

## 論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 CCAAT/エンハンサー結合タンパクファミリー  
による軟骨細胞の分化制御

氏名 大隈 知威

### 【要旨】

軟骨細胞の分化は脊椎動物の四肢骨格成長において重要な役割を果たしている。軟骨分化に関連する遺伝子の異常による成長障害をきたす疾患が多く知られており、また当教室で長年取り組んでいるテーマである国民病とも呼ぶべき変形性関節症発症の大きな要因は永久軟骨である関節軟骨の肥大分化とそれに続発する異常な軟骨内骨化である。しかし、現在のところ軟骨細胞の分化を制御するメカニズムについては未だ解明されていない部分が多い。軟骨細胞の発生・分化および軟骨内骨化に至るまでの過程におけるシグナルネットワークについて更なる知見が必要と考えられる。

CCAAT/エンハンサー結合タンパク質（以下C/EBP）ファミリーは、C末端に塩基性ロイシンジッパーを持ち、ヘテロダイマーあるいはホモダイマーを形成してDNAに結合し、様々な細胞において炎症・増殖・代謝・分化・細胞増殖などに協調的に関与する重要な転写因子群である。C/EBPファミリーにはC/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  の6種類のアリソフォームが知られており、その内C/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  の4種類が転写活性化ドメインを有する。

我々はこれまでに、軟骨細胞においてC/EBP  $\beta$  がMMP13の発現を誘導し骨格発達や変形性関節症の進行を制御すること (Hirata, Hum Mol Genet., 2012)、C/EBP  $\beta$  がサイクリン依存性キナーゼ阻害遺伝子p57kip2を誘導し細胞周期を制御すること (Hirata, PloS One, 2009)を報告した。しかし軟骨細胞におけるC/EBPファミリー全体の役割は未だに明らかとなっていない。本研究では軟骨細胞の分化制御におけるC/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  の発現と機能を比較・検討した。

マウス初代軟骨培養細胞におけるmRNA発現量をRT-PCRで測定したところ、C/EBP  $\beta$ ,  $\delta$  は豊富に発現しており、C/EBP  $\alpha$  は中等度、C/EBP  $\epsilon$  の発現はわずかであった。そこで対象をC/EBP  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  3種類に絞り、マウス胎児成長板での発現を免疫組織染色で検討したところ、C/EBP  $\beta$ ,  $\delta$  は前肥大層から肥大層に、C/EBP  $\alpha$  は増殖層から前肥大層に発現していた。マウス軟骨細胞株ATDC5にC/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  をレトロウイルスを用いて安定導入し、インスリンを用いて軟骨内骨化分化誘導モデルを作成したところ、いずれにおいてもCol2a1, Aggrecan, Sox9といった軟骨細胞のanabolic factorでもある初期分化マーカーの発現が低下し、Mmp13, Vegfa, Col10a1といったcatabolic factorでもある肥大分化マーカーの発現が上昇した。また細胞増殖能をCCK-8を用いて観察したところ、いずれの強制発現系でも細胞増殖能が低下した。このようにC/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  では類似した機能を持つことが示された。

一方、RNA干渉による各ファミリーの抑制系を作成したところ、強制発現系の結果に反してC/EBP  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  いずれにおいても初期分化マーカー、肥大分化マーカーとも目立った影響が見られなかった。

かつて我々は、C/EBP  $\beta$   $-/-$ マウスは胎生期に骨格の成長障害を示すが、生後速やかに成長障害が解消されることを報告した。C/EBP  $\beta$  に類似する機能を持ち軟骨細胞でC/EBP  $\beta$  に次いで豊富に発現しているC/EBP  $\delta$  がその補完作用を有している可能性を考え、C/EBP  $\delta$   $-/-$ マウスの解析を行った。しかしC/EBP  $\delta$   $-/-$ マウスでは成長障害が見られず、C/EBP  $\beta$   $-/-$ ; C/EBP  $\delta$   $-/-$ マウスの作出は未だ成功していない。

そこでこれらC/EBPの機能を同時に抑制した際の効果を知るために、C/EBPファミリー共通のドミナントネガティブである人工遺伝子A-C/EBPを用いることとした。A-C/EBPは、C/EBPファミリー特有のジッパードメイン構造とヘテロダイマーを形成してDNA結合能を喪失させることが知られており、実際にC/EBPファミリーと結合することを哺乳動物細胞ツーハイブリッドシステムおよび共免疫沈降法で確認した。またC/EBP  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  が有するMMP13プロモーター活性を、A-C/EBPが用量依存的に競合阻害することをルシフェラーゼアッセイを用いて確認した。テトラサイクリン遺伝子発現調節システムを付加したA-C/EBPをレンチウイルスを用いてATDC5細胞に安定導入し、軟骨分化の各段階でのマーカーへの影響を検討した。すると初期分化段階においてCol2a1, Aggrecan, Sox9は上昇、肥大分化段階においてMmp13, Vegfa, Col10a1 は低下していた。これは各C/EBPファミリー強

制発現系における各マーカーの変化とちょうど正反対の結果となり、C/EBPファミリーの gain-of-function および loss-of-function の効果が確認された。またA-C/EBPを安定導入したATDC5細胞では細胞増殖能が上昇した。さらにこのA-C/EBPを安定導入したATDC5細胞の分化誘導モデルをマイクロアレイで解析すると、骨格発達関連遺伝子（低下21、上昇17）、軟骨関連遺伝子（低下6、上昇8）、細胞周期関連遺伝子（低下36、上昇17）のほか、炎症関連遺伝子（低下55、上昇12）、アポトーシス関連遺伝子（低下108、上昇47）の発現変化が見られた。

以上より、C/EBP  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\alpha$  はいずれも軟骨細胞に発現し、増殖や分化を制御するほか、アポトーシスや炎症の制御など広範囲の現象に関与することが示唆された。これらのファミリー群は軟骨細胞の分化過程において協調的な発現を見せており、脂肪細胞など他の細胞で確認されているようなファミリー間の相互作用が軟骨細胞においても起こっていると考えられる。発現量および既知の作用から考えると、軟骨細胞においてはC/EBP  $\beta$  を dominant としてC/EBP  $\delta$ , C/EBP  $\alpha$  が協調的に関わり、初期分化には抑制的、肥大分化には促進的な作用を有していると思われる。マイクロアレイの結果から、C/EBPファミリーは成長軟骨の分化のみならず関節軟骨の恒常性維持や様々な関節疾患にも関与する可能性が示唆された。本研究では、ファミリーメンバー個々に特異的な作用や役割は明らかとならなかったが、C/EBPファミリー全体が類似する作用を示すことから今後さらなる gain-of-function、loss-of-function 手法による解析が望まれると考えた。