

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24119

研究課題名（和文）長鎖非コードRNA「UCA1」の骨形成における機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of UCA1 long non-coding RNA in bone formation

研究代表者

石川 崇典（Ishikawa, Takanori）

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学歯学系・助教

研究者番号：70845809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト骨髄間葉系細胞を骨芽細胞に分化させる過程での、骨芽細胞マーカー遺伝子とUCA1の発現を評価したところ、骨芽細胞マーカー遺伝子の上昇を認めた一方、UCA1の発現は減少した。また、ヒト骨髄間葉系細胞にUCA1を強制発現し、骨芽細胞へ分化誘導を行い、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を評価すると、ウイルス感染後1週間の時点では、ALP遺伝子発現の増強が見られたが、その効果は時間と共に減少し、感染後3週間ではALP遺伝子発現に対するUCA1強制発現の影響は見られなくなった。以上より、UCA1は骨芽細胞分化時のごく初期段階で分化を促し、その後の分化過程には影響せず遺伝子発現も消退していくことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長鎖非コードRNAはその多くの機能が不明であって、骨格形成に関与する骨芽細胞の、分化や形質維持と当該RNAの関連についての報告はわずかである。本研究では長鎖非コードRNAの1つであるUCA1が、骨芽細胞分化の初期段階で分化に関与する可能性を見出した。この作用メカニズムや、UCA1を持たないマウスなどの別種哺乳類にはない、ヒトの骨格特性への関与の検討はこれからの課題となるが、それを含めて将来的には当該RNAの分子機能やヒトの骨格形成機構の解明に寄与し、延いては骨関連の疾患の治療法開発の一助となる可能性がある

研究成果の概要（英文）：We confirmed the expression of the osteoblastic gene and UCA1 gene in the process of differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts. As a result, osteoblastic gene was induced, but UCA1 gene expression was reduced. In addition, forced expression of UCA1 in human bone marrow mesenchymal stem cells by a lentiviral vector enhanced ALP gene expression at 1 week after the initiation of osteoblastic differentiation. However, the effect on ALP gene expression decreased along with time, and it was no longer observed 3 weeks after the infection. These results indicate that UCA1 promotes differentiation at an early stage of osteoblastic differentiation but may not affect the subsequent differentiation process, while its expression also declines.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：骨芽細胞 lncRNA UCA1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長鎖非コード RNA (lncRNA)は超高解像度タイリングアレイ解析や次世代 RNA シーケンスなどの大規模トランスクリプトーム解析の結果、ヒトにおいて 30,000 種類もの lncRNA が転写され、うち 20,000 種類程度が生命現象に関わっていることがわかっている。その研究は現在がん関連に偏っているが、これら RNA の生理的機能の解明も重要な課題である。

申請者らは、がん関連 lncRNA として注視されてきた urothelial cancer -associated 1 (UCA1) がヒト正常軟骨細胞において発現していることを見出した。さらに、ヒト軟骨肉腫由来軟骨様 HCS-2/8 細胞で UCA1 遺伝子の発現を抑制したところ、驚くべきことに軟骨細胞形質が減弱した。さらにヒト骨肉腫細胞株 SaOs-2 で同様の検討を行ったところ、やはり骨芽細胞形質が抑制された。以上の所見から、ヒト特異的で機能が未知である lncRNA の中には、ヒト固有の骨格が形成されるにあたり機能するものが少なからず存在するのではないかと考え、まず UCA1 を対象にこの仮説の検証に着手した。

2. 研究の目的

タンパク質情報をもたない lncRNA である UCA1 がヒトの骨格形成にどのような機能を果たしているのかを解明することが本研究の目的である。

具体的には特に骨芽細胞に着目し、間葉系幹細胞から骨芽細胞へ分化させた際に UCA1 の発現がどのように変化するか、ヒト骨肉腫細胞株ではなく正常骨芽細胞や間葉系幹細胞においても、がん関連 lncRNA と言われている UCA1 が細胞分化促進的に働くか、マウスなど UCA1 を持たない動物の骨芽細胞に導入した場合にどのような影響がでるのかを明らかにするため研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨格形成細胞分化過程における UCA1 の発現の確認

ヒト骨髄間葉系細胞 (hBMSC) 分化誘導培養系を用いて、hBMSC の骨芽細胞分化過程、そして正常骨芽細胞における UCA1 およびアルカリホスファターゼ (ALP) やオステオポンチン (SPP1/OPN) 骨芽細胞マーカー遺伝子を一週ごとに経時的に定量し、遺伝子発現を比較解析した。また細胞外基質の石灰化の度合いを、アリザリンレッド染色によって評価し、分化が進んでいることを確認した。

ヒト正常骨芽細胞については ENCODE ポータルサイト(<https://www.encodeproject.org>)にて公開されている RNA シークエンシングデータを UCSC ゲノムブラウザで解析し、UCA1 の発現の度合いを確認した。

(2) UCA1 の骨形成における機能・役割の解明

ヒト正常骨芽細胞および BMSC を用いた UCA1 の機能評価

hBMSC に対し、強制発現用レンチウイルスベクターを用いて UCA1 を強制発現しつつ分化誘導培地にて骨芽細胞に分化させ、(1) 同様骨芽細胞マーカー遺伝子の発現変動および、時間を追って分化状況を解析した。

マウス細胞における UCA1 の機能の検証

UCA1 を持たないマウス骨芽細胞様 MC3T-E1 細胞に UCA1 を強制発現し、骨芽細胞マーカーの遺伝子の変動を検証中である。

(3) UCA1 のマウス骨格形成に対する影響力の検証

全身で UCA1 を発現するゲノム編集マウスを CRISPR/Cas9 knock-in システムで作成中である。

得たマウスに対し、骨格成長における表現型の変化を中心に解析し、生物学的影響を検証する。

4. 研究成果

(1) ヒト骨格形成細胞分化過程における UCA1 の発現の概要

hBMSC を骨芽細胞誘導培地にて分化誘導をかけたところ、UCA1 および骨芽細胞マーカー遺伝子の経時的な発現を定量するとともに石灰化を Alizarin Red 染色で確認した。その結果、骨芽細胞マーカー遺伝子である ALP と SPP1(OPN) の発現の上昇と石灰化物の沈着が起こり骨芽細胞への分化は確認された。そして驚いたことに UCA1 の発現は骨芽細胞分化が進むにつれ逆に減少した。ただしこの実験条件では、骨芽細胞後期分化マーカーである OCN の遺伝子発現の誘導までには至っていない。以上の結果は、UCA1 は骨芽細胞への分化過程前半には影響力を持たない、あるいは初期分化段階のみに作用することを暗示している。以上の所見は軟骨細胞分化過程における UCA1 の発現動態と対照的でありきわめて興味深い。

なお ENCODE ポータルサイトにてヒト正常骨芽細胞における UCA1 の発現を分析したところ、図のようにほとんど発現していないことが確認された。これは BMSC を用いて得た上記の結果と符合する。

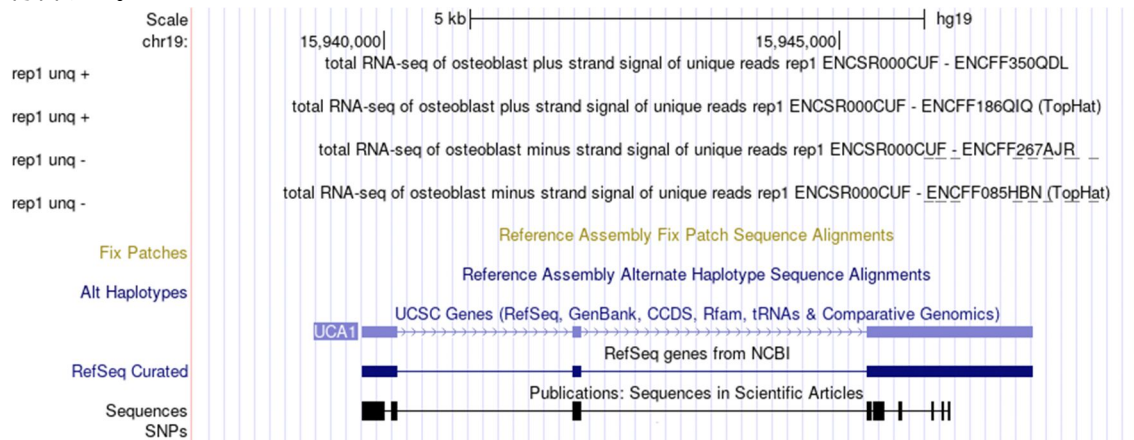


図 ヒト骨芽細胞における UCA1 遺伝子座周辺の RNA 発現状況

(2) UCA1 の骨形成における機能・役割評価の概要

(1) の結果から、軟骨細胞への分化と比較して UCA1 は骨芽細胞の分化では活用されていないことが推察されるが、分化に対する影響力に関する情報は得られない。これを検証するために、hBMSC に UCA1 をレンチウイルスベクターで強制発現した状態で、同様に骨芽細胞へ分化誘導を行い、骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を、何も発現しないレンチウイルスを用いた対照群と比較評価した。その結果、ウイルス感染後 1 週間の時点では、ALP 遺伝子発現の有意な増強が見られたが、その効果は時間と共に減少し、感染後 3 週間ではもはや ALP 遺伝子発現に対する UCA1 強制発現の影響は見られなくなった。なお UCA1 の強制発現は感染後 3 週間後も保たれていることも確認している。以上を総合的に解釈すると、UCA1 は BMSC が骨芽細胞へ分化するごく初期段階で分化を促し、その後の分化過程には影響せず遺伝子発現も消退に導かれるということになる。

(3) マウスおよび同細胞に対する UCA1 の影響の評価の概要

すでに前骨芽細胞の形質を有し、UCA1 をもたないマウスから樹立された MC3T3-E1 細胞を用い、同様に UCA1 を強制発現し、その骨芽細胞後期分化への影響力を現在評価しているところである。UCA1 を強制発現するノックインマウスの作製はいまだ途上にあり、その解析は次段階の研究に引き継ぐことになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kubota S, Ishikawa T, Kawata K, Hattori T, Nishida T	4. 巻 21
2. 論文標題 Retrotransposons manipulating mammalian skeletal development in chondrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21051564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石川崇典、西田崇、大野充昭、宝田剛志、Ha Thi Thu Nguyen, 栗原慎之介、古松毅之、村瀬友里香、滝川正春、大橋俊孝、上岡寛、久保田聡
2. 発表標題 ヒト骨格形成細胞分化におけるurothelial cancer-associated 1(UCA1) 長鎖ノンコーディングRNAの生理的役割
3. 学会等名 第33回 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kubota S, Ishikawa T, Mizukawa T, Kondo S, El-Seoudi A, Nishida T, Hattori T, Kawata K, Furumatsu T, Takarada T, Ono M, Takigawa M
2. 発表標題 Long noncoding RNAs that regulate CCN2
3. 学会等名 The 10th International Workshop of CCN Family of Genes（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤星、桑原実穂、Fu Shanqi, 池田健司、石川崇典、大野充昭、西田崇、久保田聡、服部高子
2. 発表標題 長鎖(約6kb) lssODNおよびCRISPER/Cas9を用いたヒト科霊長類特異的lncRNAのマウス受精卵へのエレクトロポレーションによるノックインの試み
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------