

論文内容要旨

Heterogeneity of osteoblasts and their potential
for adipogenic transdifferentiation

(骨芽細胞の多様性と脂肪細胞への分化転換についての検討)

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(応用生命科学部門 歯科矯正学)

副指導教員：吉子 裕二教授

(基礎生命科学部門 硬組織代謝生物学)

副指導教員：上田 宏准教授

(応用生命科学部門 歯科矯正学)

沖田 紗季

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

骨芽細胞は RUNX2, OSTERIX などの転写因子の制御下, 間葉系幹細胞より分化する. 骨芽細胞は約半数がアポトーシスにより死滅し, 一部は自ら形成した骨基質に埋入して骨細胞となるほか, 残りの 10%は骨表面にとどまり休止状態 (bone lining cells) となる. また, 骨芽細胞の分化初期において, 少なくとも一部は脂肪細胞と前駆細胞を共有することが知られており, 我々もマウス頭蓋骨由来細胞の *Runx2* 発現細胞が脂肪分化の転写因子 *Pparg* を発現し, 脂肪細胞への分化転換能を有することを報告した. このように, 多様な運命をたどる骨芽細胞はヘテロな細胞集団であると考えられるが, その実態はほとんど明らかにされていない. 我々は, マウス骨芽細胞を用い, 単一細胞レベルで遺伝子発現プロファイルを作製し, 多様性の分子基盤を明らかにすることを試みた. また, 同細胞の脂肪細胞への分化能についても検討を加えた.

I 型コラーゲン (*Col1a1*) プロモーター (2.3 kb) 制御下で骨芽細胞に蛍光タンパク質 Venus を発現する遺伝子改変マウスを作製した. 同マウス新生仔の頭頂骨をコラゲナーゼ/EDTA 消化し, 連続的に細胞分画を回収した. 各分画の Venus 陽性細胞の割合を解析するとともに, それぞれを骨分化誘導培地で培養し, 骨芽細胞優位な細胞分画を同定した. 骨芽細胞優位な分画から FACS により Venus 陽性細胞のみを回収し, C1 Single-cell Auto Prep システム (フリューダ임社) に供した. 同デバイスで単一細胞を捕捉し, 個々の単一細胞から RNA 抽出, cDNA 合成, cDNA 増幅を行なった. その後 cDNA ライブラリーを作製し, 次世代シーケンサーを用いて RNA-seq 解析を行い, 遺伝子発現をプロファイリングした. 得られた 90 細胞のプロファイル进行分析したところ, 全ての細胞に *Col1a1*, *Col1a2*, *Bsp* などの骨芽細胞マーカー遺伝子の発現を認めた. 階層的クラスター分析をもとに遺伝子発現の近似したグループに分類すると, 2つの集団に分類され, そのうちの1つはさらに5つの亜集団に分類された. 主たる2つの集団の一方は既知の骨芽細胞のプロファイルと一致したが, 他方は骨芽細胞のプロファイルを保有しながら, 幹細胞マーカーである *Cxcl12* や *Cd34* の発現も認められた.

脂肪細胞のマーカー遺伝子に焦点を絞ると, 脂肪細胞の初期分化を促進する転写因子 *Klf4*, *Klf6*, *Klf9*, *Cebpb*, *Cebpd* はそれぞれ 91%, 100%, 73%, 78%, 31% の細胞で確認された. 後期分化を促進する転写因子 *Klf5* は 13% の細胞のみで発現し, 同じく後期分化を促進する転写因子 *Klf15* を発現した細胞は認められなかった. 一方, 脂肪分化を抑制する転写因子 *Klf2*, *Klf3*, *Klf7*, *Jun* はそれぞれ 44%, 61%, 29%, 87% の細胞に認められた. 脂肪細胞分化のマスター転写因子 *Cebpa* は 12 細胞 (13%) に発現しており, そのうち 5 細胞では *Cebpa* の発現を抑制する *Klf3* と *Klf7* の発現は認められなかった. また, 同じく脂肪細胞分化のマスター転写因子である *Pparg* は 3 細胞 (3%) に発現しており, 全ての細胞で

Pparg の発現を抑制する *Klf2* の発現は認められなかった。

このように、骨芽細胞を単一細胞レベルで解析すると比較的高い頻度で脂肪細胞分化関連遺伝子を発現していることが明らかとなった。そこで、Venus 陽性の成熟骨芽細胞を骨分化誘導培地で 24 時間培養し、RUNX2 と PPAR γ の免疫染色を行った。RUNX2 は 95.8%が陽性で、いずれも核に局在を認めた。RUNX2 陽性細胞のうち、12.6%は細胞質に PPAR γ が局在し、2.4%の細胞は RUNX2 と PPAR γ が核内に共局在していた。ロシグリタゾン (PPAR γ の合成リガンド) 存在下で培養すると、培養 3 日目で RUNX2 と PPAR γ が核内に共局在する細胞の割合が増加した。さらに培養を継続すると RUNX2 陰性で PPAR γ が核に局在する細胞が 12.9%に増加し、脂肪滴を含む細胞が多く認められた。培養 13 日目に脂肪細胞マーカーの Perilipin にて免疫染色したところ、脂肪滴が Perilipin 陽性を示し、Venus 陽性の成熟骨芽細胞が脂肪細胞へと分化転換したことが示された。

以上、単一細胞レベルの遺伝子発現プロファイリングにより、骨芽細胞は多様性に富む細胞集団で構成されることが明らかとなった。これらの細胞の一部は、脂肪細胞前駆細胞としての性質を維持しているものと推察され、このような細胞が PPAR γ の活性化により脂肪細胞へと分化転換すると考えられる。