The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	A gene expression profile of the mineralization process of murine osteoblastic cell line, MC3T3-E1
Author(s)	大野, 一幸
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40749
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、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

【81】

氏　　名	大野一幸（おおの いっこう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　13754　号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	A gene expression profile of the mineralization process of murine osteoblastic cell line, MC3T3-E1 （マウス骨芽細胞の cell lineであるMC3T3-E1の石灰化過程における遺伝子発現について）
論文審査委員	（主査） 教　授　越智　隆弘 （副査） 教　授　辻本　賀英　　教　授　高井　義美

論文内容の要旨

【目的】

オートメイション化した sequence system を用いた無作為 cDNA 解析(EST collection)は遺伝子収集の代表的方法として定着している。とくに cDNA libraryを mRNA の構成を忠実に表すように作成し，3末端のみの配列を決定すると（3'-direction cloning），配列情報に加えてそれぞれの配列の出現頻度から各遺伝子の発現頻度を知ることができ(Expression profile)，さらに同様のデータを異なる臓器間で比較することにより(subtraction in silico)，臓器特異的遺伝子を系統的に単離化することができる。またこのデータの解析は，新規遺伝子の同定のみならず，既知の遺伝子の中でも骨芽細胞および骨の石灰化過程における機能が十分解明されていないものの再発見につながり，骨芽細胞の新しい機能をとらえることを可能にすると思われ，これまで以上の骨代謝の理解や骨疾患の原因解明に重要であると考えられる。

【方法】

マウス骨芽細胞の cell line である MC3T3-E1 を，ascorbate および β glycerophosphate の存在下で培養し，10日目（基質合成期）と34日目（石灰化期）に細胞を回収し，RNA を抽出した。分化段階の同定は，Alkaline phosphatase の活性の測定と組織学的に行った。このRNA を用いて，大久保らの方法により3'-directed library を作成した。vector primer を用いて cDNA 合成を行った後，MboI と BamHI で切断し self-ligation をさせた。この操作によりpoly A から上流の最初の MboI site まで（この配列をGene Sigunature:GSと呼ぶ）の平均約250 base pair しか含まなくなり，逆転写酵素の効率や大腸菌への導入の効率の影響を受けないバイアスの少ない library を作成することができた。この library より，無作為に選んだ大量の clone を sequence した。これらの sequence のうち不確実な配列を含むものや極めて短いもの，Alu などの repeat を含むものなどを除いた後，相互に同一の配列を検索した。その後これまでに得られている GS との比較，および，遺伝子の同定のため GenBank のdatabase との比較も行った。

【成績】

基質合成期と石灰化期から，それぞれ1044と4483個の sequence を得ることができ，さらに同一配列の重複を除く

と，721と2039のcluster(GS) となった。これらのGSをGenBankのdatabaseに対して遺伝子の同定を行い，発現頻度順に並べた表(Expression profile)を得ることができた。それぞれの分化段階に発現している遺伝子をこのprofileを用いて比較した。上位に発現している遺伝子は，これまでよく知られている骨の蛋白質の構成要素であり，また骨芽細胞の分化markerである，種々のcollagenやnoncollagen proteinであった。そればかりでなく，これまで骨芽細胞に発現していることが知られていない遺伝子も多く発現されていた。特に転写因子は，これまで脂肪細胞(C／EBP β，chop-10，SREBP-1)や筋細胞(m-twist，smLIM，MEF2A)の分化過程で発現しているものが多く発現されていた。

【総括】

骨芽細胞の石灰化過程における機能解析のため，マウスの骨芽細胞のcell lineであるMC3T3-E1細胞を用いて，EST collectionにより発現遺伝子の検討を行った。骨芽細胞の造骨能を反映して，骨基質蛋白質が発現遺伝子の上位に認められた。これらの既知の遺伝子のみならず，未知の遺伝子とこれまで骨芽細胞に発現していることの知られていない遺伝子の発現も認められた。したがってこのprofileは，石灰化過程における骨芽細胞の発現遺伝子の全体像を捉えることができるものと考えられる。特に脂肪細胞や筋細胞の分化に関わる転写因子の発現は，これらの細胞が骨芽細胞と起源を同じにする以上に，その分化過程で働く因子も共有しているものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

遺伝子収集の代表的方法としてEST(Expression sequence tag) collectionは最近広く認められつつある。特にcDNA libraryをmRNAの構成を忠実に表すように作成すると，配列情報に加えてそれぞれの配列の出現頻度から各遺伝子の発現頻度を知ることができ，さらに同様のデータを異なる臓器間で比較することにより，臓器特異的遺伝子を系統的に単離化することができる。この方法を骨芽細胞の機能解析に応用することで，新規遺伝子の同定のみならず，既知の遺伝子の中でも骨芽細胞および骨の石灰化過程における機能が十分解明されていないものを再発見し，骨芽細胞の新しい機能をとらえることを可能にすると思われ，これまで以上の骨代謝の理解や骨疾患の原因解明に役立つと考えられる。

骨の石灰化のモデルとしてマウス骨芽細胞のcell lineであるMC3T3-E1を使用し，この細胞をascorbateおよびβ glycerophosphateの存在下で培養し，10日目（基質合成期）と34日目（石灰化期）にRNAを抽出した。このRNAを用いて，vector primerを用いて3'-directed libraryを作成し，約9500個のcloneのsequenceを行い，発現遺伝子を解析した。発現遺伝子の上位を占めるものは，骨芽細胞の旺盛な造骨能を反映して，骨基質蛋白であるcollagen typelやosteonectinであり，これまで知られているほぼすべての骨基質蛋白の発現があり，さらに多くの既知及び未知の遺伝子の発現を認めた。特に転写因子に注目すると，これまで脂肪細胞(C／EBP β，chop-10，SREBP-1)や筋細胞(m-twist，smLIM，MEF2A）の分化過程を調節していると考えられているものが，石灰化過程においても発現されていた。また，ヒト骨芽細胞の発現遺伝子の解析において，脂肪細胞の分化を抑制している転写因子であるAEBP1のヒトの遺伝子の塩基配列の同定と，骨芽細胞の分化とともに発現が変化することも示した。これらのことは，骨芽細胞と，脂肪細胞と筋細胞とが起源を同じにする以上に，その分化過程で働く因子も共有しているものと示唆するものであると考えられる。

大量sequenceによる骨芽細胞の発現遺伝子の解析を通じて，骨の石灰化過程において，脂肪細胞や筋細胞の分化を調節している転写因子も共同して働いているという骨芽細胞の新規機能や骨代謝の解明にとって重要な情報を明らかにし，外科系整形外科学の学位に値する研究と認める。