

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 歯学 ）	氏名	沖田 紗季
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 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)			
論文審査担当者			
主 査	教授 内田 隆	印	
審査委員	教授 香西 克之		
審査委員	教授 宿南 知佐		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>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，マウス頭蓋骨由来細胞の <i>Runx2</i> 発現細胞が脂肪分化の転写因子 <i>Pparg</i> を発現し，脂肪細胞への分化転換能を有することも報告されている。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。そこで，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。</p> <p>I 型コラーゲン (<i>Col1a1</i>) 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（フリューダイン社）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 <i>Col1a1</i>, <i>Col1a2</i>, <i>Bsp</i> 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，そのうちの一つはさらに 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</p>			

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 陽性細胞の減少と PPAR γ が核に局在する細胞の増加を認めた。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。

以上の結果から、本論文は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した。また、これらの細胞の一部が、脂肪細胞前駆細胞としての性質を維持し、PPAR γ の活性化により脂肪細胞へと分化することを示唆する所見を得た。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。