

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 β の役割
Author(s)	波多, 賢二
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/43669
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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 β の役割

波多 賢二

大阪大学大学院歯学研究科

歯科臨床系専攻（歯科補綴学第二）

緒 言

骨格の形成および維持は、破骨細胞と骨芽細胞の2種類の起源の異なる細胞によって行われている。このうち、骨芽細胞は未分化間葉系細胞を起源とし、BMP(Bone Morphologic Protein)などの骨形成因子の作用により、分化が誘導される^{1,2)}。未分化間葉系細胞は、骨芽細胞のみならず脂肪細胞、軟骨細胞あるいは筋芽細胞に分化する多分化能を有している^{3,4)}。骨量の低下を示す骨粗鬆症にしばしば認められる病態として骨髄脂肪細胞の増加、いわゆる脂肪髄の亢進が古くから報告されている⁵⁻⁸⁾。さらにヒト海綿骨から分離された初代骨芽細胞が、合成グルココルチコイドホルモンであるデキサメタゾン処理により脂肪細胞へと分化誘導されることも報告されている⁹⁾。これらの知見を考え合わせると、骨粗鬆症においては骨髄中の未分化間葉系細胞の分化バランスが、脂肪細胞への分化に傾き骨芽細胞への分化が抑制され、その結果、骨形成が低下し、骨量が減少している可能性が示唆される。したがって骨粗鬆症の病態の解明あるいは、有効な治療法を開発する一つのアプローチとして、骨芽細胞および脂肪細胞への分化バランスを調節する分子メカニズムを明らかにすることが重要であると考えられる。

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の方向は、各細胞に特異的な転写因子が関与する遺伝子制御プログラムにより調節されていると考えられている^{10,11)}。骨芽細胞の分化過程においては、Runx (Cbfa/PEBP2 α)ファミリーに属する転写因子Cbfa1(Runx2/AML3/ PEBP2 α A)が重要であることが明らかにされている^{12,13)}。Cbfa1は、オステオカルシン、オステオポンチンおよび骨シアロ酸含有たんぱく質(BSP)遺伝子のプロモーター領域に直接結合してその転写活性を制御していること^{12,14)}、さらにCbfa1ノック

クアウトマウスでは全く骨が形成されないことが報告されている¹³⁾。また、ヒトにおいては CBFA1 が鎖骨頭蓋異形成症の原因遺伝子であることも示されている¹⁵⁾。一方、未分化間葉系細胞から脂肪細胞への分化過程においては転写因子 CCAAT/enhancer-binding proteins- β (以下 C/EBP β)、および核内レセプター peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (以下 PPAR γ) が重要であることが示唆されている¹⁶⁻¹⁹⁾。特に分化方向決定時期あるいは分化の初期においては、PPAR γ の発現調節などを介し、C/EBP β が中心的な役割を果たすことが示されている^{17,19)}。C/EBP β はロイシンジッパーファミリーに属する転写因子で、N末端から転写活性化領域、DNA結合領域、及びロイシンジッパー構造からなり、ロイシンジッパーを介してホモ二量体あるいは他の C/EBPファミリーとヘテロ二量体を形成し、脂肪細胞分化に必要な標的遺伝子の発現を調節し、脂肪細胞への分化を誘導する^{17,18)}。また、ノックアウトマウスを用いた解析により、脂肪組織の形成における C/EBP β の重要性が明らかとなっている²⁰⁾。

C/EBP β は1つのエクソンからなる遺伝子で、その構造遺伝子の中に三つの翻訳開始部位を有し、1番目および2番目の開始コドンを使った場合には42KDaもしくは39KDaの転写活性化因子 C/EBP β (LAP)が、3番目の開始コドンを使った場合には20KDaの転写不活性化因子 LIPが発現する²¹⁾。LIPは転写活性化部位を欠失するため、C/EBP β (LAP)に対して拮抗的に作用し、脂肪細胞分化を抑制することが明らかとなっている^{16,22)}。またLIPは、脂肪細胞分化に伴って発現量が減少し、成熟脂肪細胞では発現が認められなくなることから²³⁾、未分化間葉系細胞から脂肪細胞への分化は、C/EBP β のみならずLIPによっても調節されていると考えられている。

最近、脂肪細胞分化誘導因子である PPAR γ および C/EBP β が、骨芽細胞の分化および機能に対して様々な作用を有していることが明らかになっている。Czernik らは PPAR γ の過剰発現がマウス由来初代骨髄細胞の Cbfa1 発現誘導を抑制し、骨芽細胞分化を阻害することを明らかにしている²⁴⁾。マウス頭蓋骨由来の細胞株 MC3T3-E1 などの骨芽細胞系細胞においては、C/EBP β が発現していることが報告されている^{25,26)}。Stein らは、ヒト由来骨芽細胞株 U2-OS 細胞を用いて、C/EBP β とエストロゲンが協調することにより IL-6 の産生を抑制すると報告している²⁵⁾。また Ogasawara らは、マウス頭蓋骨由来細胞株 MC3T3-E1 において、C/EBP β はメカニカルストレスによる COX-2 遺伝子の発現誘導において重要であると報告している²⁶⁾。したがって、C/EBP β が骨芽細胞の分化および機能調節においても何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。

そこで本研究では、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調節メカニズムの解明を目的として、骨芽細胞分化過程における C/EBP β の役割を明らかにすると共に、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 β の関与について検討を行った。

方 法

1. 細胞培養

C3H10T1/2 細胞、C2C12 細胞、ST2 細胞、Hela 細胞および 293 細胞（理研ジーンバンク、茨城）は、10%胎仔血清（FBS; JRH Biosciences, Lenexa, USA）を含む α -MEM(Sigma, St.Louis, USA)にて 37°C、5%二酸化炭素気相下で培養した。

2. 初代骨芽細胞および線維芽細胞の分離

初代骨芽細胞および線維芽細胞の分離は Bellows 等の方法に従った²⁷⁾。すなわち、3 日齢 DDY マウス（日本動物、大阪）より頭蓋骨を採取し、0.1%コラゲナーゼ（新田ゼラチン、大阪）および 0.2%ディスパーゼ(Invitrogen, Carlsbad, USA)を含むリン酸緩衝生理食塩水(1.8mM KH_2PO_4 , 5.4mM Na_2HPO_4 , 138mM NaCl,以下 PBS; Sigma)を用いて連続的消化を行い、5つのフラクションに分離した。得られた第1フラクションを初代線維芽細胞、第3、4、5フラクションを初代骨芽細胞とした。分離した細胞は、10%FBS を含む α -MEM にて 37°C、5%二酸化炭素気相下で培養し、細胞がコンフルエントになった後 0.02%EDTA（和光純薬工業、大阪）および 2.5%トリプシン(Invitrogen) にて細胞を回収し、継代一代目および二代目の細胞を実験に用いた。

3. C/EBP β 、LIP、C/EBP δ 、Cbfa1 および Cbf β の構築および遺伝子導入

マウス C/EBP β ゲノム DNA は、審良静男博士（大阪大学微生物学研究所）より恵与を受けた。C/EBP β 発現ベクターは、C/EBP β ゲノム DNA を BamH1 および EcoR1 で制限酵素処理することにより得られたフラグメントを、pcDNA3(Invitrogen)にサブクローニングすることにより作製した。LIP 発現ベクターは、C/EBP β のカルボキシル基末端（アミノ

酸 146 番目-297 番目)をコードする領域を **Polymerase chain reaction(PCR)**により増幅し、**Flag** エピトープを付与した **pcDNA3(Invitrogen)** にサブクローニングすることにより構築した。構築した **cDNA** の塩基配列は、**DNA シークエンス(amersham pharmacia biotech, England)**により確認した。**C/EBP δ cDNA** は審良静男博士(大阪大学微生物学研究所)より、**Cbfa1/Pebp2 α A cDNA** は伊藤嘉明博士(京都大学ウィルス研究所)より、**Cbfb β cDNA** は Paul Liu 博士(**Natural Human Genome Research** 研究所、**Maryland, USA**)より各々恵与を受けた。すべての発現ベクターは **HighSpeed Plasmid Midi Kit(QIAGEN, Valencia, USA)**により精製し実験に用いた。**C3H10T1/2** 細胞への遺伝子導入は **Fugene6(Roche, Indianapolis, USA)**を用いて行った。目的遺伝子を組み込んだプラスミドと **Fugene6** 溶液を 5 分間室温にて反応させ、**DNA-リポソーム複合体**の形成後、**60%**コンフルエントの **C3H10T1/2** 細胞培養液中に、**DNA-リポソーム複合体**を直接添加することにより、遺伝子導入を行った。

4. アデノウィルスの作製

アデノウィルスの構築はアデノウィルス作製キット(宝酒造、東京)を用いて行った。アデノウィルスベクター **pAxCawt** に、**C/EBP β** 、**LIP** および **Cbfa1** の **cDNA** を組み込んだコスミドベクターを作製し、アデノウィルスパッケージング細胞 **293** にトランスフェクションした。トランスフェクション **7-14** 日後、**293** 細胞内で相同組み換えにより得られたアデノウィルスクローンを回収し、それぞれのクローンを順々感染を繰り返し、第 4 次ウィルスを感染させた **Hela** 細胞における発現を、抗 **C/EBP β (SantaCruz, California, USA)** あるいは抗 **Cbfa1** 抗体(**Oncogene, Boston, USA**)を用いたウェスタンブローディング法により

検索し、アデノウイルス陽性クローンを選別した。アデノウイルスの C3H10T1/2 細胞、C2C12 細胞、ST2 細胞および初代培養線維芽細胞様細胞への感染は、300 M.O.I.にて行った。

5. 免疫沈降

細胞を PBS にて 3 回洗浄し、細胞溶解バッファー[20mM Hepes(pH7.4), 150mM NaCl, 1mM EGTA, 1.5mM MgCl₂, 10%glycerol, 1%TritonX-100, 10μg/ml leupeptin, 1mM PMSF, 0.2mM sodium orthovanadate]により溶解した後、15000G,4°C,15 分で遠心分離し、上清を全細胞たんぱく質抽出液とした。全細胞たんぱく質抽出液に抗 C/EBPβ抗体(SantaCruz)を加え 4°Cで 8 時間インキュベートした後、ProteinA Sepharose(Zymed Laboratories Inc, South San Francisco, USA)に吸着させ、ビーズを細胞溶解バッファーで 5 回洗浄し、0.5Mβ-メルカプトエタノール（和光純薬工業）含有の SDS サンプルバッファーで 95°C5 分処理した上清をウェスタンブロッティングに用いた。

6. ウェスタンブロッティング

SDS サンプルバッファーにより処理されたサンプルを SDS-PAGE 法により分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写した後、抗 C/EBPβ抗体あるいは抗 Cbfa1 抗体と反応させ、西洋わさび過酸化酵素(HRP)を付与した ProteinA(KPL, Gaithersburg, USA)を反応させ、ECL キット(Amersham)を用いて発光シグナルを増幅した後、X 線フィルム(Kodak)に現像した。

7. 蛍光免疫染色

チャンバースライド(Nalge Nunc International, Naperville, USA)にて培養した初代骨芽

細胞を PBS にて 3 回洗浄した後、3.7%中性ホルマリン-PBS で 20 分間固定した。

0.2%TritonX-100 を含む PBS にて洗浄した後、1%BSA 含有の PBS にて 2 時間ブロッキングを行い、抗 C/EBP β ポリクローナル抗体(SantaCruz)と反応させた。0.2%TritonX-100 を含む PBS にて洗浄した後、ロダミン標識した抗ラビット IgG 抗体と反応させ、蛍光顕微鏡 (Zeiss, Germany) を用いて観察した。また、2 次抗体溶液中に 0.1 μ g/ml DAPI(Molecula Probe)を加えることにより、核染色を行った。

8. ルシフェラーゼアッセイ

オステオカルシンプロモーターあるいは PPAR γ 2 遺伝子プロモーターを組み込んだホタルルシフェラーゼ遺伝子(Promega, Madison, USA)を遺伝子発現ベクターおよび遺伝子導入効率測定用のウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクター(Promega)と共に C3H10T1/2 細胞に遺伝子導入し、48 時間後細胞溶解バッファーにて細胞を溶解しサンプルとした。すべてのサンプルはルシフェラーゼ基質液と混合した後、ルミノメーター(Promega)を用いて発光量を測定し、得られた測定値を、ウミシイタケルシフェラーゼの発光量により補正した。

9. ビオチン化オリゴヌクレオチドバインディングアッセイ

細胞を PBS にて 3 回洗浄後、バインディングアッセイ用の溶解バッファー[10mM HEPES, pH7.9, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 10% glycerol, 1mM DTT, 0.5% of NP-40, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 1mM PMSF, and 0.2mM sodium orthovanadate]にて溶解し、遠心分離(15000G, 4 $^{\circ}$ C, 15 分)し、上清を全細胞たんぱく質抽出液とした。内在性ビオチンを除去するために全たんぱく質抽出液とストレプトアビジンアガロースビーズを

前反応させた後、ビオチン標識した 1 μ g C/EBP 結合配列オリゴヌクレオチド(sense primer: 5'-AATGAGGACATTACTGAACACTCCC-3'; antisense primer: 5'-GGGAGTGTTCAGTAATGTCCTCATT-3')と反応させ、DNA-たんぱく質複合体を形成させた。DNA-たんぱく質複合体をストレプトアビチン-アガロースビーズに吸着させた後、遠心分離(15000G, 4 $^{\circ}$ C, 15 分)し、ビーズを溶解バッファーで 5 回洗浄した後、0.5M β -メルカプトエタノール含有の SDS サンプルバッファーで熱処理(95 $^{\circ}$ C, 5 分)し、上清をサンプルとした。これらサンプルは SDS-PAGE 法により分離し、ウェスタンブロッティング法により検索した。

10. RT-PCR

RNA は RNAeasy Kit(Qiagen)を使用して、C3H10T1/2 細胞から抽出した。総 RNA を 70 $^{\circ}$ C で 10 分間変性させた後、Oligo-dT プライマーおよび逆転写酵素(Invitrogen)を用いて逆転写反応させ cDNA を合成した。得られた cDNA はオステオカルシン遺伝子特異的プライマー (sense primer: 5'-GACAAAGCCTTCATGTCCAAGC-3'; anti-sense primer: 5'-AAAGCCGAGCTGCCAGAGTTTG-3')を用いて、[94 $^{\circ}$ C 3 分間、(94 $^{\circ}$ C 30 秒 \times 1 サイクル、60 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分間) \times 30 サイクル、72 $^{\circ}$ C 10 分間 \times 1 サイクル]の PCR を行った。得られた増幅断片は 2%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離し、臭化エチジウム (和光純薬工業) にて染色した。

11. アルカリフォスファターゼ活性測定

細胞を PBS にて 3 回洗浄後、0.05% TritonX-100 溶液を加え、凍結、融解を 2 回繰り返して細胞を溶解した。細胞溶解液を基質溶液 [1mM isodium p-Nitrophenylphosphate Hexahydrate, 10mM MgCl₂, 2.5mM 2-Aminomethyl-2-methyl-1 propanol] と 37 $^{\circ}$ C で 1 時

間反応させた後、マイクロプレートリーダー (BioRad, Hercules, USA) を用いて 405nm での吸光度を測定し、p-nitrophenol(1 μ mol/ml)検量曲線により定量した。アルカリフォスファターゼ活性は、p-nitrophenol の測定値をブラッドフォード法²⁸⁾により得られた細胞溶解液のたんぱく質量で補正することにより定量化した。

12. アルカリフォスファターゼ活性染色

細胞を PBS にて 2 回洗浄した後、3.7%中性ホルマリン溶液 (和光純薬工業) にて固定し、330 μ g/ml Nitro blue tetrazolium(Sigma) 、165 μ g/ml Bromochorindoly phosphate(Sigma)、100mM NaCl および 5mM MgCl₂ を含む 100mM Tris-HCl 緩衝液 (Ph9.5) 中、37 $^{\circ}$ C で反応させた。

13. オイルレッド O 染色

細胞を PBS にて 2 回洗浄した後、3.7%中性ホルマリン溶液にて固定した。PBS にて 2 回、60%イソプロピルアルコール溶液で 1 回洗浄した後、0.5%オイルレッド O 溶液で 20 分染色した。オイルレッド O 染色陽性細胞の面積は ImageProPlus (Palmerton Inc.) により計測した。

14. 統計分析

実験結果は平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) で表し、ANOVA による一次分散分析を行った後 Sheffe's test を用いて統計学的に比較した。

結 果

1、 骨芽細胞における C/EBP β の発現

骨芽細胞分化あるいは機能調節における C/EBP β の関与を検討するために、3日齢 DDY マウス頭蓋骨より採取した初代骨芽細胞における C/EBP β の発現をウェスタンブロッティング法および蛍光免疫染色により検索した。その結果、初代骨芽細胞において C/EBP β およびそのアイソフォーム LIP が発現していることが確認された (図 1-A)。さらに、蛍光免疫染色により、C/EBP β および LIP は初代骨芽細胞の核内に局在していることが明らかとなった (図 1-B)。この結果より、C/EBP β および LIP が骨芽細胞において発現されていることが確認された。次に、骨芽細胞分化過程における C/EBP β の関与について検討した。未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞は、BMP2 刺激により骨芽細胞および脂肪細胞のいずれの細胞にも分化することが報告されている²⁹⁾。そこでこのような多分化能を有する C3H10T1/2 細胞を、骨芽細胞に分化誘導させた場合の C/EBP β の発現の変化について検討した。BMP2 非刺激群の C3H10T1/2 細胞では C/EBP β の発現は認められなかったが、BMP2 処理された C3H10T1/2 細胞ではアルカリフォスファターゼ活性の誘導、つまり骨芽細胞への分化誘導に並行して (図 2-A)、C/EBP β の発現も誘導されることが示された (図 2-B)。

2、 C/EBP β の強制発現による骨芽細胞分化誘導作用

未分化間葉系細胞の骨芽細胞分化における C/EBP β の役割を明らかにするために、BMP2 存在下あるいは非存在下で、C3H10T1/2 細胞にアデノウィルスを用いて C/EBP β を強制発現させ、その分化に対する効果を検討した。まず、アデノウィルスによる強制発現の効率を調べた。その結果、ほぼ 100%の C3H10T1/2 細胞に C/EBP β が導入されていることがウ

エスタンプロッチング法および蛍光免疫染色により確認できた (図 3-A,B)。次に強制発現された C/EBP β が生物学的活性を発現していることを調べる目的で、これまでに報告されているように¹⁶⁻¹⁸⁾、C/EBP β が脂肪細胞分化を誘導するかについて検討した。図 3-C に示すように、オイルレッド O 染色により C3H10T1/2 細胞が脂肪細胞へと分化誘導されることが確認できた (図 3-C)。そこで次に C/EBP β の骨芽細胞分化に対する影響を調べた。その結果、C/EBP β は C3H10T1/2 細胞をアルカリフォスファターゼ活性陽性の骨芽細胞様細胞へ分化させることが判明した (図 4-A)。この C/EBP β の作用は、BMP2 を添加することにより著しく増強された (図 4-A)。また C/EBP β を強制発現させると、オステオカルシンの発現が誘導された (図 4-B)。この効果は、強力な骨芽細胞分化誘導因子である Cbfa1 を強制発現させた場合とほぼ同様であった。C/EBP β の骨芽細胞分化誘導効果が C3H10T1/2 細胞以外の細胞においても見られるか否かを検討するために、他の間葉系細胞における C/EBP β の効果を検討した。その結果 C/EBP β は ST2 細胞、C2C12 細胞および 3 日齢マウス頭蓋骨より採取した初代線維芽細胞においても、アルカリフォスファターゼ活性を有意に促進することが明らかとなった (図 5)。以上の結果より、C/EBP β は複数の未分化間葉系細胞を骨芽細胞へと分化誘導する作用を有することが示された。

3、 骨芽細胞分化における C/EBP β と Cbfa1 の協調作用

C/EBP β の骨芽細胞分化誘導能が BMP2 により著明に増強されたことから (図 4-A)、C/EBP β は BMP2 と協調して骨芽細胞分化促進に関与していると推察される。ところで BMP2 による骨芽細胞分化においては転写因子 Cbfa1 が重要な役割を演じていることが明らかにされている³⁰⁾。そこで、C/EBP β と BMP2 との協調作用のメカニズムを明らかにす

るために、C/EBP β が Cbfa1 による骨芽細胞分化誘導作用におよぼす影響について検討した。その結果、C/EBP β と Cbfa1 を共発現させると、C/EBP β あるいは Cbfa1 を単独に強制発現させた場合に比較して、アルカリフォスファターゼ活性が有意に促進されることが明らかとなった (図 6)。以上の結果より C/EBP β は、Cbfa1 と協調して骨芽細胞分化を促進すると考えられた。

次にこの C/EBP β と Cbfa1 の協調作用が転写レベルにおいても認められるか否かを検討した。C/EBP β の強制発現によりオステオカルシンの発現が誘導されたこと (図 4-B)、Cbfa1 がオステオカルシンのプロモーター活性を制御すること^{12,14)}などの知見を考慮して、C/EBP β と Cbfa1 の転写活性に対する効果は、オステオカルシンのプロモーター領域をホタルシフェラーゼに融合させた遺伝子を用いたレポーターアッセイにより評価した。その結果、C/EBP β を単独で強制発現させた場合にも、オステオカルシンのプロモーター活性が有意に促進された (図 7)。C/EBP β を Cbfa1 と共に強制発現させると、オステオカルシンのプロモーター活性はさらに促進された (図 7)。以上の結果より C/EBP β と Cbfa1 は、転写レベルにおいてもオステオカルシンの発現を協調的に調節し、骨芽細胞分化を制御していることが示唆された。ところで、二つの分子が協調作用を示す場合、お互いが物理的に結合するケースが多いことが知られている³¹⁻³⁵⁾。そこで次に、C/EBP β が Cbfa1 と物理的に結合するか否かを免疫沈降法により検討した。C/EBP β 、Cbfa1、あるいは両者を COS7 細胞に強制発現させ、細胞内たんぱく質を抗 C/EBP β 抗体にて免疫沈降した後、免疫沈降物を抗 Cbfa1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて検索した。その結果、C/EBP β は Cbfa1 と物理的に結合することが明らかとなった (図 8)。

4、 C/EBP β のオステオカルシンプロモーター領域への結合

Cbfa1 はオステオカルシンプロモーター領域内の OSE2 と呼ばれる領域に直接結合し、オステオカルシンプロモーター活性を調節していることが明らかとなっている^{12,14)}。一方、C/EBP β は標的遺伝子に存在する C/EBP 結合配列に結合し、その転写活性を調節する¹⁷⁾。そこで C/EBP β がオステオカルシンプロモーター領域に直接結合して転写活性を調節しているか否かを検討するために、オステオカルシンプロモーター領域に C/EBP の結合配列モチーフが存在するか否かをコンピューター解析により検索した。その結果、OSE2 領域の約300bp 上流に C/EBP の結合配列モチーフが存在することを見出した。そこでこの C/EBP 結合配列モチーフに C/EBP β が実際に結合するか否かをビオチン化オリゴヌクレオチドバインディングアッセイにより検討した。その結果、C/EBP β はこのモチーフに実際に結合し、またこの結合は競合プローブにより濃度依存的に阻害された (図 9)。以上の結果より C/EBP β は、オステオカルシンプロモーター領域の C/EBP 結合配列モチーフに直接結合することにより、オステオカルシンプロモーターの活性を促進し、骨芽細胞分化を誘導すると推測される。

5、 C/EBP β アイソフォーム LIP による骨芽細胞および脂肪細胞への分化制御

転写活性化領域を欠失する C/EBP β のアイソフォーム LIP (図 10) は脂肪細胞分化を抑制することが報告されている^{18,22)}。LIP は初代骨芽細胞にも発現が見られることから (図 1-A)、骨芽細胞分化においても何らかの役割を担っている可能性が考えられる。そこで C3H10T1/2 細胞を用いて、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対する LIP の効果を検討した。Yeh らの報告¹⁶⁾と一致して、LIP を強制発現させると BMP2 添

加あるいは C/EBP β の強制発現により誘導される脂肪細胞分化が著明に抑制された (図 11-A,B)。一方、予想しなかったことに LIP の強制発現は BMP2 により誘導される C3H10T1/2 細胞のアルカリフォスファターゼ活性を著しく促進した (図 12)。以上の結果より、LIP は脂肪細胞分化に対しては抑制的に、骨芽細胞分化に対しては促進的に作用することが示された。次に、脂肪細胞分化と骨芽細胞分化に対して、LIP が相反する効果を有するメカニズムについて検討を行った。LIP を強制発現させると、C/EBP β により誘導される脂肪細胞分化関連遺伝子 PPAR γ 2 のプロモーター活性が抑制された (図 13)。したがって、PPAR γ 2 の発現調節において、LIP は C/EBP β と転写レベルで拮抗すると考えられる。一方 LIP の強制発現は、Cbfa1 により誘導されるオステオカルシンプロモーター活性をさらに増強した (図 14-A)。これに一致して LIP の強制発現は Cbfa1 のアルカリフォスファターゼ活性の促進作用を増強した (図 14-B)。また共免疫沈降実験により、C/EBP β 同様に LIP が Cbfa1 と物理的に結合することが示された (図 15-A)。さらに LIP はオステオカルシンプロモーター領域の C/EBP 結合配列に直接結合可能であることも判明した (図 15-B)。以上の結果より、LIP は脂肪細胞分化に対しては転写抑制因子として機能し、脂肪細胞分化を抑制する。一方、骨芽細胞分化に対しては C/EBP β と同様に、Cbfa1 およびオステオカルシンプロモーターに結合し、Cbfa1 と協調することにより骨芽細胞分化を促進すると考えられる。

考 察

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制御メカニズムの解明は骨量の維持さらには増加をはかる上で非常に重要な課題である。にもかかわらず、未分化間葉系細胞からそれぞれの細胞への分化がどのように決定されるかに関して、未だ不明な点が多い。本研究の結果、従来、未分化間葉系細胞を脂肪細胞に選択的に分化誘導させると考えられてきた転写因子 C/EBP β が、未分化間葉系細胞を骨芽細胞へも分化誘導させること、そして天然に存在する C/EBP β のアイソフォーム LIP が脂肪細胞分化を抑制し、一方において骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。これらの結果より、未分化間葉系細胞の骨芽細胞および脂肪細胞への分化には、各々の分化過程に特有の C/EBP β アイソフォームが関与することが示唆された。

本研究結果より、C/EBP β は骨芽細胞に必須の転写因子 Cbfa1 と物理的に結合し、Cbfa1 によるオステオカルシンなどの標的遺伝子のプロモーター活性を増強することにより骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。Cbfa1 が属する Runx/PEBP2 α ファミリーは、単独では転写活性化能力は弱く、生物学的機能を効果的に発揮するには、他の転写因子との相互作用が必要であることが報告されている³⁶⁾。たとえば、癌抑制遺伝子 Rb(Retinoblastoma Protein)が Cbfa1 と結合し、Cbfa1 の転写活性を増強することにより骨芽細胞分化を促進することが示されている³⁷⁾。したがって、Cbfa1 による骨芽細胞分化誘導作用は、C/EBP β あるいは RB などの別の転写因子との複合体形成を通じて、相互のシグナルをクロストークすることにより発現されると推察される。近年、複数の転写因子によるシグナルクロストークにおいて、核内インテグレーターとして機能し、様々な細胞の生

理機能に関与するコアクチベーターの重要性が提唱されている³⁸⁾。コアクチベーターは、基本転写因子を含む種々の転写因子と複合体を形成し、標的遺伝子プロモーターのヌクレオソーム・ヒストンを脱アセチル化し、クロマチン構造を変化させることにより転写効率を促進することが示されている^{39,40)}。中でも、ヒストンアセチル化酵素活性を有するコアクチベーターCBP/P300は、そのC末端領域にC/EBP β との相互作用領域を有することが知られている⁴¹⁾。また、C/EBP α はCBP/P300を介してCbfa1と同じくPEBP2/Runxファミリーに属するAML1/Cbfa2/Pebp2 α Bと共に複合体を形成し、骨髄球の分化を促進することが報告されている^{42,43)}。さらに、C/EBP β はクロマチンリモデリング因子SWI/SNFをリクルートし、クロマチン構造の局所的構造を変化させ骨髄球分化関連遺伝子の転写を制御することも示されている⁴⁴⁾。これらの報告から、C/EBP β は、基本転写因子およびコアクチベーターをリクルートし、さらにCbfa1との転写複合体を形成し、オステオカルシンなどの標的遺伝子のクロマチン構造を変化させ、その転写の活性化を図ることにより、骨芽細胞分化を促進すると推察される。

Komoriらは、Cbfa1ノックアウトマウスでは全く骨が形成されないが、一部の骨形成予定域にはALP活性陽性細胞が出現していること、またCbfa1ノックアウトマウスの頭蓋冠より採取した骨芽細胞前駆細胞株にBMP2を作用させるとオステオカルシンの発現が誘導されることを報告している¹³⁾。この結果は、別の転写因子がCbfa1非依存的に骨芽細胞分化に関与している可能性を示唆する。本研究においてもC/EBP β を単独で強制発現させると、C3H10T1/2細胞のアルカリフォスファターゼ活性およびオステオカルシンプロモーターの活性が促進されることが示された。さらに、我々はCbfa1ノックアウトマウスの頭

蓋冠から分離された未分化間葉系細胞に C/EBP β を強制発現させると、アルカリフォスファターゼ活性が促進されることを確認している（未発表データ）。これらの結果より、C/EBP β は Cbfa1 非依存性にも骨芽細胞分化を誘導できると考えられる。

未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化に際し、分化初期においてはアルカリフォスファターゼおよびタイプ I コラーゲン、分化後期にはオステオカルシン、オステオポンチンおよび BSP が発現され、骨形成が制御されている²⁾。したがって、オステオカルシンのみならず、これらの骨芽細胞分化関連遺伝子の転写活性の促進および発現の誘導に、C/EBP β が関与している可能性が考えられる。実際、オステオポンチンプロモーター領域に C/EBPのコンセンサス結合配列モチーフが存在する⁴⁵⁾。さらに、本研究においても C/EBP β の強制発現により、オステオポンチンプロモーターの転写活性が促進されることを確認している（未発表データ）。したがって、C/EBP β は複数の骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現を制御することにより、骨芽細胞分化を総合的に調節していると推察される。今後、これら遺伝子のプロモーターに対する C/EBP β の効果を検討することにより、C/EBP β の骨芽細胞分化誘導の分子メカニズムの詳細がさらに明らかになると考えられる。

C/EBP β のアイソフォーム LIP は、転写活性能を持たないために脂肪細胞分化に対してはドミナントネガティブに作用した。一方、Cbfa1 と協調することにより骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。LIP は、Cbfa1 との物理的結合能、およびオステオカルシンプロモーター領域への結合能を有していることから、コアクチベーターをリクルートし、オステオカルシンなどの Cbfa1 標的遺伝子のクロマチン構造の立体的構造を変化させ、これら標的遺伝子の転写活性を促進すると推測される。この点を明らかにするためには、

コアクチベーターP300/CBP またはクロマチンリモデリング因子 SWI/SNF と LIP との相互関係が立証される必要がある。いずれにしても LIP が転写レベルにおいて、脂肪細胞分化と骨芽細胞分化に対して相反する効果を示すことが明らかになったことは興味深い。この結果は、未分化間葉系細胞の分化が、分子の一次構造だけでは説明不可能な複雑な制御メカニズムによって調節されていることを示している。したがって、細胞の分化および増殖のメカニズムを解明するには、分子それぞれの相互関係に対する綿密な検討が必要であると考えられる。

脂肪細胞の分化制御においては C/EBP β と LIP の発現量の比率が重要な鍵を担っていると考えられている²³⁾。C/EBPファミリーによる脂肪細胞分化に対しては、LIP の発現量が少ない場合でも強いドミナントネガティブ効果が見られることが示されている^{21,22)}。したがって、脂肪細胞の分化においては LIP の発現量が大幅に抑制され、C/EBP β の転写活性が抑制されないような状況になる必要がある。LIP は C/EBP β 遺伝子内の 3 番目の開始コドンが使われた場合に合成される天然に存在するアイソフォームであり、スプライシングの違いではなく翻訳時の調節変化によって生じることが知られている²¹⁾。C/EBP β 遺伝子内のどの開始コドンが用いられるかはコザック配列に基づく **leaky ribosome scanning mechanism** によって説明されているが⁴⁶⁾、その明確な調節メカニズムは不明である。LIP の発現制御メカニズムの解明は、骨芽細胞と脂肪細胞の分化バランスの調節メカニズムの解明につながるきわめて重要な課題であると思われる。

骨粗鬆症においては、骨量低下に相関して脂肪髄の亢進が認められることから、骨量の変化に対する骨髄脂肪細胞の関与が以前から推察されている⁵⁻⁸⁾。さらに近年、この仮説を

分子レベルで支持する臨床的報告が見られる。OgawaらはPPAR γ の遺伝子多形性と閉経後性骨粗鬆症との関連性を報告しており⁴⁷⁾、またOkazakiらはPPAR γ の特異的リガンドであり、インスリン抵抗性改善薬であるトログリタゾンの内服するII型糖尿病患者では、骨代謝回転が低下していることを見出している⁴⁸⁾。これら臨床疫学的検討は、PPAR γ の骨形成に対する関与を示唆するとともに、脂肪細胞分化の動向が骨代謝機構に関与することを示唆している。したがって、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、そしてそのメカニズムを遺伝子レベルで解明することは、骨代謝の恒常性を維持する上で重要な意義を有すると考えられる。本研究により、未分化間葉系細胞の分化方向制御におけるLIPの役割が示されたことから、骨粗鬆症の発症および病態変動におけるLIPの関与が推測される。今後、C/EBP β およびLIPの生物学的作用をin vivoレベルで証明するとともに、骨粗鬆症動物実験モデルおよび骨粗鬆症患者におけるC/EBP β およびLIPの発現の変動ならびにその関与をより詳細に検討することにより、骨粗鬆症患者に見られる骨量低下のメカニズムの解明、そして骨量回復のための治療法の開発に対する指針を見い出していきたいと考えている。

結 論

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 β およびそのアイソフォーム LIP の役割を検討した結果、以下のことが明らかとなった。

- 1、 C/EBP β は未分化間葉系細胞を脂肪細胞のみならず骨芽細胞にも分化誘導する機能を有している。
- 2、 C/EBP β は Cbfa1 と物理的に結合し、協調してオステオカルシンなどの標的遺伝子の転写を高め、骨芽細胞分化を促進する。
- 3、 C/EBP β のアイソフォーム LIP は脂肪細胞分化を抑制し、一方において骨芽細胞分化を促進する。

以上の結果より、未分化間葉系細胞の骨芽細胞および脂肪細胞への分化には、各々の分化に特有の C/EBP β アイソフォームが関与することが示唆された。(図 16)

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて戴き、終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座、野首孝祠教授、ならびに同口腔分子免疫制御学講座、米田俊之教授に深甚なる謝意を表します。そして、本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、西村理行助教授に心より感謝申し上げます。さらに、本研究に貴重な御助言と御指示を賜りました大阪大学大学院保健学科検査技術科学病態生体情報学講座教授、松浦成昭教授に深謝申し上げます。最後にこの研究に対して多大なる御協力と御助言を戴いた顎口腔機能再建学講座教室員ならびに口腔分子免疫制御学講座の皆様深く感謝します。

文 献

- 1) Raisz, L.G. and Kream, B.E. (1983): R-egulation of bone formation. *New Engl. J. Med.*, **309**, 29-35
- 2) Yamaguchi, A., Komori, T. and Suda, T. (2000): Regulation of osteoblast differentiation by bone morphogenic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.*, **21**, 393-411
- 3) Owen, M. (1988): Marrow stromal stem cells. *J. Cell. Sci. Suppl.*, **10**, 63-76
- 4) Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.M., Moorman, M.A., Simonetti, D.W. and Marshak, D.R. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**, 143-147
- 5) Kwai, K., Tamaki, A. and Hirohata, K. (1985): Steroid induced accumulation of lipid in the osteocytes of rabbit femoralhead. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **67**, 755-763
- 6) Burkhardt, R., Kettner, G., Bohm, W., Schmidtmeir, M., Schlag, R., Frisch, B., Mallmann, B., Eisenmenger, W. and Gilg, T.H. (1987): Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anemia, primary osteoporosis and old age. *Bone*, **8**, 157-164.
- 7) Beresford, J.N., Bennett, J.H., Devlin, C., Leboy, P.S. and Owen, M.E. (1992): Evidence of an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.*, **102**, 341-351.
- 8) Gimble, J.M., Wanker, F., Wang, C.S., Bass, H., Wu, X., Kelly, K., Yancopoulos, G.D. and Hill, M.R. (1994): Regulation of bone marrow stromal cells differentiation by

- cytokines whose receptors share the gp130 protein. *J. Cell Biochem.*, **54**, 122-133.
- 9) Nuttall, M.E., Patton, A.J., Olivera, D.L., Nadeau, D.P. and Gowen, M. (1998): Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J. Bone Min. Res.*, **13**, 371-382.
- 10) Karsenty, G. (1999): The genetic transformation of bone biology. *Genes & Dev.*, **13**, 3037-3051.
- 11) Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P. and Spiegelman, B.M. (2000): Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes & Dev.*, **14**, 1293-1307.
- 12) Ducey, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. and Karsenty, G. (1997): *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, **89**, 747-754
- 13) Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H. and Inada, M. (1997): Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, **89**, 755-764.
- 14) Ducey, P. and Karsenty, G. (1995): Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1858-1869.
- 15) Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J.B., Aylsworth, A.S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W.G., Henn, W., Knoll, J.H., Owen, M.J., Mertelsmann, R., Zabel, B.U. and Olsen, B.R. (1997): Mutations involving the transcription factor *CBFA1* cause

cleidocranial dysplasia., *Cell* , **89**, 773-779.

- 16) Yeh, W.C., Cao, Z., Classon, M., and McKnight, S.L. (1995): Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins., *Genes & Dev.* **15**, 168-181.
- 17) Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N.L.R. and Farmer, S.R. (1995): Conditional ectopic expression of C/EBP β in NIH-3T3 cells Induces PPAR γ and stimulates adipogenesis. *Genes & Dev.*, **9**, 2350-2363.
- 18) Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B.M. (1994): Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid activated transcription factor. *Cell* , **79**, 1147- 1156.
- 19) Darlington, G.J., Ross, S.E. and MacDougald, O.A. (1998): The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol. Chem.*, **273**, 30057-30060.
- 20) Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S. (1997): Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP β and/or C/EBP δ gene. *EMBO J.*, **16**, 7432-7443.
- 21) Descombes, P. and Schibler, U. (1991): A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell*, **67**, 569-579.
- 22) Hamm, J.K., Park, B.H. and Farmer, S.R., (2001): A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes., *J Biol Chem.*, **276**, 18464-18471.

- 23) Bachmeier, M. and Loffler, G. (1997): The effect of platelet-derived growth factor and adipogenic hormones on the expression of CCAAT/enhancer-binding proteins in 3T3-L1 cells in serum-free conditions. *Eur. J. Biochem.*, **243**, 128-133.
- 24) Lecka-Czemik, B., Gubrij, I., Moerman, E.J., Kajkenova, O., Lipschitz, D.A., Manolagas, S.C. and Jilka, R.L. (1999): Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR γ 2. *J. Cell. Biochem.*, **74**, 357-371.
- 25) Stein, B. and Yang, M.X. (1995): Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF- κ B and C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5495-5503.
- 26) Ogasawara, A., Arakawa, T., Kaneda, T., Takuma, T., Sato, T., Kaneko, H., Kumegawa, M. and Hakeda, Y. (2001): Fluid shear stress-induced cyclooxygenase-2 expression is mediated by C/EBP beta, cAMP-response element-binding protein, and AP-1 in osteoblastic MC3T3-E1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7048-7054.
- 27) Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M. and Antosz, M.E. (1986): Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int.*, **38**, 143-154.
- 28) Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- 29) Wang, E.A., Israel, D.I., Kelly, S. and Luxenberg, D.P. (1993): Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth*

Factors., **9**, 57-71.

- 30) Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z1., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Ryoo, H.M. and Bae, S.C. (2000): Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8783-8792.
- 31) Nishio, Y., Isshiki, H., Kishimoto, T. and Akira, S. (1993): A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergistically activate transcription of the rat alpha1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol Cell Biol.*, **13**,1854-1862.
- 32) Oelgeschlager, M., Nuchprayoon, I., Luscher, B. and Friedman, A.D. (1996): C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter. *Mol Cell Biol.*, **16**, 4717-4725.
- 33) Lopez-Rodriguez, C., Botella, L. and Corbi, A.L. (1997): CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP) regulate the tissue specific activity of the CD11c integrin gene promoter through functional interactions with Sp1 proteins., *J Biol Chem.*, **272**, 29120-29126.
- 34) Shuman, J.D., Cheong, J. and Coligan, J.E. (1997): ATF-2 and C/EBPalpha can form a heterodimeric DNA binding complex in vitro. Functional implications for transcriptional regulation. *J Biol Chem.*, **272**,12793-12800.

- 35) Zhou, Y.L., Lei, Y. and Snead, M.L. (2000): Functional antagonism between Msx2 and CCAAT/enhancer-binding protein alpha in regulating the mouse amelogenin gene expression is mediated by protein-protein interaction. *J Biol Chem.*, **275**, 29066-29075.
- 36) Kanno, T., Kanno, Y., Chen, L.F., Ogawa, E., Kim, W.Y. and Ito, Y. (1998): Intrinsic transcriptional activation-inhibition domains of the polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor alpha subunit released in the presence of the beta subunit. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2444- 2454.
- 37) Thomas, D.M., Carty, S.A., Piscopo, D.M., Lee, J.S., Wang, W.F., Forrester, W.C. and Hinds, P.W. (2001): The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol. Cell*, **8**, 303-316.
- 38) Xu, L., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1999): Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 140-147.
- 39) Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996): A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, **382**, 319-324.
- 40) Ogryzko, V.V., Schltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996): The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferase. *Cell*, **87**, 953-959.
- 41) Mink, S., Haeing, B. and Klempnauer, K.H. (1997): Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBP β . *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6609-6617.

- 42) Zhang, D.E., Hetherington, C.J., Meyers, S., Rhoades, K.L., Larson, C.J., Chen, H.-M., Hiebert, S.W. and Tenen, D.G. (1996): CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF α 2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1231-1240
- 43) Kitabayashi, I., Yokoyama, A., Shimizu, K. and Ohki, M. (1998): Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J.*, **17**, 2994-3004.
- 44) Kowenz-Leutz, E. and Leutz, A. (1999): A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol. Cell*, **4**, 735-743.
- 45) Craig, A.M. and Denhardt D.T. (1991): The murine gene encoding secreted phosphoprotein 1 (osteopontin): promoter structure, activity, and induction in vivo by estrogen and progesterone. *Gene*, **100**, 163-171.
- 46) Kozak, M. (1989): The scanning model for translation: an update. *J. Cell. Biol.*, **108**, 229-241.
- 47) Ogawa, S., Urano, T., Hosoi, T., Miyao, M., Hoshino, S., Fujita, M., Shiraki M., Orimo, H., Ouchi, Y. and Inoue, S. (1999): Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.*, **260**, 122-126.
- 48) Okazaki, R., Miura, M., Toriumi, M., Taguchi, M., Hirota, Y., Fukumoto, S., Fujita, T.,

Tanaka, K. and Takeuchi, A. (1999): Short-term treatment with troglitazone decreases bone turnover in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J.*, **46**, 795-801.

脚 注

本論文の要旨は、第 18 回日本骨代謝学会（平成 12 年 7 月、広島）、第 22 回アメリカ骨代謝学会（平成 12 年 9 月、トロント）、第 42 回歯科基礎医学会（平成 12 年 10 月、大阪）、第 19 回日本骨代謝学会（平成 13 年 8 月、名古屋）、第 23 回アメリカ骨代謝学会（平成 13 年 10 月、フェニックス）において発表した。

図の説明

図 1 初代骨芽細胞における C/EBP β の発現

(A) 3 日齢 DDY マウスの頭蓋骨より採取した初代骨芽細胞を溶解し、SDS サンプルバッファで処理後、抗 C/EBP β 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検討した。

(B) 初代骨芽細胞を 3.7%中性ホルマリン-PBS 溶液で固定し、抗 C/EBP β 抗体と反応させた後、ロダミン標識した抗ラビット IgG 抗体と反応させ、蛍光顕微鏡を用いて観察した(左図)。右図は DAPI 染色による初代骨芽細胞の核局在を示す。

図 2 BMP2 処理による C3H10T1/2 細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性の促進

(A)および C/EBP β の発現誘導(B)

(A) C3H10T1/2 細胞を BMP2 存在下 (BMP2) あるいは BMP2 非存在下(コントロール)で 7 日間培養した後、3.7%中性ホルマリン-PBS 溶液で固定し、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

(B) BMP2 存在下あるいは BMP2 非存在下(コントロール)で 7 日間培養した C3H10T1/2 細胞を溶解し、SDS サンプルバッファで処理後、抗 C/EBP β 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検討した。

図 3 アデノウイルスを用いた C3H10T1/2 細胞への C/EBP β の強制発現(A,B)および脂肪細胞分化誘導効果(C)

(A) コントロールウイルス(コントロール)あるいは C/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させた C3H10T1/2 細胞を溶解し、SDS サンプルバッファで処理後、抗 C/EBP β 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検討した。

(B) コントロールウイルス(コントロール)あるいは C/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させた C3H10T1/2 細胞を、3.7%中性ホルマリン-PBS 溶液で固定し、抗 C/EBP β 抗体と反応させ、ロダミン標識した抗ラビット IgG 抗体と反応させた後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(C) C3H10T1/2 細胞にコントロールウイルス(コントロール)あるいは C/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させ 7 日間培養した後、3.7%中性ホルマリン-PBS 溶液で固定し、オイルレッド O 染色を行った。

図 4 C/EBP β の強制発現によるアルカリフォスファターゼ活性促進作用(A)およびオステオカルシンの発現誘導(B)

(A) コントロールウイルスあるいは C/EBP β アデノウイルスを感染させた C3H10T1/2 細胞を、BMP2 存在下 (BMP2) あるいは非存在下で 7 日間培養した後、細胞溶解液を回収しアルカフォスファターゼ活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *:p<0.05

(B) コントロールウイルス(コントロール)、Cbfa1 アデノウイルス(Cbfa1)、あるいは C/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させた C3H10T1/2 細胞から RNA を精製し、オステオカルシン遺伝子に特異的プライマーを用いて RT-PCR を行い、増幅断片を 2%アガロースゲルに展開した。

図 5 C/EBP β の強制発現による、ST2 細胞、C2C12 細胞およびマウス頭蓋骨由来初代線維芽細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性促進作用

ST2 細胞、C2C12 細胞およびマウス頭蓋骨由来初代線維芽細胞にコントロールウイルス

(コントロール)あるいは C/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させ 7 日間培養した後、3.7%中性ホルマリン-PBS 溶液で固定し、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

図 6 C/EBP β と Cbfa1 によるアルカリフォスファターゼ活性促進の協調作用

コントロールウイルス(コントロール)、C/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)、Cbfa1 アデノウイルス(Cbfa1)あるいは Cbfa1 アデノウイルスと C/EBP β アデノウイルス(Cbfa1+C/EBP β)を C3H10T1/2 細胞に感染させ 7 日間培養した後、細胞溶解液を回収しアルカリフォスファターゼ活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *:p<0.05

図 7 C/EBP β と Cbfa1 によるオステオカルシンプロモーター活性促進の協調作用

C3H10T1/2 細胞に、Cbfb発現ベクターとオステオカルシンプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を Fugene6 により遺伝子導入し、12 時間後コントロールウイルス(コントロール)、C/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)、Cbfa1 アデノウイルス(Cbfa1)あるいは Cbfa1 アデノウイルスと C/EBP β アデノウイルス(Cbfa1+C/EBP β)を感染させた。ルシフェラーゼ遺伝子導入 48 時間後に細胞溶解液を回収し、ルミノメーターにより転写活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *:p<0.05

図 8 C/EBP β と Cbfa1 の物理的結合

コントロールウイルス(コントロール)、C/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)、Cbfa1 アデノウイルス(Cbfa1)あるいは Cbfa1 アデノウイルスと C/EBP β アデノウイルス(Cbfa1+C/EBP β)を感染させた COS7 細胞の細胞内たんぱく質を、抗 C/EBP β 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 Cbfa1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検索した。

図 9 C/EBPβのオステオカルシンプロモーター領域への結合

コントロールウイルス(レーン 1)、あるいは C/EBPβアデノウイルス(レーン 2、3、4、5)を感染させた COS7 細胞から全細胞たんぱく質抽出液を作製し、ビオチン標識した C/EBP 結合配列を用いてバインディングアッセイを行った。さらに、2μg、10μg および 20μg のビオチン非標識 C/EBP 結合配列オリゴヌクレオチド(競合プローブ)を反応させ、その阻害効果を検討した。

図 10 C/EBPβおよびアイソフォーム LIP の構造図

C/EBPβ遺伝子およびLIP 遺伝子の一次構造を示す。図中 AD は転写活性化領域、DNA-BD は DNA 結合領域を、LZ はロイシンジッパー領域および M は開始コドン Methionin を表す。

図 11 LIP の強制発現による脂肪細胞分化抑制作用

(A) コントロールウイルスあるいは LIP アデノウイルス(LIP)を感染させた C3H10T1/2 細胞を、BMP2 存在下 (BMP2) あるいは非存在下(コントロール)で 14 日間培養した後オイルレッド O 染色を行い、オイルレッド O 染色陽性部分の面積を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *: $p < 0.05$

(B) C3H10T1/2 細胞にコントロールウイルス(コントロール)、C/EBPβアデノウイルス(C/EBPβ)あるいは C/EBPβアデノウイルスと LIP アデノウイルス(C/EBPβ+LIP)を感染させ、7 日間培養した後オイルレッド O 染色を行い、オイルレッド O 染色陽性部分の面積を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *: $p < 0.05$

図 12 LIP の強制発現による BMP2 依存性骨芽細胞分化促進作用

コントロールウイルスあるいは LIP アデノウイルス(LIP)を感染させた C3H10T1/2 細胞

を、BMP2 存在下 (BMP2) および非存在下(コントロール)にて 7 日間培養した後、細胞溶解液を回収し、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *:p<0.05

図 13 LIP の強制発現による PPAR γ 2 プロモーター活性抑制作用

PPAR γ 2 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を Fugene6 により C3H10T1/2 細胞に遺伝子導入し、12 時間後コントロールウイルス(コントロール)、C/EBP β アデノウイルスと C/EBP δ アデノウイルス(C/EBP β +C/EBP δ)、LIP アデノウイルス(LIP)、あるいは C/EBP β アデノウイルス、C/EBP δ アデノウイルスおよび LIP アデノウイルス(C/EBP β +C/EBP δ +LIP)を感染させた。ルシフェラーゼ遺伝子導入 48 時間後に細胞溶解液を回収し、ルミノメーターにより転写活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *:p<0.05

図 14 LIP の強制発現による Cbfa1 依存性骨芽細胞分化誘導増強作用

(A) C3H10T1/2 細胞に、Cbfa1 発現ベクターとオステオカルシンプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を Fugene6 により遺伝子導入し、12 時間後コントロールウイルス(コントロール)、Cbfa1 アデノウイルス(Cbfa1)あるいは Cbfa1 アデノウイルスと LIP アデノウイルス(Cbfa1+LIP)を感染させた。ルシフェラーゼ遺伝子導入 48 時間後に細胞溶解液を回収し、ルミノメーターにより転写活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *:p<0.05

(B) C3H10T1/2 細胞に、コントロールウイルス(コントロール)、Cbfa1 アデノウイルス(Cbfa1)あるいは Cbfa1 アデノウイルスと LIP アデノウイルス(Cbfa1+LIP)を感染させ 7 日

間培養した後、細胞溶解液を回収しアルカリフォスファターゼ活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示している(n=3) *: $p < 0.05$

図 15 LIP の Cbfa1 への物理的結合およびオステオカルシンプロモーター領域への結合

(A) LIP アデノウィルス(LIP)あるいは Cbfa1 アデノウィルスと LIP アデノウィルス(LIP+Cbfa1)を感染させた COS7 細胞の細胞内たんぱく質を、抗 C/EBP β 抗体を用いて免疫沈降した後、抗 Cbfa1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検索した。

(B) コントロールウィルス(コントロール)、LIP アデノウィルス(LIP)を感染させた COS7 細胞を溶解し、ビオチン標識した C/EBP 結合配列を用いてバインディングアッセイを行った。

図 16 C/EBP β およびアイソフォーム LIP による、骨芽細胞および脂肪細胞への分化制御メカニズムの模図

PPAR γ は脂肪細胞分化の最終過程を促進する転写因子であるが、その発現は C/EBP β によってコントロールされていることが知られている¹⁷⁾。C/EBP β は Cbfa1 と協調することにより骨芽細胞分化を促進する(A)。LIP は C/EBP β に対してドミナントネガティブに作用して PPAR γ の発現を阻害することにより脂肪細胞分化を抑制する。一方、Cbfa1 と協調して骨芽細胞分化を促進する(B)。これらの結果より未分化間葉系細胞の骨芽細胞および脂肪細胞への分化は、各々の分化に特有の C/EBP β アイソフォームが関与することが示唆される。図中→：促進；⇐：阻害を各々示す。

図1

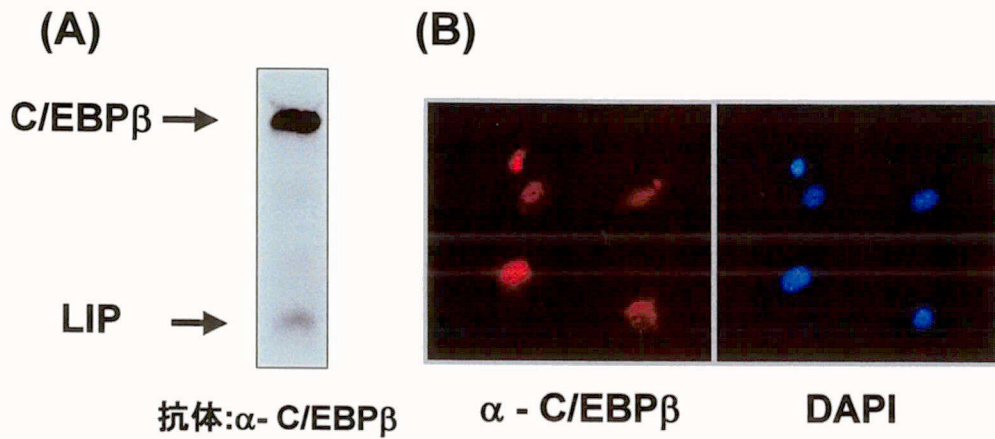


図1 初代骨芽細胞におけるC/EBPβの発現

(A) 3日齢DDYマウスの頭蓋骨より採取した初代骨芽細胞を溶解し、SDSサンプルバッファーで処理後、抗C/EBPβ抗体を用いたウェスタンブロッティング法を行った。

(B) 初代骨芽細胞を3.7%中性ホルマリン-PBS溶液で固定し、抗C/EBPβ抗体と反応させた後、ロダミン標識した抗ラビットIgG抗体と反応させ、蛍光顕微鏡を用いて観察した(左図)。右図はDAPI染色による初代骨芽細胞の核局在を示す。

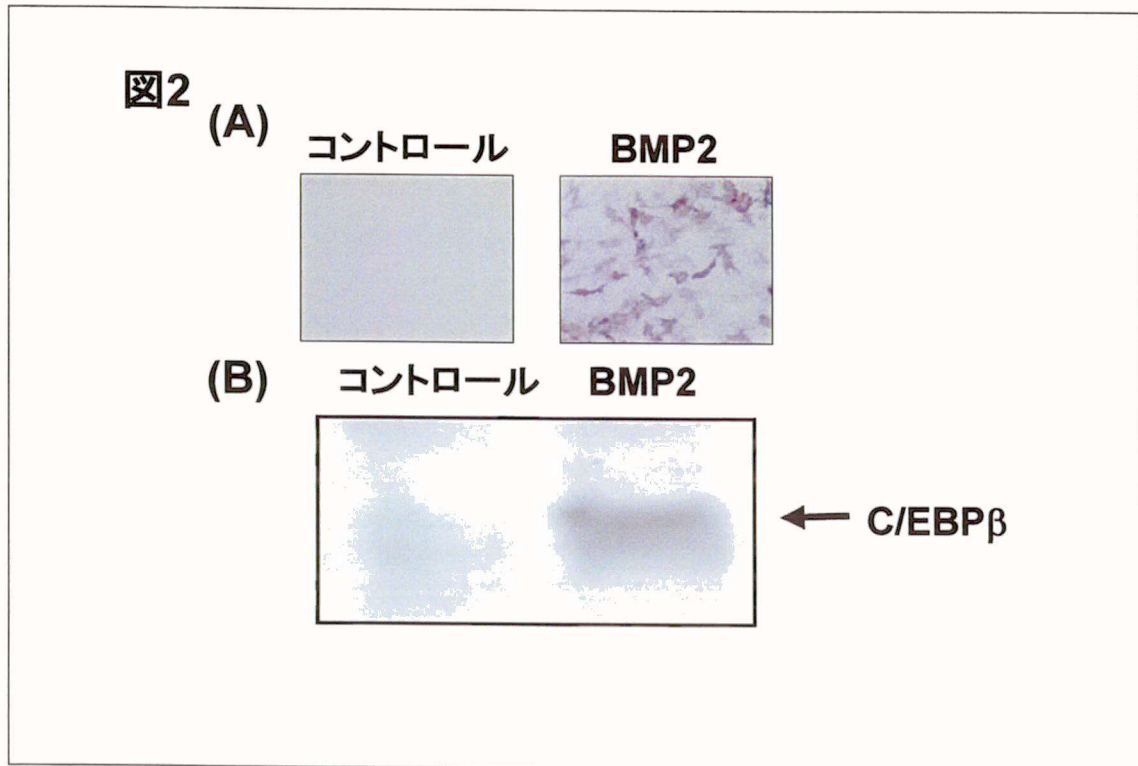


図2 BMP2処理によるC3H10T1/2細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性の促進 (A) およびC/EBP β の発現誘導 (B)

(A) C3H10T1/2細胞をBMP2存在下 (BMP2) あるいはBMP2非存在下(コントロール)で7日間培養した後、3.7%中性ホルマリン-PBS溶液で固定し、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

(B) BMP2存在下あるいはBMP2非存在下(コントロール)で7日間培養したC3H10T1/2細胞を溶解し、SDSサンプルバッファーで処理後、抗C/EBP β 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検索した。

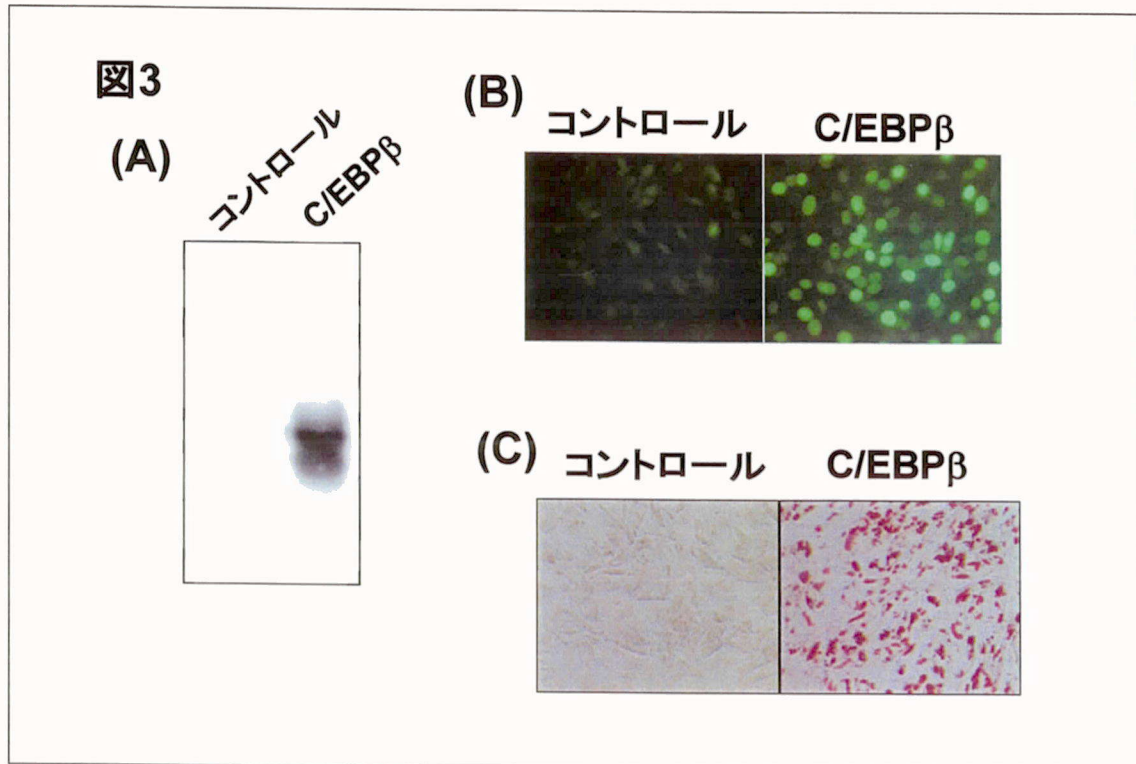


図3 アデノウイルスを用いたC3H10T1/2細胞へのC/EBP β の強制発現 (A,B) および脂肪細胞分化誘導効果 (C)

(A) コントロールウイルス(コントロール)あるいはC/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させたC3H10T1/2細胞を溶解し、SDSサンプルバッファーで処理後、C/EBP β 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検討した。

(B) コントロールウイルス(コントロール)あるいはC/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させたC3H10T1/2細胞を、3.7%中性ホルマリン-PBS溶液で固定し、抗C/EBP β 抗体と反応させ、FITC標識した抗ラビットIgG抗体と反応させた後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(C) C3H10T1/2細胞にコントロールウイルス(コントロール)あるいはC/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させ7日間培養した後、3.7%中性ホルマリン-PBS溶液で固定し、オイルレッドO染色を行った。

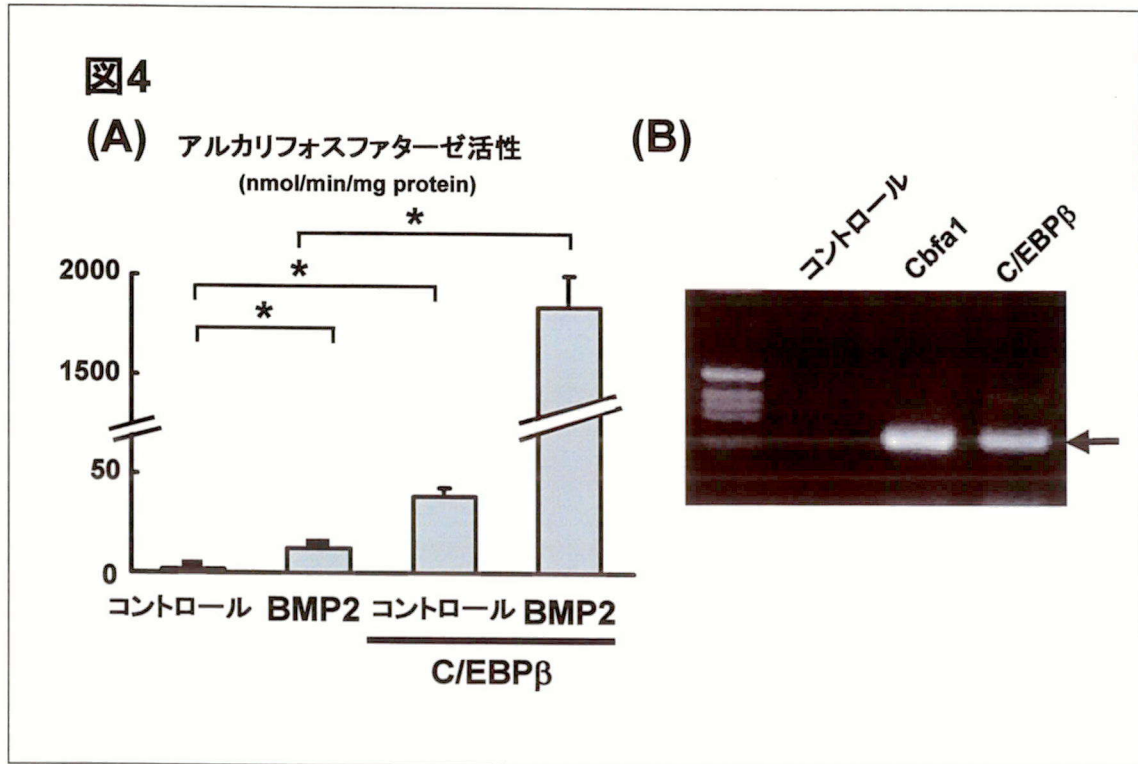


図4 C/EBPβの強制発現によるアルカリフォスファターゼ活性促進作用(A)およびオステオカルシンの発現誘導(B)

(A) コントロールウイルスあるいはC/EBPβアデノウイルスを感染させたC3H10T1/2細胞を、BMP2存在下 (BMP2) あるいは非存在下(コントロール)で7日間培養した後、細胞溶解液を回収しアルカリフォスファターゼ活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す(n=3)。*:p<0.05

(B) コントロールウイルス(コントロール)、Cbfa1アデノウイルス(Cbfa1)、あるいはC/EBPβアデノウイルス(C/EBPβ)を感染させたC3H10T1/2細胞からRNAを精製し、オステオカルシン遺伝子に特異的プライマーを用いてRT-PCRを行い、増幅断片を2%アガロースゲルに展開した。

図5

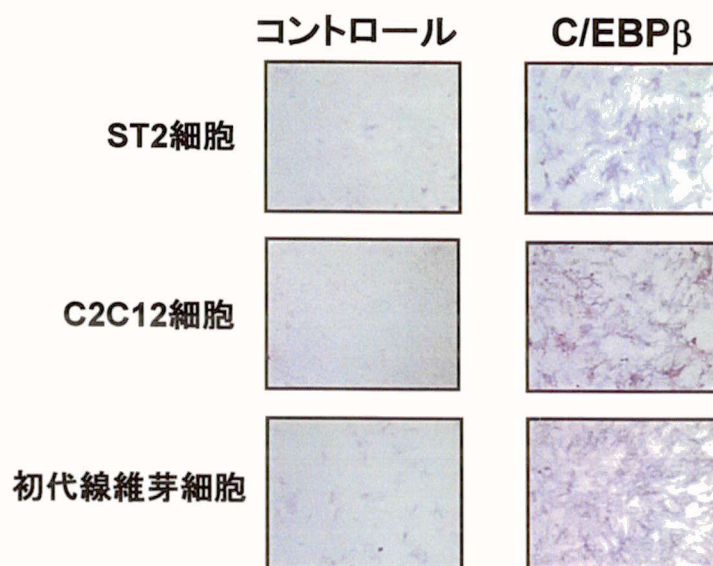


図5 C/EBP β の強制発現による、ST2細胞、C2C12細胞およびマウス頭蓋骨由来初代線維芽細胞におけるアルカリフォスファターゼ活性促進作用

ST2細胞、C2C12細胞およびマウス頭蓋骨由来初代線維芽細胞にコントロールウイルス(コントロール)あるいはC/EBP β アデノウイルス(C/EBP β)を感染させ7日間培養した後、3.7%中性ホルマリン-PBS溶液で固定し、アルカリフォスファターゼ染色を行った。

図6

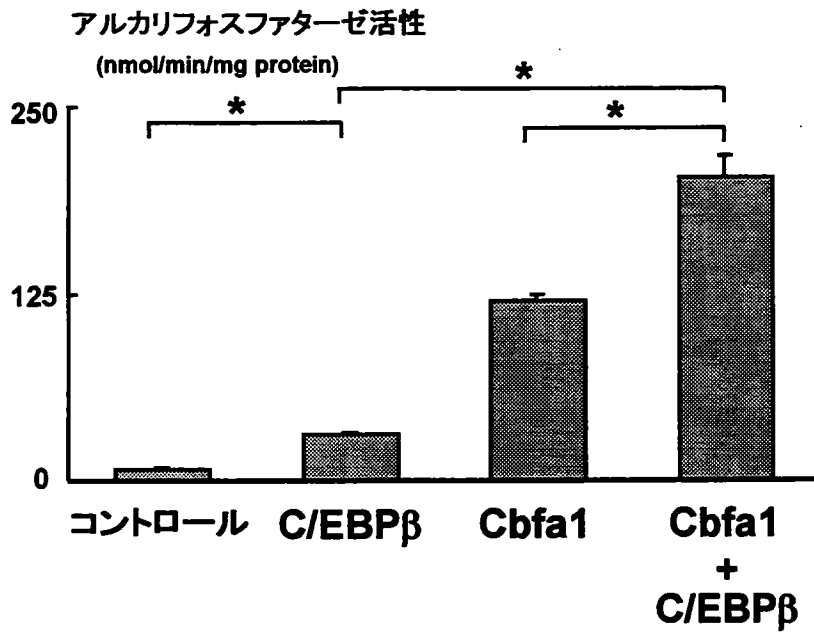


図6 C/EBPβとCbfa1によるアルカリフォスファターゼ活性促進の協調作用
コントロールウイルス(コントロール)、C/EBPβアデノウイルス(C/EBPβ)、Cbfa1アデノウイルス(Cbfa1)あるいはCbfa1アデノウイルスとC/EBPβアデノウイルス(Cbfa1+C/EBPβ)をC3H10T1/2細胞に感染させ7日間培養した後、細胞溶解液を回収しアルカリフォスファターゼ活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す(n=3)。*:p<0.05

図7 オステオカルシンプロモーター活性
(Relative luciferase activity)

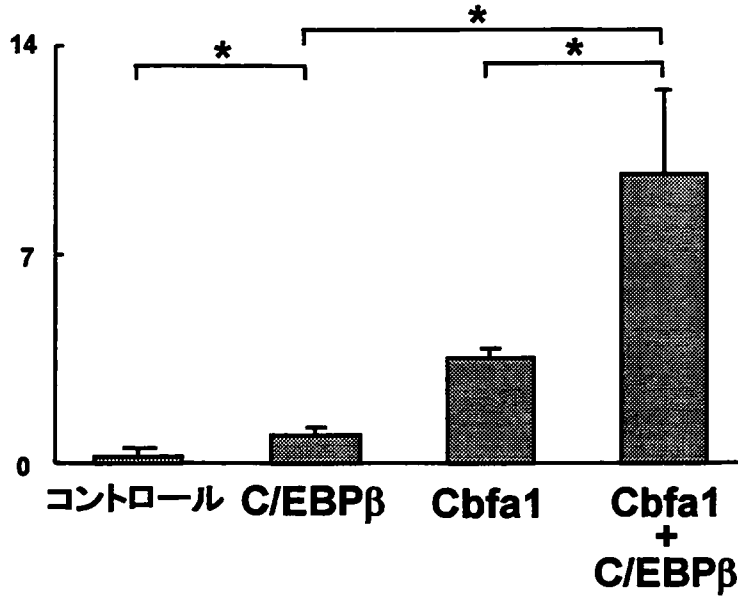


図7 C/EBPβとCbfa1によるオステオカルシンプロモーター活性促進の協調作用

C3H10T1/2細胞に、Cbfb発現ベクターとオステオカルシンプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子をFugene6により遺伝子導入し、12時間後コントロールウイルス(コントロール)、C/EBPβアデノウイルス(C/EBPβ)、Cbfa1アデノウイルス(Cbfa1)あるいはCbfa1アデノウイルスとC/EBPβアデノウイルス(Cbfa1+C/EBPβ)を感染させた。ルシフェラーゼ遺伝子導入48時間後に細胞溶解液を回収し、ルミノメーターにより転写活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す(n=3)。*:p<0.05

図8

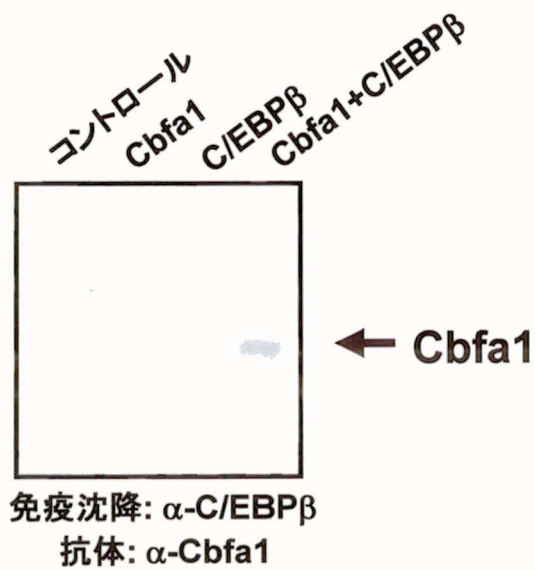


図8 C/EBPβとCbfa1の物理的結合

コントロールウイルス(コントロール)、C/EBPβアデノウイルス(C/EBPβ)、Cbfa1アデノウイルス(Cbfa1)あるいはCbfa1アデノウイルスとC/EBPβアデノウイルス(Cbfa1+C/EBPβ)を感染させたCOS7細胞の細胞内たんぱく質を、抗C/EBPβ抗体を用いて免疫沈降した後、抗Cbfa1抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検索した。

図9

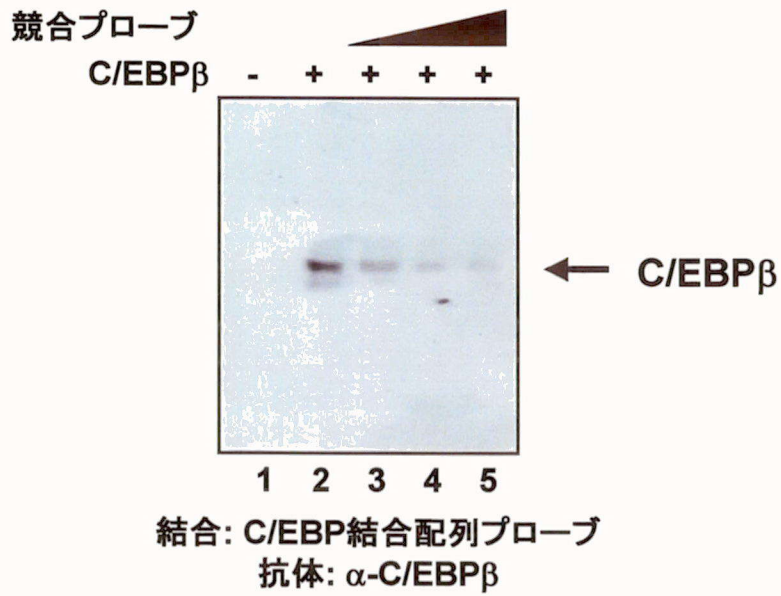


図9 C/EBP β のオステオカルシンプロモーター領域への結合

コントロールウイルス(レーン1)、あるいはC/EBP β アデノウイルス(レーン2、3、4、5)を感染させたCOS7細胞から全細胞たんぱく質抽出液を作製し、ビオチン標識したC/EBP結合配列を用いてバインディングアッセイを行った。さらに、2 μ g、10 μ gおよび20 μ gのビオチン非標識C/EBP結合配列オリゴヌクレオチド(競合プローブ)を反応させ、その阻害効果を検討した。

図10

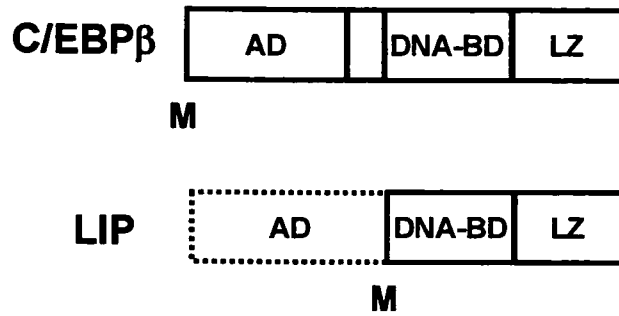


図10 C/EBPβおよびアイソフォームLIPの構造図

C/EBPβ遺伝子およびLIP遺伝子の一次構造を示す。図中ADは転写活性化領域、DNA-BDはDNA結合領域を、LZはロイシンジッパー領域およびMは開始コードンMethioninを表す。

図11

(A) オイルレッドO染色陽性部面積 ($\times 10^{-3}\text{mm}^2$) (B) オイルレッドO染色陽性部面積 ($\times 10^{-3}\text{mm}^2$)

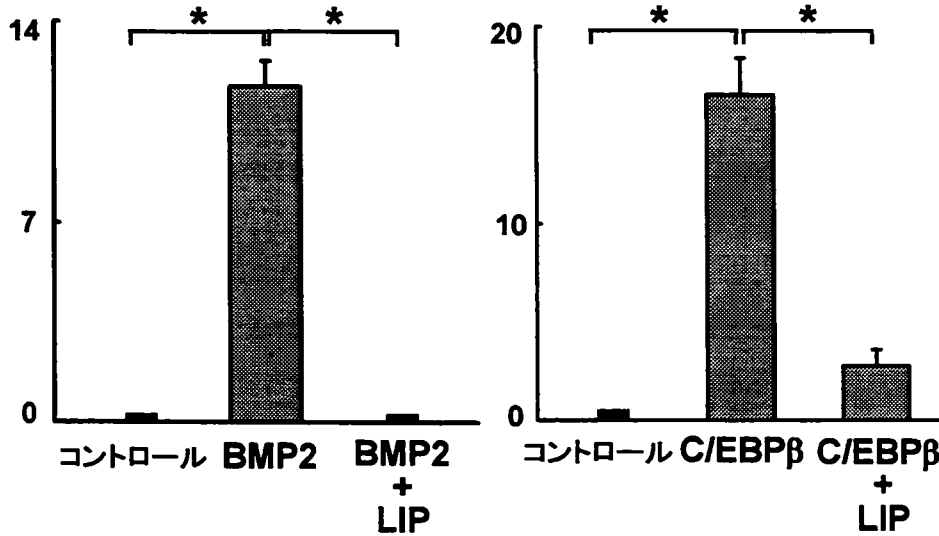


図11 LIPの強制発現による脂肪細胞分化抑制作用

(A) コントロールウイルスあるいはLIPアデノウイルス(LIP)を感染させたC3H10T1/2細胞を、BMP2存在下(BMP2)あるいは非存在下(コントロール)で14日間培養した後オイルレッドO染色を行い、オイルレッドO染色陽性部分の面積を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す($n=3$)。*: $p<0.05$

(B) C3H10T1/2細胞にコントロールウイルス(コントロール)、C/EBPβアデノウイルス(C/EBPβ)あるいはC/EBPβアデノウイルスとLIPアデノウイルス(C/EBPβ+LIP)を感染させ、7日間培養した後オイルレッドO染色を行い、オイルレッドO染色陽性部分の面積を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す($n=3$)。*: $p<0.05$

図12

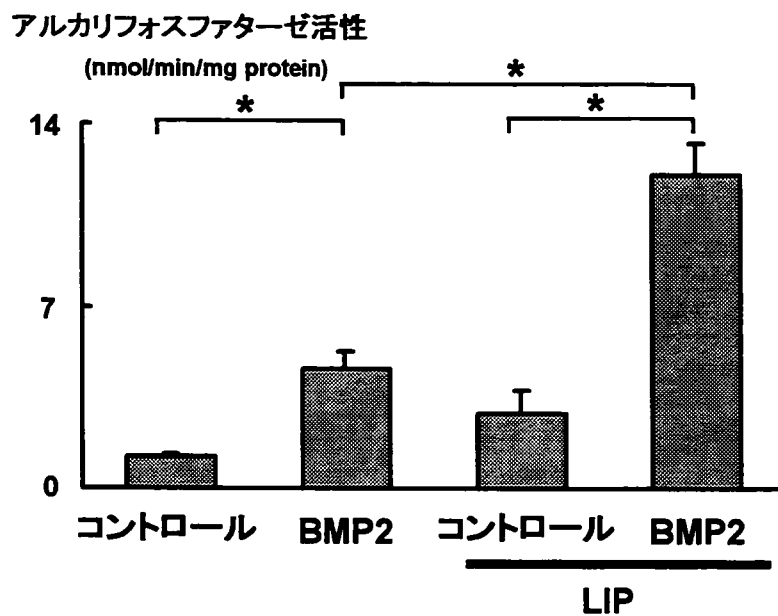


図12 LIPの強制発現によるBMP2依存性骨芽細胞分化促進作用

コントロールウイルスあるいはLIPアデノウイルス(LIP)を感染させたC3H10T1/2細胞を、BMP2存在下(BMP2)および非存在下(コントロール)にて7日間培養した後、細胞溶解液を回収し、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す(n=3)。*:p<0.05

図13 PPAR γ 2プロモーター活性
(Relative luciferase activity)

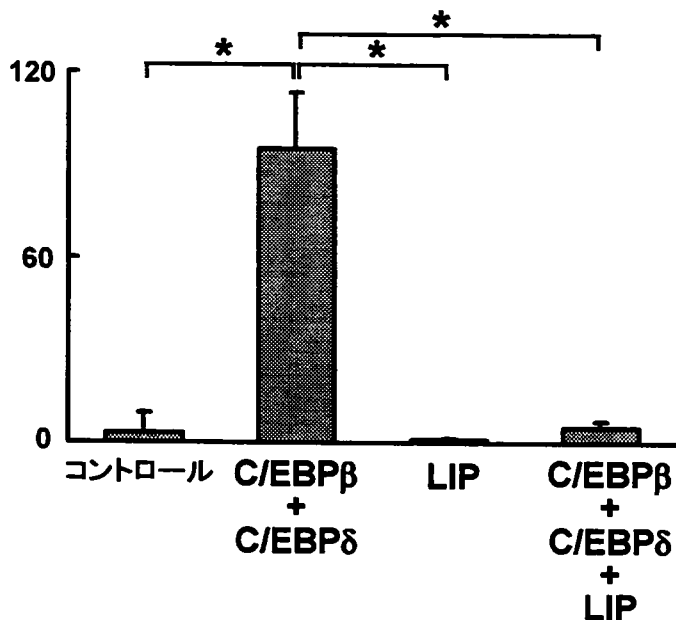


図13 LIPの強制発現によるPPAR γ 2プロモーター活性抑制作用

PPAR γ 2遺伝子のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子をFugene6によりC3H10T1/2細胞に遺伝子導入し、12時間後コントロールウイルス(コントロール)、C/EBP β アデノウイルスとC/EBP δ アデノウイルス(C/EBP β +C/EBP δ)、LIPアデノウイルス(LIP)、あるいはC/EBP β アデノウイルス、C/EBP δ アデノウイルスおよびLIPアデノウイルス(C/EBP β +C/EBP δ +LIP)を感染させた。ルシフェラーゼ遺伝子導入48時間後に細胞溶解液を回収し、ルミノメーターにより転写活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す(n=3)。*:p<0.05

図14

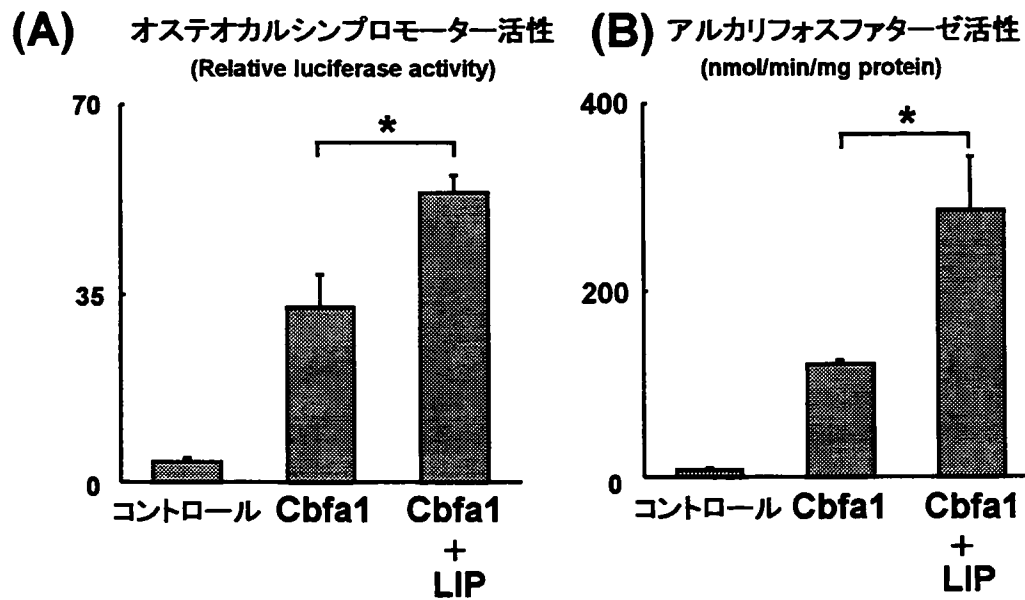


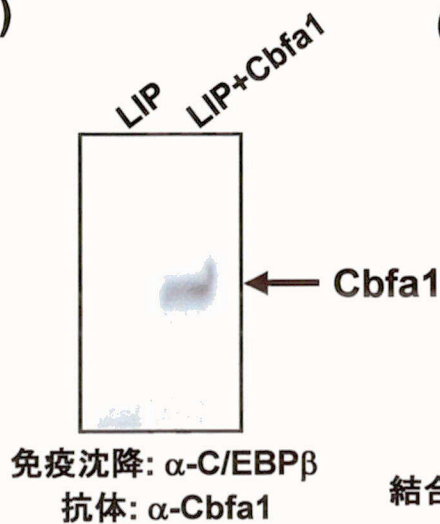
図14 LIPの強制発現によるCbfa1依存性骨芽細胞分化誘導増強作用

(A) C3H10T1/2細胞に、Cbfb発現ベクターとオステオカルシンプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ遺伝子をFugene6により遺伝子導入し、12時間後コントロールウイルス(コントロール)、Cbfa1アデノウイルス(Cbfa1)あるいはCbfa1アデノウイルスとLIPアデノウイルス(Cbfa1+LIP)を感染させた。ルシフェラーゼ遺伝子導入48時間後に細胞溶解液を回収し、ルミノメーターにより転写活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す(n=3)。*:p<0.05

(B) C3H10T1/2細胞に、コントロールウイルス(コントロール)、Cbfa1アデノウイルス(Cbfa1)あるいはCbfa1アデノウイルスとLIPアデノウイルス(Cbfa1+LIP)を感染させ7日間培養した後、細胞溶解液を回収しアルカリフォスファターゼ活性を測定した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す(n=3)。*:p<0.05

図15

(A)



(B)

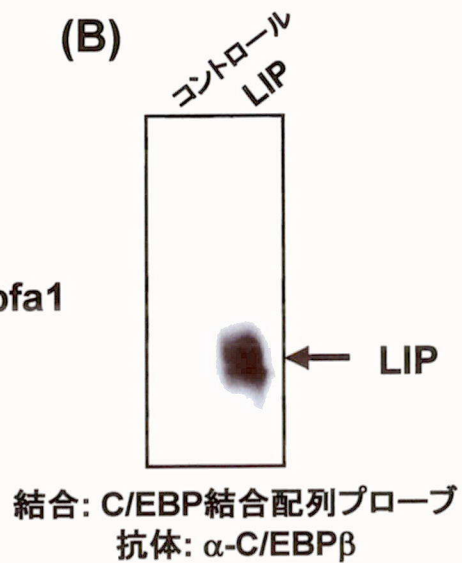


図15 LIPのCbfa1への物理的結合およびオステオカルシンプロモーター領域への結合

(A) LIPアデノウィルス(LIP)あるいはCbfa1アデノウィルスとLIPアデノウィルス(LIP+Cbfa1)を感染させたCOS7細胞の細胞内たんぱく質を、抗C/EBP β 抗体を用いて免疫沈降した後、抗Cbfa1抗体を用いたウェスタンブロッティング法により検索した。

(B) コントロールウィルス(コントロール)、LIPアデノウィルス(LIP)を感染させたCOS7細胞を溶解し、ビオチン標識したC/EBP結合配列を用いてバインディングアッセイを行った。

図16

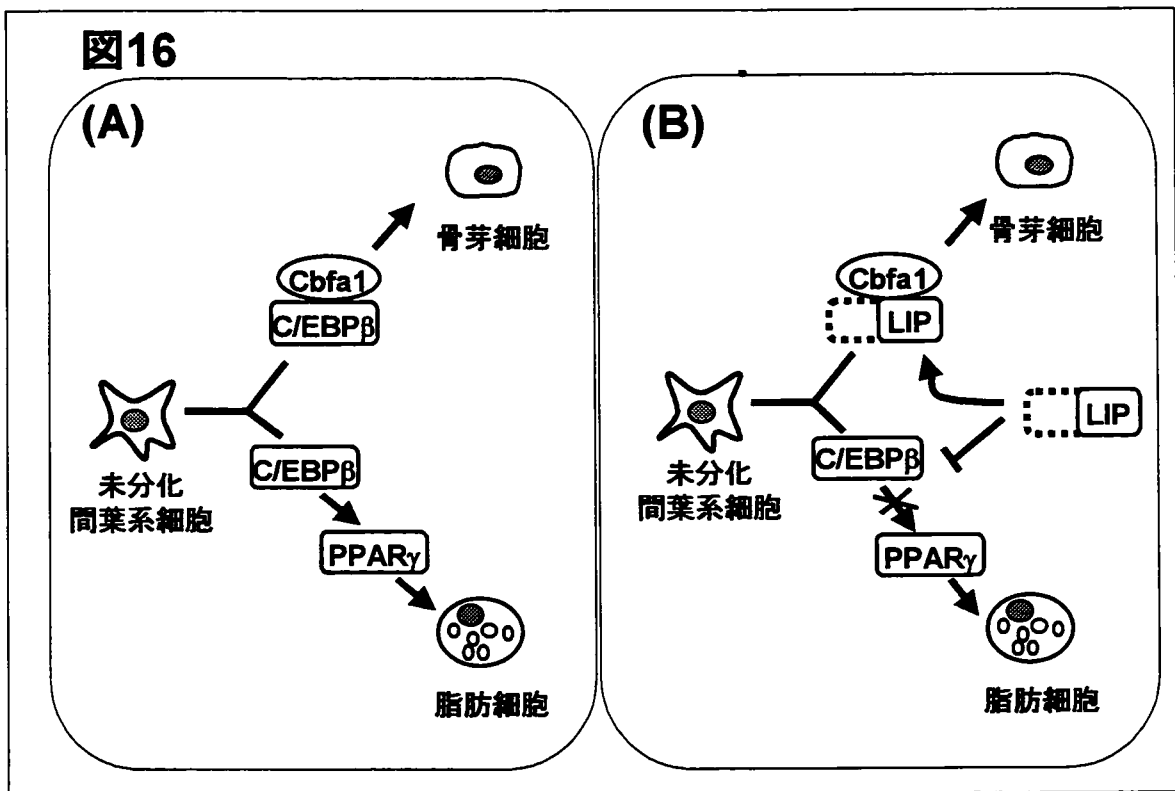


図16 C/EBP β およびアイソフォームLIPによる、未分化間葉系細胞から骨芽細胞および脂肪細胞への分化制御メカニズムの模式図

PPAR γ は脂肪細胞分化の最終過程を促進する転写因子であるが、その発現はC/EBP β によってコントロールされていることが知られている¹⁷⁾。C/EBP β はCbfa1と協調することにより骨芽細胞分化を促進する(A)。LIPはC/EBP β に対してドミナントネガティブに作用してPPAR γ の発現を阻害することにより脂肪細胞分化を抑制する。一方、Cbfa1と協調して骨芽細胞分化を促進する(B)。これらの結果より未分化間葉系細胞の骨芽細胞および脂肪細胞への分化は、各々の分化に特有のC/EBP β アイソフォームが関与することが示唆される。図中→：促進；⊣：阻害を各々示す。