



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過程における転写因子C/EBP $\alpha$ の役割の解明
Author(s)	植田, 未央
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46393">https://hdl.handle.net/11094/46393</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	植田 未来
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 20228号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
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過程における転写因子 C/EBP $\alpha$ の役割の解明
論文審査委員	(主査) 教授 米田 俊之 (副査) 教授 恵比須繁之 助教授 原田 英光 講師 山田 聰

## 論文内容の要旨

## 〈目的〉

未分化間葉系細胞を起源とする骨芽細胞および脂肪細胞の分化バランスの調節は骨量の調節に密接に関係する。最近、脂肪細胞分化の最終段階において重要な役割を演じる転写因子 C/EBP  $\alpha$  が、骨芽細胞分化をも誘導することが示された。しかしながら、C/EBP  $\alpha$  の骨芽細胞分化誘導のメカニズムは明らかではない。C/EBP  $\alpha$  には転写活性領域を欠失したアイソフォーム、p20 および p30 が同定されているが、骨芽細胞分化および脂肪細胞分化における役割は不明である。本研究においては、骨芽細胞分化および脂肪細胞分化過程における C/EBP  $\alpha$ 、p20 および p30 の各々の役割を検討することにより、骨芽細胞ならびに脂肪細胞への分化制御の分子メカニズムの解明を試みた。

## 〈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ォスファターゼ (ALP) 活性およびオステオカルシン (OC) の発現、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。OC の産生は ELISA を用いて定量した。

② アデノウイルス発現系による C/EBP  $\alpha$ 、p20、p30、Runx2、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$ 、Osterix、ドミナントネガティブ C/EBP あるいは PPAR  $\gamma$  の強制発現

アデノウイルスベクターに C/EBP  $\alpha$ 、p20、p30、Runx2、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$ 、Osterix、ドミナントネガティブ C/EBP あるいは PPAR  $\gamma$  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。

③ C/EBP  $\alpha$ 、p20 および p30 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。

## 〈結果〉

① 骨芽細胞における C/EBP  $\alpha$  の発現

3 日齢マウス頭蓋骨より採取した初代培養骨芽細胞において、C/EBP  $\alpha$  の発現を認めた。強力な骨形成因子、

BMP2 添加により C/EBP  $\alpha$  の発現が増加した。したがって C/EBP  $\alpha$  が骨芽細胞分化に関与することが示唆された。

② 骨芽細胞分化に対する C/EBP  $\alpha$ 、p20 および p30 の役割

アデノウイルスを用いて C3H10T1/2 細胞に C/EBP  $\alpha$ 、p20 あるいは p30 を強制発現させて骨芽細胞分化に対する役割を検討した結果、C/EBP  $\alpha$  は骨芽細胞分化を強く誘導した。また、p30 は軽度に骨芽細胞分化を誘導したが、p20 はほとんど影響を及ぼさなかった。さらに、C/EBP  $\alpha$ 、p20 および p30 は、BMP2 あるいは Runx2 によって促進される骨芽細胞分化誘導作用を増強した。転写レベルにおいても C/EBP  $\alpha$ 、p20 および p30 は Runx2 と協調して、OC プロモーターの転写活性を促進することが示された。さらに免疫共沈降法の結果、C/EBP  $\alpha$ 、p20 および p30 は Runx2 と物理的に結合することが示された。

③ 骨芽細胞分化における C/EBP ファミリーの関与

ドミナントネガティブ C/EBP (A-Zip) は C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$  および C/EBP  $\delta$  による骨芽細胞分化誘導を完全に阻害した。また、A-Zip は BMP2 による骨芽細胞分化誘導も完全に阻害した。以上の結果より、C/EBP ファミリーは骨芽細胞分化において重要な役割を演じていることが示唆された。

④ 脂肪細胞分化に対する p20 および p30 の役割

p20 および p30 は C/EBP ファミリーによる脂肪細胞分化を阻害した。また、PPAR  $\gamma$  プロモーター転写活性測定およびウェスタンブロッティングにより、脂肪細胞分化後期において重要な役割を演じる PPAR  $\gamma$  の発現を p20 および p30 が阻害することが示された。したがって、C/EBP ファミリー特異的に転写レベルでドミナントネガティブに作用し、脂肪細胞分化を抑制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  $\alpha$ 、p20 および p30 が Runx2 の転写共役因子として骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。一方、脂肪細胞分化に対しては、p20 および p30 は C/EBP ファミリーのドミナントネガティブタイプとして作用し、脂肪細胞分化を抑制することが明らかとなった。したがって、C/EBP  $\alpha$ 、p20 および p30 は未分化間葉系細胞の骨芽細胞および脂肪細胞分化方向の決定の役割を担う重要な分子であることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、骨形成に重要な役割を演じる未分化間葉系細胞の骨芽細胞、ならびに脂肪細胞への分化の分子メカニズムについて検討を行ったものである。

その結果、転写因子 C/EBP  $\alpha$ 、およびそのアイソフォームである、p20 と p30 が、骨形成に必須の転写因子 Runx2 と共同して骨芽細胞分化を誘導すること、一方、脂肪細胞分化に対しては p20 と p30 は強い抑制作用を示すことが明らかとなった。

以上の結果は、未分化間葉系細胞の分化を介した骨形成の分子メカニズムに関する新たな知見を提供し、骨形成が低下するさまざまな骨疾患の病態の解明、ならびに新規の治療法開発の指針となるものであり、博士（歯学）を授与するに値すると認める。