



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Regulatory mechanisms underlying necdin-mediated terminal differentiation of mesenchymal stem cells   |
| Author(s)    | 藤原, 一志郎   |
| Citation     | 大阪大学, 2012, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/59442">https://hdl.handle.net/11094/59442</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 <a href="#"></a> 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

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 藤原 一志郎   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(理学)   |
| 学位記番号      | 第 25208 号  |
| 学位授与年月日    | 平成24年3月22日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>理学研究科生物科学専攻  |
| 学位論文名      | Regulatory mechanisms underlying <i>necdin</i> -mediated terminal differentiation of mesenchymal stem cells<br>( <i>Necdin</i> による間葉系幹細胞の最終分化制御機構) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 吉川 和明<br>(副査)<br>教授 関口 清俊 教授 岡田 雅人  |

### 論文内容の要旨

*Necdin* は、マウス胚性癌細胞 P19 細胞を神経分化させた際に誘導される新規蛋白質として同定された。*Necdin* は癌抑制遺伝子 p53 や細胞周期調節因子 E2F といった様々な蛋白質と相互作用することで細胞増殖や分化を制御している。また *necdin* は、神経細胞のみならず、骨格筋細胞の前駆細胞や造血幹細胞に発現しており、その増殖や分化を制御することが報告されている。本研究では脂肪組織由来の間葉系幹細胞の最終分化過程における *necdin* の機能について検討した。

脂肪細胞は脂肪組織内の間質・血管系画分(Stromal-Vascular fraction; SVF)に存在する脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived stem cells; ASCs)を起源とすると考えられている。また SVF 中において、間葉系幹細胞の性質を示す細胞集団は、単鎖膜貫通型リン酸化糖蛋白質 CD34 や GPI アンカー型蛋白質 *Sca-1* を発現していることが知られている。そこで脂肪組織において CD34 や *Sca-1* を発現している ASCs が *necdin* を発現しているか免疫組織化学染色法により検討したところ、脂肪組織の間質や血管周囲において CD34、*Sca-1* 陽性の細胞が観察され、これらの細胞は *necdin* 陽性であった。このことから *necdin* が ASCs に発現し、脂肪細胞分化を制御する可能性が示唆される。次に *necdin* shRNA を発現するレンチウイルスベクターをマウスの脂肪組織に直接感染させて内在性 *necdin* の発現を抑制した後、高脂肪食で飼育したところ、脂肪組織が顕著に増大していた。このときレンチウイルスベクターは、成熟脂肪細胞だけでなく、ASCs である CD34 や *Sca-1* 陽性細胞にも発現していた。このことから *necdin* は、ASCs の脂肪細胞分化を負に制御するものと考えられる。次に、生体内における *necdin* の脂肪細胞分化への影響を調べるために、生後5週齢の *necdin* 遺伝子欠損マウスに高脂肪食を9週間摂取させると、野生型マウスに比べ体重が有意に増加し、副睾丸周囲脂肪や鼠径部周囲脂肪などの内臓、皮下脂肪が共に顕著に増加していた。これら脂肪組織における脂肪細胞の直径や細胞密度には、野生型と *necdin* 欠損マウス間での差は認められなかったため、*necdin* 欠損マウスの脂肪組織では脂肪

細胞数の増加が起こっていることが明らかになった。また、性成熟過程を終了したマウスを同様に高脂肪食下で飼育したところ、野生型と *necdin* 欠損マウスの体重増加に有意な差は認められなかった。このことから *necdin* は幼少期における脂肪細胞分化を制御することによって脂肪細胞数を調節していると考えられる。次に *necdin* 欠損における脂肪細胞数の増加が細胞自立的であるか検討するために、野生型と *necdin* 欠損マウスから ASCs を単離し、培養条件下で脂肪細胞へ分化させた。分化過程における細胞数の変化を比較したところ、*necdin* 欠損細胞は野生型細胞と比べて総細胞数が有意に増加していた。そこで、脂肪分化に伴う細胞増殖過程における ASCs 中の脂肪前駆細胞の増殖能を調べるために、細胞核 DNA へのプロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込みを行い、フローサイトメーターで解析したところ、*necdin* 欠損 ASCs では野生型 ASCs と比較して BrdU 陽性の細胞数が有意に増加していた。同時に、*necdin* の欠損がアポトーシスに与える影響を Annexin V の取り込みによって検討した結果、野生型細胞と *necdin* 欠損細胞において有意な差は認められなかった。次に、野生型、*necdin* 欠損細胞を脂肪細胞へと分化させ、脂肪細胞の分化マーカーである PPAR $\gamma$  や C/EBP $\alpha$  の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法によって検討したところ、*necdin* 欠損細胞ではこれらの発現量は顕著に上昇していた。これらの結果から、*necdin* 欠損細胞では、脂肪細胞分化時における増殖が亢進し、アポトーシス等の影響を受けずに脂肪細胞数を増加させていると考えられる。さらに分化過程における *necdin* の細胞内局在を検討したところ、*necdin* は未分化状態では主に核に存在していたが、分化刺激に伴いその局在が細胞質に移動していた。このことから、核に局在する *necdin* が ASCs の増殖を制御しているものと推定される。

従来、脂肪組織の増大は、細胞内脂肪蓄積による脂肪細胞自身の肥大化(hypertrophy)が主な原因と考えられてきた。これに対して、本研究によって、*necdin* が欠損する状態では、脂肪細胞数の増加(hyperplasia)によって脂肪組織が増大することが明らかになった。つまり、成体における脂肪細胞数の決定には、発達過程における脂肪組織中の間葉系幹細胞の増殖制御が重要であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、脂肪組織中に存在する多分化能をもつ間葉系幹細胞が最終分化によって白色脂肪細胞になる系を用いて、*Necdin* による組織幹細胞の増殖と最終分化の制御機構を明らかにしたものである。研究には、ウイルスベクターによる遺伝子導入系、*Necdin* 遺伝子変異マウス系、および成体脂肪組織から調製した間葉系幹細胞培養系など、種々の実験系において多面的な解析が用いられている。本論文は、これらの実験系で得られたデータを統合して、間葉系幹細胞に発現している内在性 *necdin* が細胞増殖と分化に対して抑制作用をもつことを明らかにしたものであり、当該研究分野で行われてきた研究と比較して独自性と新規性が認められる。従来、脂肪組織の増大は細胞内脂肪蓄積による脂肪細胞自身の肥大化が主因と考えられてきたが、本研究によって、脂肪組織中に存在する間葉系幹細胞の増殖が亢進することによって脂肪細胞数の増加が起こり、その結果として脂肪組織が増大するという機構が存在

することが実験的に証明された。本研究は、体性幹細胞の増殖制御によって最終分化細胞数が決定されるという普遍的機構の解明にも貢献するものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。