



Title	未分化間葉系細胞から骨芽細胞および脂肪細胞への分化における転写因子C/EBP $\beta$ の役割
Author(s)	波多, 賢二
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43669">https://hdl.handle.net/11094/43669</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	波多賢二
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第16944号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	未分化間葉系細胞から骨芽細胞および脂肪細胞への分化における転写因子C/EBP $\beta$ の役割
論文審査委員	(主査) 教授 米田俊之  (副査) 教授 野首孝嗣 講師 北村正博 講師 和田孝一郎

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

骨形成において中心的役割を担う骨芽細胞の起源である未分化間葉系細胞は、骨芽細胞の他に脂肪細胞、軟骨細胞および筋芽細胞へと分化可能である。骨粗鬆症患者においては、骨量の低下に伴う骨髄脂肪細胞の増加が報告されていることから、骨粗鬆症患者においては何らかの原因により未分化間葉系細胞の分化バランスに異常が生じていると推察される。そのため、未分化間葉系細胞から骨芽細胞および脂肪細胞への分化バランス調節メカニズムの解明は重要であると考えられるが、その制御機構はほとんど不明である。近年、骨芽細胞分化においては転写因子Cbfa1が、脂肪細胞への分化過程においては転写因子C/EBP $\beta$ およびそのアイソフォームLIPが重要であることが明らかにされつつある。C/EBP $\beta$ は骨芽細胞系細胞においても発現されていることが報告されており、C/EBP $\beta$ が骨芽細胞への分化においても、何らかの役割を演じている可能性が推測される。そこで本研究においては、骨芽細胞分化過程におけるC/EBP $\beta$ の役割を明らかにし、さらに未分化間葉系細胞から骨芽細胞および脂肪細胞への分化バランスの制御におけるC/EBP $\beta$ の関与について検討を行った。

#### 【実験方法】

①未分化間葉系細胞の骨芽細胞および脂肪細胞分化の検討 BMP2刺激により骨芽細胞あるいは脂肪細胞へと分化誘導される未分化間葉系細胞株C3H10T1/2細胞を用いて実験を行った。骨芽細胞への分化はアルカリフィオスター(AlP)活性およびオステオカルシン(OC)の発現を、脂肪細胞への分化はオイルレッドO染色を指標に評価した。

②アデノウイルス発現系によるC/EBP $\beta$ 、LIPあるいはCbfa1の強制発現 アデノウイルスベクターにC/EBP $\beta$ 、LIPあるいはCbfa1のcDNAを組み込んだ後、アデノウイルスを作製し、C3H10T1/2細胞へ300M.O.I.にて感染させた。

③C/EBP $\beta$ 及びLIPの転写制御に対する検討 骨芽細胞分化に対してはOCプロモーターを、また脂肪細胞分化についてはPPAR $\gamma$ プロモーターの転写活性を指標に評価した。OCプロモーター領域に対するC/EBP $\beta$ およびLIPの結合は、ビオチン化オリゴ沈降法にて検討した。

#### 【結果】

##### 1. 骨芽細胞分化に対するC/EBP $\beta$ の役割

C3H10T1/2細胞にBMP2を作用させると、骨芽細胞への分化誘導に並行してC/EBP $\beta$ の発現が誘導された。また、

3日齢マウス頭蓋骨より採取した初代成熟骨芽細胞の核内において C/EBP  $\beta$  の発現が確認された。アデノウイルスを用いて、C3H10T1/2細胞に C/EBP  $\beta$  を強制発現させると、オイルレッドO染色陽性の脂肪細胞ならびに ALP 活性陽性骨芽細胞の分化が誘導された。C/EBP  $\beta$  による骨芽細胞分化誘導作用は、他の未分化間葉系細胞株 ST2、C2C12においても確認され、この C/EBP  $\beta$  の作用は BMP2添加あるいは Cbfa1の共発現により増強された。さらに免疫共沈降法の結果、C/EBP  $\beta$  は Cbfa1と物理的に結合することが示された。転写レベルにおいても、C/EBP  $\beta$  の強制発現は、OC のプロモーター活性を促進することが確認され、この作用は、Cbfa1の共発現によりさらに促進された。また、C/EBP  $\beta$  は OC プロモーター領域内の C/EBP 結合配列に特異的に結合することが明らかとなった。

## 2. 骨芽細胞および脂肪細胞分化に対する C/EBP $\beta$ アイソフォーム (LIP) の役割

未分化間葉系細胞の分化過程における LIP の役割を明らかにするために、C3H10T1/2細胞に LIP を強制発現させ、その効果を検討した。その結果 LIP は脂肪細胞への分化を阻害する一方で、骨芽細胞への分化を著明に促進した。また、転写レベルにおいて LIP は、PPAR  $\gamma$  プロモーターの転写活性を抑制する一方で、OC プロモーターに対する Cbfa1の転写活性を促進することが明らかとなった。さらに、LIP は C/EBP  $\beta$  と同様に Cbfa1と結合し、また OC プロモーター領域内の C/EBP 結合配列にも結合することが示された。

## 【結論・考察】

本研究結果により、転写因子 C/EBP  $\beta$  は脂肪細胞分化のみならず骨芽細胞分化をも促進すること、そしてこの効果は Cbfa1と複合体を形成することにより著明に促進されることが明らかとなった。さらに C/EBP  $\beta$  のアイソフォーム LIP が脂肪細胞分化を阻害し、骨芽細胞分化を促進することから、C/EBP  $\beta$  は異なるアイソフォームを使い分けることにより、転写レベルで骨芽細胞あるいは脂肪細胞への分化バランスを制御していると推察される。これらの知見は骨粗鬆症患者に見られる骨量低下と脂肪腫増加のメカニズムの解明、および骨量回復のための治療法の模索において重要な指針となると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、共通の未分化間葉系前駆細胞に由来する脂肪細胞と骨芽細胞の分化制御における転写因子 C/EBP  $\beta$  の役割について分子細胞生物学的検討を行った研究である。その結果、C/EBP  $\beta$  は脂肪細胞分化および骨芽細胞分化のいずれにも密接に関与しており、特にそのアイソフォームである LIP が脂肪細胞分化を抑制し、同時に骨芽細胞分化を促進することが初めて示された。

以上の研究結果は、細胞分化のスイッチ機構を分子レベルで明らかにしたのみならず、骨量減少と脂肪増加を伴う骨粗鬆症の病因解明にも貢献するものであり、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。