかにすることを目的とした。破骨細胞分化前後の細胞のRNAを調整し、Cap Analysis of Gene Expression (CAGE) 法で転写開始点を網羅的に解析し、eRNA候補を同定した。破骨細胞制御の報告があるNrp2、Dcstamp及びNfatc1遺伝子のeRNA領域をRAW 264.7細胞においてCRISPR/Cas9システムで欠損した。eRNAの発現が低下し、それぞれの遺伝子の発現量も大きく低下し、破骨細胞分化が抑制された。本研究によりeRNAが破骨細胞の分化において重要な役割を担うことが示された。

本論文は骨関連疾患の病態生理の解明に寄与する成果であり、学位に値するものと認める。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏名 Name	阪口 友香子
論文題名 Title	Roles of Enhancer RNAs in RANKL-induced Osteoclast Differentiation Identified by Genome-wide Cap-analysis of Gene Expression using CRISPR/Cas9 (RANKLによる破骨細胞の分化誘導におけるエンハンサーRNAの同定と役割の解析)
論文内容の要旨	
<p>〔目的〕</p> <p>骨髄由来の単球-マクロファージ系の前駆細胞が破骨細胞に分化する過程でmacrophage-colony-stimulating factor (M-CSF)とreceptor activator of NF-κB ligand (RANKL)の刺激によって、NF-κB, c-Fos, JunD, Nfatc1などが重要な役割を持つことが報告されている。</p> <p>また近年、様々な細胞分化に関わる遺伝子がゲノム領域で双方向性に発現するエンハンサーRNA (eRNA)によって制御されていることが明らかにされているが、破骨細胞においてはeRNAの存在や機能に関しての報告例はない。本研究は破骨細胞分化の過程で誘導されるeRNAの探索を行い、破骨細胞制御におけるeRNAの役割を明らかにすることを目的とした。</p> <p>〔方法ならびに成績〕</p> <p>マウスの骨髄細胞をBRANKLで刺激して48時間培養する実験系でRNAを抽出し、HayashizakiらによるCAGE法を用いたライブラリーを構築した。データの精度を高めるためRANKL (+) 群、(-) 群をそれぞれ4サンプルずつ準備した。CAGE tagをmouse genome (mm10) web siteでマップし、2,948,135の(transcription start site (TSS))を同定した。それぞれのグループ内の相関関係は(0.98-1.00)と高く、RANKL刺激(+)と(-)の間には相関関係(0.90-0.96)と違いが見られ、非常に精度の高いデータが得られた。これらのTSSについて、タンパクコード領域上流のプロモーターよりもさらに上流に位置し、双方向性の発現をするeRNA領域を検索した。双方向発現TSSの間が300 bp以上で、RANKL刺激で10倍以上転写産物が増加する領域として87領域を特定し、さらに対象となるmRNAのコードするタンパクが破骨細胞と関連すると報告がある遺伝子として14遺伝子に絞りこんだ。それらに関して理化学研究所のFANTOM5データベースで解析した結果、Nrp2, Dcstamp, Nfatc1を主に解析の対象として選択した。</p> <p>次に、破骨細胞分化モデルとしてRAW 264.7細胞を<i>in vitro</i>でRANKL (+) 群、(-) 群のRNAを抽出し、双方向性eRNAとタンパクをコードする領域のRNAの発現を調べたところ、これらは全てCAGEデータと同様に変動するeRNA領域であることが確認された。着目したNrp2, Dcstamp, Nfatc1遺伝子領域近傍のゲノム上で、CRISPR/Cas9システムによってそれぞれのeRNA領域と考えられる領域内の配列のDNA欠損を誘導した。Nrp2, Dcstamp, Nfatc1それぞれのeRNA領域内のDNAを欠損した細胞株を作製したところ、それぞれのeRNAの発現が減少し、タンパクをコードするRNAも著しく減少した。この結果、Nrp2, Dcstamp, Nfatc1のeRNA領域がそれぞれの分子の発現を制御する重要な役割をしていることが明らかになった。</p> <p>さらに、eRNAによる遺伝子発現制御が破骨細胞分化に関与しているかどうかを調べるため、RAW 264.7細胞の破骨細胞への分化をTartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)染色して調べたところ、上記のNrp2, Dcstamp, Nfatc1のそれぞれのeRNA領域のDNA欠損細胞株では破骨細胞への分化が抑制されていることが確認された。</p> <p>〔総括〕</p> <p>本研究により、破骨細胞が分化する過程においてeRNAが重要な役割を担うことが明らかになった。この結果が骨代謝の制御機構の解明や骨代謝疾患の治療に寄与することが期待される。</p>	