

# 博士論文

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

## 目次

要旨	3 頁
第 1 章 序論	3 頁
第 2 章 材料および方法	7 頁
2-1. 実験動物	
2-2. 発現ベクターの作成	
2-3. A-CEBP の作成	
2-4. 細胞培養	
2-5. 初代軟骨培養採取	
2-6. マウスの遺伝子型の同定	
2-7. リアルタイム RT-PCR	
2-8. Western Blotting 法	
2-9. マウスの骨格二重染色	
2-10. マウス成長板軟骨の免疫組織染色による組織学的検討	
2-11. 細胞増殖率の評価	
2-12. マイクロアレイ	
2-13. RNA 干渉	
2-14. ルシフェラーゼレポーターアッセイ	
2-15. 哺乳類ツーハイブリッド法	
2-16. 共免疫沈降法	
2-17. 統計学的解析	

第3章	結果	16 頁
3-1.	軟骨細胞における C/EBP ファミリーメンバーの発現	
3-2.	軟骨分化における C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ の役割	
3-2-1.	gain-of-function 解析	
3-2-2.	loss-of-function 解析	
3-3.	ノックアウトマウスの解析	
3-4.	A-CEBP の C/EBP ファミリーに対するドミナントネガティブ効果	
3-5.	軟骨分化における C/EBP ドミナントネガティブの影響	
3-6.	A-CEBP の影響を受ける下流因子	
第4章	考察	21 頁
謝辞		28 頁
引用文献		29 頁

## 要旨

本研究では、軟骨細胞におけるCCAAT/エンハンサー結合タンパク（以下C/EBP）ファミリーによる分化制御の影響について軟骨細胞由来細胞株を用いて*in vitro*を中心に検討した。C/EBPファミリーのうち、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ はいずれも軟骨細胞に発現し、増殖や分化を制御する類似した機能を有することが明らかとなった。また、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。

## 第1章 序論

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の一つ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（1、2、3、4、5）。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。

脊椎動物の四肢骨格の成長における、軟骨内骨化の重要な役割を述べる。まず初めに未分化間葉細胞が凝集して軟骨原基を形成し（6）、未熟な軟骨細胞はII型コラーゲン（Col2a1）とアグリカンの発現と活性化による細胞増殖と基質外マト

リックス産生を行い、中心部に向かって成熟していく (6)。初期分化で増殖した軟骨細胞はその後、細胞周期制御によって特徴づけられる肥大分化、即ち細胞の肥大化とX型コラーゲン (Col10a1) の産生によって肥大層を形成する (6)。肥大層において、血管内皮成長因子 (VEGF) の高発現が血管侵入を誘導するとともに (7)、マトリックスメタロプロテアーゼ13 (Mmp13) などの軟骨異化因子が基質外マトリックスを破壊してアポトーシスを起こし軟骨細胞が骨に置換されていくことによって、軟骨変性とそれに続く軟骨内骨化に至る (6、7) (図1)。この軟骨内骨化の連続過程は、sex-determining region Y-type high mobility group box 9 (Sox9)、Runt転写制御因子2 (Runx2)、indian hedgehog (Ihh)、副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP)、線維芽細胞成長因子 (FGF) といった様々な分子とWntシグナル経路を代表とするシグナルによって制御されている (1、2、4、8、9、10、11)。

CCAAT/エンハンサー-結合タンパク質 (C/EBP) は、C末端にロイシンジッパー構造を有する転写因子群である。C末端55-65アミノ酸残基における90%以上の同一塩基配列を共有するロイシンジッパー (bZIP) 領域には、二量体形成領域とbasic domainが含まれている (12、13、14)。これとは対照的に、N末端では転写活性化領域 (TAD) の短い領域以外にはほとんど同一配列性を有しない (相同性20%以下) (12、13)。このC末端側の共通構造を有する転写因子群が、C/EBPファミリーと呼ばれている (図2)。

C/EBPファミリーには、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\gamma$ 、C/EBP $\delta$ 、C/EBP $\epsilon$ 、C/EBP $\zeta$  の6種類のアイソフォームがある (13、14)。そのうち、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、C/EBP $\epsilon$  の4種類が転写活性化領域を有している (図2) (29、38)。これらのC/EBPファミリーは様々な細胞で共発現しており、炎症・細胞増殖・細胞

分化などに広く関与することが知られている (13、14)。またファミリー間でヘテロダイマーを形成して相互作用を示す報告や、ファミリー間で重複する作用を示す報告が近年相次いでいる (15、16、17、18)。

我々はこれまでに、C/EBP  $\beta$  が軟骨内骨化の過程で細胞増殖と軟骨肥大分化を制御していることを明らかにした (1)。C/EBP  $\beta$  は軟骨初期分化においてCol2a1の発現を抑制し、またGADD45  $\beta$  あるいはRunx2と協同して軟骨肥大分化因子であるMmp13とVEGFを誘導することによって軟骨細胞の最終分化を促進する (1、2、19、20)。またC/EBP  $\beta$  は、肥大分化の最終段階においてサイクリン依存性キナーゼ阻害因子p57を誘導し細胞周期を制御することによって軟骨肥大細胞の増殖を静止させ、軟骨内骨化を補助する (1)。

この先行研究の中で、C/EBP  $\beta$  ノックアウト (*Cebpb*<sup>-/-</sup>) マウスは胎生期の骨格の成長障害を示した (図3) (1)。また、*Cebpb*<sup>-/-</sup> マウスは生後すぐに同胞野生型と同様の体格まで成長し、胎児期に見られた成長障害が解消することがわかった (図3)。一方、他のC/EBPファミリーにおけるノックアウトマウスでの成長障害の報告はない (21、22、23、24)。また、C/EBPファミリーのダブルノックアウトマウスが、単独ノックアウトマウスに比べて強い表現型を示す報告が見られる。*Cebpb*<sup>-/-</sup>; *Cebpd*<sup>-/-</sup> マウスでは脂肪細胞の著しい分化障害が、また*Cebpb*<sup>-/-</sup>; *Cebpe*<sup>-/-</sup> マウスでは骨髄球の強い機能障害による免疫不全が明らかとなっている (15、16)。軟骨細胞においても同様に、C/EBP  $\beta$  をドミナントとするC/EBPファミリーの相互作用による包括的な制御が起きており、C/EBP  $\beta$  欠損時に補完する作用を有している可能性が考えられる。残念ながらこれまでの諸家のダブルノックアウトマウスの報告では、骨格発達や軟骨細胞分化に関して詳細な検討はない (15、16、17)。

軟骨細胞におけるC/EBPファミリー全体の役割については、未だ解明されていない。

我々は本研究において、軟骨細胞におけるC/EBPファミリーの役割を幅広く包括的に解析するために、*in vivo*でのマウス成長板における各ファミリーの発現、*in vitro*での軟骨細胞由来細胞株を用いたgain-of-function およびloss-of-function による機能解析、各ファミリーのノックアウトマウス間の掛け合わせによるダブルノックアウトマウスの解析を行った。さらにC/EBPファミリーの包括的な機能喪失効果を調べるために、C/EBPファミリー特有のドミナントネガティブを用いた解析を行い、C/EBPファミリー全体の軟骨細胞分化への影響を検討した。

## 第2章 実験材料および方法

### 2-1. 実験動物

*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスは大阪大学の審良静男博士より供与された。*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウスは National Cancer Institute のPF Johnson博士より供与された。いずれのマウスも C57BL/6 backgroundで維持した。また*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウスのバッククロスに際して理研から購入した129/Svを用いた。

全ての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管等に関する基準（総理府告示）」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って行った。

### 2-2. 発現ベクターの作成

各ファミリーの発現ベクターの作成は、以下の手順で行った。まず目的遺伝子のcDNA全長の塩基配列を、ヒトcDNAライブラリーを鋳型としてKOD-plusポリメラーゼ（Takara bio）を用いてPCR法によって増幅した。次いでこれをpcDNA3.1ベクター（Invitrogen）に組み込んだ。得られたクローンの塩基配列はサイクルシーケンス法を用いて確認し、正しく増幅されているものを発現ベクターとしてアッセイに使用した。

各ファミリーをドキシサイクリン（DOX）誘導性に強制発現させるレンチウイルスは、Tet-On 3G system（Clontech）と pLenti6.3 ベクター（Invitrogen）を用いて作成し、Lenti-X 293T cell line（Clontech）を用いてパッケージングして使用した (25)。



### 2-3. A-CEBP の作成

C/EBPファミリーのドミナントネガティブ機能を有するA-CEBPは、以下の配列を用いて (26) 人工的に合成してpcDNA3.1ベクター (Invitrogen) に組み込んだ。

A-CEBP: 5'-gacctggaacaacgtgctgaggaactggcccgtgaaaacgaagagctggaaaaagaggccgaagagctg  
gagcaggaaaacgctgaactcgagcagaaggtgttgaggtgaccagtgacaatgaccgctgcgcaagcgggtggaacagc  
tgagccgtgaactggacacgctgcggggtatctccgccagctgctgagagctccttggtcaaggccatgggcaactgcgcgt  
ga-3'

### 2-4. 細胞培養

マウス由来未分化軟骨細胞株 ATDC5 細胞 (RIKEN Cell Bank) は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) /Ham's F-12 (Wako) に 1%Penicillin/streptomycin solution (P/S solution、Sigma-Aldrich) と 5%Fetal bovine serum (FBS、Sigma-Aldrich) を添加した培養液を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa 細胞 (RIKEN Cell Bank) は、DMEM (WAKO) に 1% P/S solution と 10% FBS を添加した培養液を用いて、同条件で培養した。

ATDC5 細胞の分化誘導は、ITS-G supplement (インスリン、トランスフェリン、亜セリン酸、WAKO) を添加した DMEM/Ham's F-12 と 1% P/S solution と 5%FBS で 3 週間培養した後、5%FBS を加えた  $\alpha$ -MEM (WAKO) に 4mM 無機リン (Pi) を添加した培養液で 2 日間培養した (10)。2 週間および 3 週間と 2 日間の各段階で、エタノール固定した細胞に対して細胞染色を以下のように行った。0.1%アルシアンブルー-8GS (Sigma-Aldrich) で 1 時間染色した (10)。0.2%アリザリンレッド S (Sigma-Aldrich) で 15 分間染色した (10)。

DOX 誘導性に強制発現させる系では、0 週ないし 2 週目から Doxycycline (Clontech) を終濃度 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように培養液に追加した。

## 2-5. 初代軟骨細胞採取

マウス初代肋軟骨細胞は生後5-7日のマウスの胸郭を取り出し、軟部組織および骨化した肋骨を除去した後、0.3%コラゲナーゼD (Roche) を添加したDMEM/F-12を用いて45分間の培養後攪拌を2回繰り返した後、0.06%コラゲナーゼDを含んだDMEM/F-12にてovernightで培養してから、攪拌・濾過・遠心して採取した (27) 。初代肋軟骨細胞は、1% P/S solutionと10%FBSを含むDMEM/F-12にて培養し、無継代で採取したものを用いた (27) 。上記の培養は全て37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で行った。

## 2-6. マウスの遺伝子型の同定

遺伝子型同定のための個体サンプルとして、胎仔ではマウス皮膚を、また生後の個体では離乳時期である21日までの間に尾の一部を切断した。組織断片よりアルカリプレップ法を用いてゲノムDNAを抽出した。これを用いて遺伝子上の以下の配列を用いたPCRにより、組み換えDNA断片および野生型DNA断片の有無を電気泳動で確認した。

Cebpb: forward primer: 5'-GTTTCCCGTTTCGCCCTGCGCGCCTA-3', reverse primer: 5'-CTTTAATGCTCGAAACGGAAAAGGTTC-3'

Cebpb-mutation 1266bp、WT 891bp

PCR条件 :

1. 94°C (3 min)
2. 94°C (1 min), 61°C (30 sec), 68°C (1 min20 sec) × 35 cycles
3. 68°C (10 min)

Cebpd mutation: forward primer: 5'-CTCCAGGCTTGGACGGCTAAGTAGG-3',

reverse primer: 5'-AAGTTGGCTGTCACCTCGCC-3'

Cebpd wild type: forward primer: 5'-GCTCCAGACTGCCTGGGAAAAGC-3', reverse  
primer: 5'- CAGTCCAGTGCCCAAGCTGC -3'

Cebpd-mutation 321bp、 WT 204bp

PCR条件 :

1. 94°C (3 min)
2. 94°C (1 min), 62.4°C (30 sec), 72°C (30 sec) × 40 cycles
3. 72°C (10 min)

## 2-7. リアルタイムRT-PCR

RNAはISOGEN (Wako) を用いて回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。ヒト組織パネルは市販のHuman MTC Panel (Clontech) を購入した。0.5  $\mu$ gのRNAをReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いてプロトコル通りに逆転写を行い、single-stranded cDNAを作成した。Quantitative RT-PCR には、ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用した。QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN) 、各種プライマーを用いてPCRを行った。スタンダードプラスミドはTOPO TA cloning kit (Invitrogen) を用いて合成し、希釈系

列を調整し、各種のスタンダードカーブを得た。Rodent total RNA (Applied Biosystems) を逆転写して得たサンプルで測定したマウスActinをHousekeeping geneとして内在性コントロールとし、それぞれの遺伝子のmRNAコピー数を標準化した。サンプルは各3 wellずつ測定し、計測値の平均値と標準誤差を得た。

## 2-8. Western Blotting法

培養細胞を氷冷PBSで3回洗った後、M-PER (Thermo Scientific) を用いて細胞からタンパクを回収した。細胞溶液は4°Cで2時間回転した後、12,000 rpmにて10分間遠心し、上清を採取した。タンパク濃度は、Protein Assay Kit II (BIO RAD) を用いて計測し、使用する上清液量を決定した。7.5-15% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ポリアクリルアミドゲル (D.R.C. Co., Ltd.) で電気泳動し、泳動終了後にタンパクをpolyvinylidene difluoride メンブレン (PVDF) (BIO-RAD) に転写した。一次抗体 ; FLAG (1:500, Abcam, マウスモノクローナル)に室温で1時間反応させた。二次抗体にはHRP標識抗体 (Promega) を用い、ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham) により特異的なバンドを検出した。

## 2-9. マウスの骨格二重染色

胎生16.5日~18.5日における各遺伝子型のマウス胎仔を帝王切開にて取り出し、皮膚・内臓・その他軟部組織を可及的に取り除き、骨格全体を100%エタノールで室温にて4日間固定した。次に20%酢酸を加えた0.3%アルシアンブルー8GS (Sigma) 溶液に浸し、37°Cで2日間振盪した。95%エタノールで4日間リンスした後、0.002%アリザリンレッドS (Sigma) 溶液に浸し、遮光・室温で12時間振盪した。その後

はグリセリン/1%水酸化カリウム溶液に室温で浸して、残存した軟部組織を透明化させた。80%グリセリンに浸して遮光・冷所で保存した。

## 2-10. マウス成長板軟骨の免疫組織染色による組織学的検討

胎生17.5日マウスの上腕骨または脛骨近位成長板を採取して用いた。4% paraformaldehyde/PBSにて4°Cで24時間固定した後にパラフィン包埋し、切片を4 µm厚で薄切片を作成した。Hematoxylin-Eosin(H&E) 染色を施した。

組織切片はキシレンにて脱パラフィンし、エタノール置換した後に37°Cで30分間のヒアルロニダーゼ処理 (1:40, Sigma-Aldrich, H3506) を行った。その後はCSA II (DAKO) に従い免疫組織染色を行った。具体的には、peroxidase blockを15分間行った後に、TBSTにて5分×2回洗浄し、その後3% BSA/PBSでのprotein blockを15分間行い、そのまま遮光の4°Cで一次抗体 ; Cebpa (1:100, Santa Cruz Biotechnology, 14AA, ウサギポリクローナル抗体)、Cebpb (1:100, Abcam, E299, ウサギモノクローナル抗体) or Cebpd (1:100, Santa Cruz Biotechnology, C-22, ウサギポリクローナル抗体)と一晩反応させた。抗体の希釈には、付属のAntibody diluent(Dako)を用いた。翌日にTBSTで3分×3回洗浄後、付属の2次抗体にて30分間反応させた後にTBSTにて3分×3回洗浄を行い、amplificaton reagentで15分間反応させ、TBSTにて3分×3回洗浄を行った。Hoechst (1:500, Eugene) にて核染色を行い、染色を終了した。

## 2-11. 細胞増殖率の評価 (CCK-8 assay)

細胞の増殖速度を評価するために、96-well plateに $10^3$  cells/wellで各対象細胞を播き37°Cで培養、Cell Counting Kit 8 (Dojindo) を用いて0, 1, 2, 3, 4, 5日に生細胞数を

測定した。

## 2-12. マイクロアレイ

GFP およびA-CEBP を強制発現させたATDC5細胞を3週間培養し、RNAは ISOGEN (Wako) を用いて回収した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。SurePrint G3 Mouse GE 8x60K Microarray (Agilent) を用いた。結果は、GeneSpring (Agilent) を用いて解析した。主だった結果をGene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) accession number GSE60651 に登録している。

## 2-13. RNA干渉

既存のStealth RNAi (Invitrogen) からCebpb、Cebpd、GFPのサイレンサー配列を購入し、Lipofectamin 2000 (Invitrogen) とOpti-MEM (Invitrogen) を用いて細胞へ遺伝子導入した。72時間培養して細胞を回収した。

## 2-14. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーターベクターとして、PGL4 (Promega) を用いた。このベクターにMMP13およびVEGFのプロモーター領域を、ヒトゲノムDNAを鋳型としてPCRにて増幅し組み込んだ。コンストラクトには各C/EBPファミリーおよび

A-CEBPをpCMV-Tagベクター (Agilent) に組み込んだものを用意した。遺伝子導入においてはHeLa細胞を48-wellプレートに播種し、24時間後にFugene-6 (Roche) を用いて50 ngのpGL4レポーターベクターと総量150 ngの発現ベクターを共遺伝子導入した。また、内在性コントロールとして4 ngのpRL-TK (Promega) を合わせて導入した。細胞は導入後48時間にて回収した。ルシフェラーゼアッセイは、PicaGene Dual SeaPansy Luminescence Kit (東洋インキ) とGloMax96 Microplate Luminometer (Promega) を用いて行った。ホタルルシフェラーゼ活性はウミシイタケルシフェラーゼ活性で標準化した。

## 2-15. 哺乳類ツーハイブリッド法

Checkmate mammalian two-hybrid system (Promega) を用いた。GAL4を含むpBINDベクター (Promega) にA-CEBPを、VP-16を含むpACTベクター (Promega) に各C/EBPファミリーを組み込んだ。これらをレポーターベクターであるpG5luc (Promega) とHeLa細胞に共遺伝子導入し、ルシフェラーゼアッセイと同様に行った。

## 2-16. 共免疫沈降法

A-CEBP をpCMV-3Tagベクター (Agilent) にクローニングして、3xFLAG-Tagで標識した。また各C/EBPファミリーのCDSをpcDNA3.1ベクター (Invitrogen) にクローニングして、3xHA-Tagで標識した。両者をHeLa細胞にFugene-6 (Roche)

を用いて共遺伝子導入し、48時間培養した後に回収した。EZ view Red Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) を用いて吸着させたサンプルと、細胞溶解液とに対して、一次抗体 ; HA (1:250, Abcam) を用いてWestern Blotting法を行った (4)。

## 2-17. 統計学的解析

各実験から得られた結果は、平均±標準誤差として表記した。2 群間の比較には、スチューデントの t 検定を用いて有意水準 0.05、0.01、0.005 で検定した。



## 第3章 結果

### 3-1. 軟骨細胞におけるC/EBPファミリーメンバーの発現

C/EBPファミリーの内、TADを有する4種類に着目した (C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$ 、C/EBP  $\epsilon$ )。マウスの肋軟骨初代培養細胞のmRNAレベルでは、Cebpb と Cebpd は豊富に、Cebpa は中等度に発現しており、Cebpe はほとんど発現していなかった (図4)。ヒト組織パネルの軟骨を含む気管支組織を調べたところ、同様の結果であった (図5)。ATDC5細胞を擬似分化誘導させたところ、Cebpaは分化の早い段階でmRNAの発現が増え、CebpbとCebpdは肥大分化に相当する後期で発現が増加した (図6)。マウス胎児の成長軟骨を免疫組織染色で調べたところ、Cebpaは増殖層から前肥大層にかけてタンパクレベルで多く発現しており肥大層ではほとんど見られなかった。一方、CebpbとCebpdは前肥大層から肥大層にかけて多く見られた (図7)。これはATDC5細胞の擬似分化誘導におけるmRNAの発現タイミングと一致しており、軟骨細胞の分化過程の早い段階でCebpaが発現し、遅れて肥大分化に向けてCebpbとCebpdとが豊富に発現しCebpaの発現は減少することがわかった。

### 3-2. 軟骨分化におけるC/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ の機能

#### 3-2-1. gain-of-function解析

軟骨細胞分化の各段階におけるC/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  の機能を調べるために、DOX誘導性にCebpa、Cebpb、Cebpd、GFPを強制発現するATDC5細胞を作成した。0週からDOXを添加して分化誘導をかけた2週後のATDC5細胞では、軟骨

細胞の初期分化マーカーかつanabolic factorであるCol2a1、aggrecan、Sox9はいずれのC/EBPによってもmRNAレベルで低下した（図8）。これとは対照的に、分化誘導開始2週間後にDOXを添加してさらに1週間の培養を経たATDC5細胞では、軟骨細胞の肥大分化マーカーかつcatabolic factorであるMmp13、Vegfa、Col10a1がいずれのC/EBPによってもmRNAレベルの発現が促進されていた（図10）。それぞれアルシアンブルーによる軟骨基質とアリザリンレッドによる石灰化の観察結果と一致していた（図9、図11）。また、細胞増殖速度は、いずれのC/EBPファミリー強制発現においても、かなり抑制されていた（図12）。

### 3-2-2. Loss-of-function解析

Cebpa、Cebpb、CebpdのRNAiを用いて、ATDC5細胞での抑制効果を調べた。いずれのRNAiも標的遺伝子のmRNA発現を抑制していた（図13）。しかし、Col2a1 およびMmp13、Vegf といった軟骨分化マーカーはいずれも差が見られなかった（図14）。

### 3-3. ノックアウトマウスの解析

C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\delta$ は共に軟骨細胞の分化においてC/EBP $\beta$ と同様の機能を有していることからC/EBP $\beta$ に対する補完作用を担っている可能性が考えられた。我々は、軟骨細胞でC/EBP $\beta$ に次いで豊富に発現していたC/EBP $\delta$ がその役割を担っているという仮説を立てた。

Cebpb $^{-/-}$ マウスの胎児成長板において、C/EBP $\delta$ の発現は野生型と比してわずかに多く見られた（図15）。しかし、生後のマウスから採取した初代軟骨培養細胞

ではC/EBP  $\delta$  のmRNA発現に有意差は見られなかった (図16)。

次に*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウスの解析を行った。*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウスは、胎児、成体ともに明らかな成長障害やパターンニング異常は見られなかった (図17)。

そこで我々は、*Cebpb*と*Cebpd*のダブルノックアウトマウスの作出を試みた。しかし、*Cebpb*<sup>-/-</sup>アレルを有するマウスは極端に出生率が低く、*Cebpb*<sup>-/-</sup>;*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウス個体は1体も得られなかった (表1)。帝王切開で得られた胎児の中にも*Cebpb*<sup>-/-</sup>;*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウスは得られなかった。スリークウォーター*Cebpb*<sup>+/-</sup>;*Cebpd*<sup>-/-</sup>では明らかな成長障害は見られなかった (図18)。そこで*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスおよび*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウスのバッククロスを行い (図19)、再度ダブルノックアウトマウスの作出を試みたが、*Cebpb*<sup>-/-</sup>の出生率は低く、現在までにダブルノックアウトマウスの個体は得られなかった (表2)。

### 3-4. A-CEBPのC/EBPファミリーに対するドミナントネガティブ効果

C/EBPファミリー全体を包括的に抑制する影響を調べるため、人工配列A-CEBPを用いた。C/EBPファミリーはホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成することによって構造的にDNA結合能を発揮できる転写因子群であるが、A-CEBPはC/EBPファミリーのジッパードメインと特異的にヘテロダイマーを形成することによってDNA結合能を喪失させるドミナントネガティブの機能を有する (26、28、29)。我々はCMVプロモーター下にFLAG-Tagを挿入したA-CEBPを作成した (図20)。

A-CEBPとC/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  間の高い結合親和性は、哺乳類ツーハイブリッド法によって示された (図21)。また、共免疫沈降法によってA-CEBPと

各C/EBPのタンパク間の結合能が確認された(図22)。さらにC/EBPファミリーが有するMMP13とVEGFAのプロモーター活性能への影響をルシフェラーゼアッセイを用いて調べ、A-CEBPは濃度依存的にC/EBP  $\beta$  のプロモーター活性能を競合阻害することを確認した(図23、図24)。以上よりA-CEBPは少なくともC/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  に対するドミナントネガティブとしての機能を有することが示された。

### 3-5. 軟骨分化におけるC/EBPドミナントネガティブの影響

C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  の包括的な抑制による影響を検討するために、DOX誘導性にA-C/EBPを発現するATDC5細胞を作成した。DOXを添加しながら分化誘導を2週間かけたところ、Col2a1のmRNA発現が促進された(図25)。AggrecanとSox9はわずかな上昇であった(図25)。また、分化誘導2週からDOX添加を開始した系ではMmp13、Vegfa、Col10a1のいずれもが抑制された(図27)。A-CEBPの強制発現によって、アルシアンブルー染色性は上昇し、アリザリンレッドS染色性は低下した(図26、図28)。これはmRNAの増減結果に一致するものだった。また細胞増殖速度は、A-CEBP過剰発現によって促進された(図29)。初期分化マーカー、肥大分化マーカー、細胞増殖速度のいずれにおいても、各C/EBPファミリー強制発現系とA-CEBP強制発現系とではちょうど正反対の結果となった。

### 3-6. A-CEBPの影響を受ける下流因子

最後に、我々はマイクロアレイを用いてC/EBPファミリーの下流因子の動向を検討した。レンチウイルスを用いてA-CEBPまたはGFPを過剰発現させたATDC5細胞に3週間の擬似分化誘導を行い、回収して精製したRNAの発現プロファイルを比較した。A-CEBP強制発現系ではGFP強制発現系に比べて2倍以上変化があった遺伝子を抽出したところ、3,300の遺伝子が発現低下、1,657の遺伝子が発現上昇していた。Gene Ontology で解析したところ、骨格発達関連遺伝子では21種類が低下、17種類が上昇していた。軟骨関連遺伝子では6種類が低下、8種類が上昇していた。細胞周期関連遺伝子では36種類が低下、17種類が上昇していた。さらに興味深いことには、炎症関連遺伝子では55種類が低下、12種類が上昇しており、アポトーシス関連遺伝子では108種類が低下、47種類が上昇していた（表3-12）。

## 第4章 考察

我々は本研究によって、軟骨細胞におけるTADを有するC/EBPファミリー（C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$ 、C/EBP  $\epsilon$ ）の発現を示した。そのうち軟骨細胞で十分な発現が見られたC/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  の3種類はいずれも、anabolic factorといわれる軟骨初期分化マーカー遺伝子の発現と細胞増殖速度を抑制し、catabolic factorといわれる軟骨肥大分化マーカー遺伝子の発現を促進するという類似した性質を持つことが明らかとなった。

過去の研究において、C/EBP  $\beta$  とC/EBP  $\delta$  のIL-1  $\beta$  に対する重複した機能が知られている（30、31）。また脂肪細胞の分化においてC/EBP  $\beta$  とC/EBP  $\delta$ 、あるいはC/EBP  $\alpha$  とC/EBP  $\delta$  が協調的に作用するという報告がある（15、18）。しかし、軟骨細胞におけるC/EBPファミリー全体の機能や発現レベルおよび発現パターンを広く包括的に検討比較した研究はなかった。そのため、我々が以前に報告したC/EBP  $\beta$  の軟骨細胞における働きについても、他のC/EBPファミリーの相互作用や干渉が存在する可能性は否定できない。

本研究では、培養軟骨細胞の分化における各段階において、C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  の類似した機能を明らかにした。しかし、細胞株にRNA干渉を用いた個々の発現抑制系では分化マーカー遺伝子の発現に大きな影響は与えなかった。*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスで見られる、胎生期に観察された骨格成長障害が生後に解消されるという現象は、他の因子による補完作用が生じていることを示唆している。細胞株におけるファミリーメンバー個々の抑制系の結果（図14）は、この*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスの現象と同じことを表していると考えられる。我々は軟骨細胞にC/EBP  $\beta$  に次い

で多く発現しているC/EBP  $\delta$  を補完者と仮定したが、*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスにおいてC/EBP  $\delta$  のmRNAレベルおよびタンパクレベルの明確な上昇は見られず、1対1の対応と考えるには無理があった。ファミリー間に複雑な相互作用があるとする、*in vivo*におけるC/EBPファミリーの機能を解析するのに、単独ノックアウトマウスあるいはダブルノックアウトマウスでは不十分である怖れがある。実際に、*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウスでは特記すべき異常表現型は見られず(図17)、*Cebpa*<sup>-/-</sup>マウスは胎生致死であるため観察が困難であった(18)。*Cebpb*<sup>-/-</sup>;*Cebpd*<sup>-/-</sup> というダブルノックアウトマウスの作出を試みたが、*Cebpb*<sup>+/-</sup> × *Cebpd*<sup>+/-</sup> の掛け合わせの仔を、neonate および胎生17.5日で数多く解析したところダブルノックアウトは全く存在しなかった。文献的には低い出生率ながらneonate は得られ生後24時間以内にほぼ死亡する(15)のであるが、我々は胎児をも得ることが出来なかった。同時に実施していた*Cebpb*単系統の繁殖でもホモノックアウトマウスの出生率はメンデルの法則を大きく外れる極めて低いものであったこと、および*Cebpd*単系統ではホモノックアウトマウスが容易に得られたことから、*Cebpb*系統の問題と考えた。繁殖を全て自然交配で実施したこと、インブリードの影響を受けていること、コンベンショナル飼育環境であること、などが原因に考えられた。自然交配は技術的に制限があったが、飼育環境を整備し、バッククロスを行い再試行した。バッククロスに際しては、文献的に実績のある系統として*Cebpb*ではC57BL/6、*Cebpd*では129/Svを用いた(15,16)。しかし結局ダブルノックアウトマウスを得ることが出来ず、*Cebpb*<sup>-/-</sup> アレルの低い出生率は改善できなかった。

今回の結果からは、C/EBPファミリーメンバー個々の特異的な作用を見出すことは出来なかった。更なるgain-of-functionおよびloss-of-function解析の余地がある。

C/EBPファミリー全体のドミナントネガティブとしてのA-CEBPは、今後の研究を進めるに当たり良いツールとなるだろう。

A-CEBPは、C/EBPファミリーのロイシンジッパー構造に特異的にヘテロダイマーを形成することによりC/EBPファミリーのDNA結合能を阻害するドミナントネガティブ機能を持ち、CREBやC-FOSなどの他の良く知られたロイシンジッパーを持つ遺伝子のタンパクとは結合しないよう設計されている (26、28、29)。ATDC5細胞におけるA-CEBP過剰発現は、C/EBPファミリーの強制発現系と全く対照的な結果を示した (図24-28)。しかしA-CEBPによるAggrecanやSox9の上昇は軽微であり、その他の遺伝子の変化も、多くても2倍程度に留まっていた。これは、Hif2a、Runx2、NotchシグナルによるMmp13誘導などといった他の重要な転写因子やシグナル経路の影響であろう (2、3、4)。中でもRunx2は既にC/EBP  $\beta$  との協同機能が知られており、C/EBPファミリーの動作に深く関わっているものと考えられる

(2)。また、一連の初期分化および肥大分化への影響は、TGF  $\beta$  の作用と正反対である。脂肪細胞においてTGF  $\beta$  がC/EBP  $\beta$  およびC/EBP  $\delta$  と相互作用を有して分化制御しているという報告があり (50)、TGF  $\beta$  を含むシグナル経路とC/EBPファミリーとの関与は今後研究に値する意義を持つ。

今回我々はマイクロアレイによって、C/EBPファミリーにより制御されている可能性の高い、骨格成長・細胞増殖・炎症・アポトーシスに関わる多くの遺伝子を特定できた。中でもA-CEBPによって著しく上昇ないし低下する遺伝子が複数見られた。骨格成長関連遺伝子の中では、Mmp9、Pax1、Sox11、Myf6 が10倍以上の



発現低下を見せた（表3）。Mmp9 は心血管疾患の炎症メディエーターとして知られており（32）、関節リウマチなどの炎症性関節疾患、変形性関節症などの変性関節疾患とも関係している重要な遺伝子である（33、34）。Pax1は体軸骨格の発達を制御する遺伝子である（35）。Sox11は関節維持においてGDF5の誘導に関与することが知られている（36）。これらの遺伝子発現が著明に低下していることから、軟骨細胞においてC/EBPファミリーは必要不可欠であることが示唆された。一方で、A-CEBPによってIhh、Frzb、Wnt7a、Fgfr3といった軟骨細胞の分化に重要な役割が知られている遺伝子が大きく上昇した。これは、C/EBPファミリーによってこれらの因子が抑制されていることを意味する。この一見相反する制御機構を解析することは、軟骨細胞におけるC/EBPファミリーの機能の全体像を知る手がかりとなり得るだろう。

軟骨細胞の増殖速度は、C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  いずれによっても抑制され、A-CEBPによって促進された（図12、図29）。この結果は、*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスに関する過去の報告と一致している（1、37、38、39）。マイクロアレイの結果からも、FgfシグナルやFoxo4-p21<sup>cip1</sup>経路などの細胞増殖制御に関わる多くの因子がC/EBPファミリーの標的となり得ることがわかった（表7、表8）（40）。軟骨内骨化には軟骨細胞の増殖停止が不可欠であるため、今後検討すべきC/EBPファミリーの切り口の一つとなるだろう。

Anabolic factorである軟骨初期分化マーカーCol2a1、aggrecan、Sox9の遺伝子発現は、C/EBP  $\alpha$ 、C/EBP  $\beta$ 、C/EBP  $\delta$  のいずれによっても抑制され、A-CEBPによって促進された（図8、図24）。特にCol2a1の変化はSox9よりも大きく動いていた。

これは、C/EBP  $\beta$  がSox9の調節を介して直接的にも間接的にもCol2a1を抑制しているという過去の報告に一致する (20)。また最近の研究で、肝細胞においてSox9とC/EBP  $\alpha$  が相互に抑制するという報告がある (41)。これらを統合すると、軟骨内骨化の過程で、C/EBPファミリーとSox9とが相互に負の制御を行っていることが示唆される。

Col2a1以外の軟骨細胞における標的遺伝子では、メラノーマインヒビトリー活性 (MIA) によってコードされるcartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) は、C/EBP  $\beta$  とC/EBP  $\delta$  によって抑制されることが知られている (42)。CD-RAPは、コラーゲン線維構成に関係している分泌タンパクであるが、Col2a1と同様Sox9によって正に制御されている因子であり、C/EBPファミリーによって負の制御を受けていることと整合性が取れる (42、49)。CD-RAP のプロモーター領域にC/EBP  $\beta$  が結合することが知られており、CBP/p300がC/EBP  $\beta$  と結合することで負の制御を阻害すると言われていることから (49)、C/EBPファミリーとCBP/p300の相互作用も今後明らかにすべき事項である。

本研究において、aggrecanもC/EBPファミリーによって制御されることがわかった。Col2a1には満たないが、C/EBPファミリーあるいはA-CEBPによるaggrecanの変動はSox9よりも大きいものであったことから、aggrecanの転写活性に及ぼす影響として、C/EBPファミリータンパクによる直接的な抑制と、Sox9制御を介する間接的な抑制とがあると考えられた。

マイクロアレイの結果のGene ontology による解析によって、多くのケモカインやインターロイキンを含む相当数の炎症関連遺伝子がC/EBPファミリーによって変動していることがわかった (表9, 表10)。元々C/EBP  $\beta$  はIL-6の上流因子NF-IL6

として同定された遺伝子であり (43)、免疫応答の有力な制御因子として炎症関連の遺伝子との密接な関係が知られている (44)。軟骨細胞においては、C/EBP $\beta$ がIL-1 $\beta$ によってCCL3とCCL4を誘導する (45)。マイクロアレイの結果で多数の炎症関連因子が変動し、そしてその大部分がA-CEBPによって低下していたことは、様々な炎症性サイトカインがC/EBPファミリーによって制御されていることを示していた。この炎症関連遺伝子の変動に加えて、アポトーシス関連遺伝子でも数多くの影響が見られていることから (表11、表12)、C/EBPファミリーが、関節リウマチなどの炎症性関節疾患にも病態生理学的に関与している可能性を考える。即ち、造血細胞、腎細胞、肝細胞、様々ながん細胞で報告があるように (5、46、47、48) 軟骨細胞においても恒常維持のみならず病的状態における細胞生存を制御しているのである。C/EBPファミリーを包括的に抑制するA-CEBPによって anabolic factorが上昇、catabolic factorが低下、また細胞増殖速度が上昇し、多くの炎症およびアポトーシス関連遺伝子が低下した本研究の結果を加味すと、C/EBPファミリーの機能阻害は広い範囲の関節疾患に対して有効な治療手段となるのではないかと考えた。

我々はC/EBPファミリーによる軟骨細胞分化の様々な制御機構を示した。ファミリーメンバー単独の抑制では大きな変化がなかったものの、ファミリー全体をA-CEBPで抑制したところ、多くの標的遺伝子がC/EBPファミリーによる転写制御を受けている可能性があることがわかった。その中には軟骨内骨化に至る軟骨細胞分化や細胞増殖、関節疾患の病態に重要な役割が知られている因子が多く含ま

れており、C/EBPファミリーを包括的な視点からさらに解析することで、骨格成長や関節疾患の分子メカニズムが明らかにされることが期待できる。

## 謝辞

本研究は、東京大学大学院医学系研究科 感覚・運動機能医学講座 整形外科学分野（整形外科学教室）にて行いました。

基礎研究に従事する貴重な機会を与えて下さり、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った整形外科教室 中村耕三前教授、田中栄教授に謹んで感謝致します。

さらに、基礎研究の初歩から終始にわたり御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った東京大学医学部附属病院ティッシュ・エンジニアリング部 齋藤琢准教授、整形外科教室 川口浩前准教授に謹んで感謝致します。

また、有益な御助言を賜った東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 鄭雄一教授、および有形無形の力でご協力を頂いた同門の先輩、同期、後輩の先生方に感謝の言葉を申し上げます。

## 引用文献

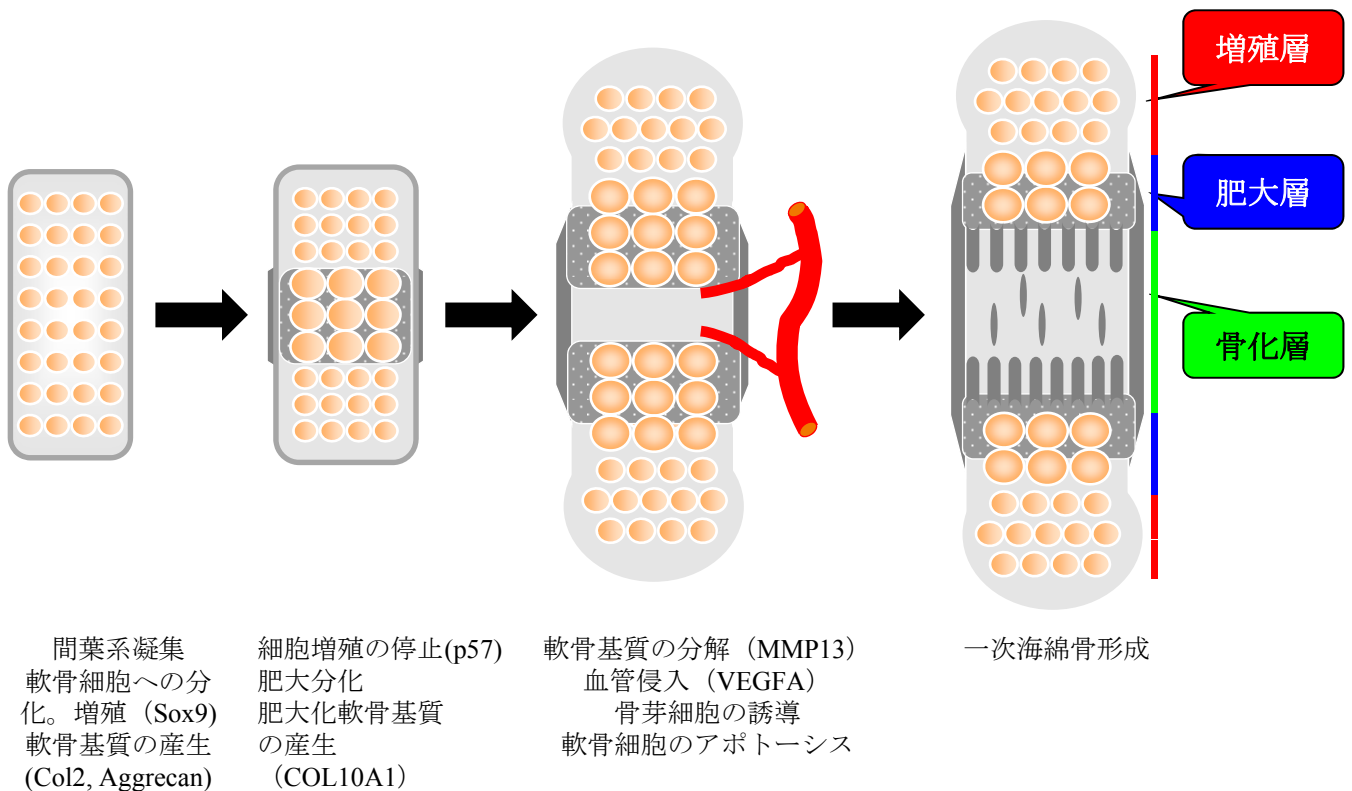
1. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI and Kawaguchi H, C/EBPbeta Promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. *PLoS One* **4**, e4543 (2009).
2. Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI and Kawaguchi H, C/EBPbeta and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2alpha as the inducer in chondrocytes. *Hum Mol Genet* **21**, 1111-1123 (2012).
3. Hosaka Y, Saito T, Sugita S, Hikata T, Kobayashi H, Fukai A, Taniguchi Y, Hirata M, Akiyama H, Chung UI and Kawaguchi H, Notch signaling in chondrocytes modulates endochondral ossification and osteoarthritis development. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 1875-1880 (2013).
4. Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI and Kawaguchi H, Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2alpha during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nat Med* **16**, 678-686 (2010).
5. Schrem H, Klempnauer J and Borlak J, Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part II: the C/EBPs and D site-binding protein in cell cycle control, carcinogenesis, circadian gene regulation, liver regeneration, apoptosis, and liver-specific gene regulation. *Pharmacol Rev* **56**, 291-330 (2004).
6. Kronenberg HM, Developmental regulation of the growth plate. *Nature* **423**, 332-336 (2003).
7. Liu Y and Olsen BR, Distinct VEGF Functions During Bone Development and Homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **62**, 363-368 (2014).
8. Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, Kou I, Seki S, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Ikegawa S and Chung UI, The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* **50**, 3561-3573 (2004).
9. Kamekura S, Kawasaki Y, Hoshi K, Shimoaka T, Chikuda H, Maruyama Z, Komori T, Sato S, Takeda S, Karsenty G, Nakamura K, Chung UI and Kawaguchi H, Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum* **54**, 2462-2470 (2006).
10. Saito T, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI and Kawaguchi H, S100A1 and S100B, transcriptional targets of SOX trio, inhibit terminal differentiation of chondrocytes. *EMBO Rep* **8**, 504-509 (2007).
11. Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A, Chikazu D, Kawano H, Nakamura K, Itoh N and Kawaguchi H, Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoblast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J Bio Chem* **277**, 7493-7500 (2002).
12. Nerlov C, The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends Cell Biol* **17**, 318-324 (2007).

13. Ramji DP and Foka P, CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* **365**, 561-575 (2002).
14. Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y and Auron PE, The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* **54**, 6-19 (2011).
15. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T and Akira S, Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J* **16**, 7432-7443 (1997).
16. Akagi T, Thoennissen NH, George A, Crooks G, Song JH, Okamoto R, Nowak D, Gombart AF and Koeffler HP, In vivo deficiency of both C/EBPbeta and C/EBPepsilon results in highly defective myeloid differentiation and lack of cytokine response. *PLoS One* **5**, e15419 (2010).
17. Huggins CJ, Malik R, Lee S, Salotti J, Thomas S, Martin N, Quinones OA, Alvord WG, Olanich ME, Keller JR and Johnson PF. C/EBP  $\gamma$  suppresses senescence and inflammatory gene expression by heterodimerizing with C/EBP  $\beta$ . *Mol Cell Biol* **33**, 3242-3258 (2013).
18. Lee KH, Ju UI, Song JY and Chun YS, The histone demethylase PHF2 promotes fat cell differentiation as an epigenetic activator of both C/EBP  $\alpha$  and C/EBP  $\delta$ . *Mol Cells* **37**, 734-741 (2014).
19. Tsuchimochi K, Otero M, Dragomir CL, Plumb DA, Zerbini LF, Libermann TA, Marcu KB, Komiya S, Ijiri K and Goldring MB, GADD45beta enhances Col10a1 transcription via the MTK1/MKK3/6/p38 axis and activation of C/EBPbeta-TAD4 in terminally differentiating chondrocytes. *J Biol Chem* **285**, 8395-8407 (2010).
20. Ushijima T, Okazaki K, Tsushima H and Iwamoto Y, CCAAT/enhancer-binding protein beta regulates the repression of type II collagen expression during the differentiation from proliferative to hypertrophic chondrocytes. *J Biol Chem* **289**, 2852-2863 (2014).
21. Kaisho T, Tsutsui H, Tanaka T, Tsujimura T, Takeda K, Kawai T, Yoshida N, Nakanishi K and Akira S, Impairment of natural killer cytotoxic activity and interferon gamma production in CCAAT/enhancer binding protein gamma-deficient mice. *J Exp Med* **190**, 1573-1582 (1999).
22. Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E and Mori M, Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10845-10850 (2001).
23. Sterneck E, Paylor R, Jackson-Lewis V, Libbey M, Przedborski S, Tessarollo L, Crawley JN and Johnson PF, Selectively enhanced contextual fear conditioning in mice lacking the transcriptional regulator CCAAT/enhancer binding protein delta. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 10908-10913 (1998).
24. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR and Darlington GJ, Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* **269**, 1108-1112 (1995).
25. Yano F, Saito T, Ogata N, Yamazawa T, Iino M, Chung UI and Kawaguchi H, Beta-catenin regulates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor signals and chondrocyte hypertrophy through binding to the intracellular C-terminal region of the receptor. *Arthritis Rheum* **65**, 429-435 (2013).
26. Greenwel P, Tanaka S, Penkov D, Zhang W, Olive M, Moll J, Vinson C, Di Liberto M and Ramirez F, Tumor necrosis factor alpha inhibits type I collagen synthesis

- through repressive CCAAT/enhancer-binding proteins. *Mol Cell Biol* **20**, 912-918 (2000).
27. Gosset M, Berenbaum F, Thirion S and Jacques C, Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* **3**, 1253-1260 (2008).
  28. Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML and Vinson C, Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes & Dev* **12**, 3168-3181 (1998).
  29. Vinson C, Myakishev M, Acharya A, Mir AA, Moll JR and Bonovich M, Classification of human B-ZIP proteins based on dimerization properties. *MCB* **22**, 6321-6335 (2002).
  30. Okazaki K, Li J, Yu H, Fukui N and Sandell LJ, CCAAT/enhancer-binding proteins beta and delta mediate the repression of gene transcription of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein induced by interleukin-1 beta. *J Biol Chem* **277**, 31526-31533 (2002).
  31. Thomas B, Berenbaum F, Humbert L, Bian H, Bereziat G, Crofford L and Olivier JL, Critical role of C/EBPdelta and C/EBPbeta factors in the stimulation of the cyclooxygenase-2 gene transcription by interleukin-1beta in articular chondrocytes. *Eur J Biochem* **267**, 6798-6809 (2000).
  32. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW and Libby P, Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* **94**, 2493-2503 (1994).
  33. de Rooy DP, Zhernakova A, Tsonaka R, Willemze A, Kurreeman BA, Trynka G, van Toorn L, Toes RE, Huizinga TW, Houwing-Duistermaat JJ, Gregersen PK and van der Helm-van Mil AH, A genetic variant in the region of MMP-9 is associated with serum levels and progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **73**, 1163-1169 (2014).
  34. Meszaros E and Malemud CJ, Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity. *Ther Adv Chronic Dis* **3**, 219-229 (2012).
  35. Wilm B, Dahl E, Peters H, Balling R and Imai K, Targeted disruption of Pax1 defines its null phenotype and proves haploinsufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 8692-8697 (1998).
  36. Kan A, Ikeda T, Fukai A, Nakagawa T, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H and Tabin CJ, SOX11 contributes to the regulation of GDF5 in joint maintenance. *BMC Dev Biol* **13**, 4 (2013).
  37. Gutsch R, Kandemir JD, Pietsch D, Cappello C, Meyer J, Simanowski K, Huber R and Brand K, CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology. *J Biol Chem* **286**, 22716-22729 (2011).
  38. Hirai H, Zhang P, Dayaram T, Hetherington CJ, Mizuno S, Imanishi J, Akashi K and Tenen DG, C/EBPbeta is required for 'emergency' granulopoiesis. *Nat Immunol* **7**, 732-739 (2006).
  39. Screpanti I, Romani L, Musiani P, Modesti A, Fattori E, Lazzaro D, Sellitto C, Scarpa S, Bellavia D, Lattanzio G, Bistoni F, Frati L, Cortese R, Gulino A, Ciliberto G, Costantini F and Poli V, Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP beta-deficient mice. *EMBO J* **14**, 1932-1941 (1995).
  40. de Keizer PL, Packer LM, Szybowska AA, Riedl-Polderman PE, van den Broek NJ,

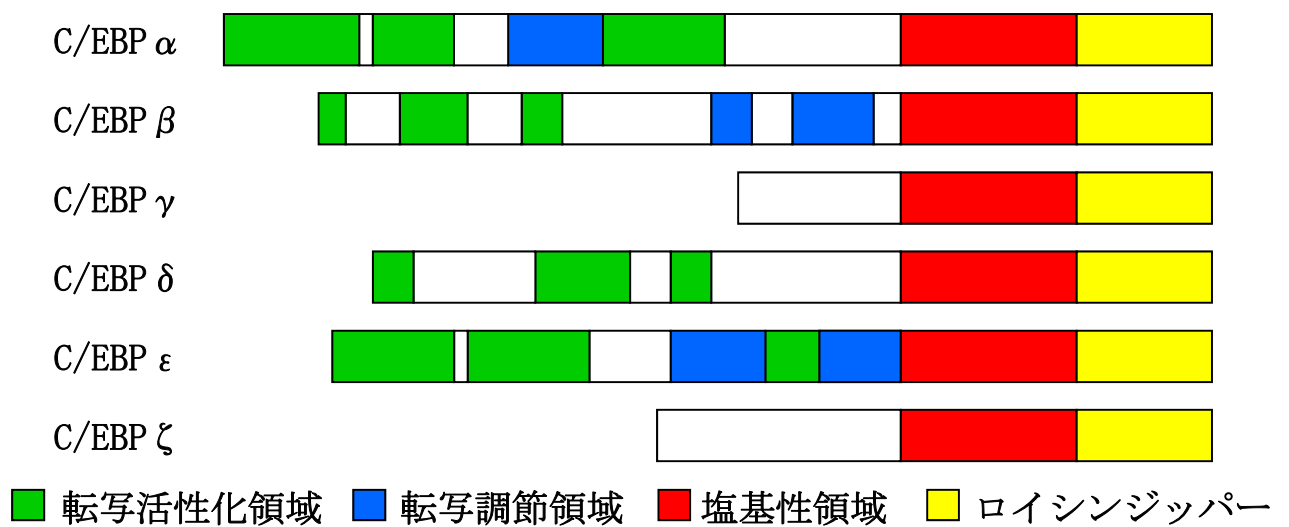


- de Bruin A, Dansen TB, Marais R, Brenkman AB and Burgering BM, Activation of forkhead box O transcription factors by oncogenic BRAF promotes p21cip1-dependent senescence. *Cancer Res* **70**, 8526-8536 (2010).
41. O'Neill KE, Thowfeequ S, Li WC, Eberhard D, Dutton JR, Tosh D and Slack JM, Hepatocyte-ductal transdifferentiation is mediated by reciprocal repression of SOX9 and C/EBPalpha. *Cell Reprogram* **16**, 314-323 (2014).
  42. Okazaki K, Yu H, Davies SR, Imamura T and Sandell LJ, A promoter element of the CD-RAP gene is required for repression of gene expression in non-cartilage tissues in vitro and in vivo. *J Cell Biochem* **97**, 857-868 (2006).
  43. Akira S, NF-IL6 and gene regulation. *Res Immunol* **143**, 734-736 (1992).
  44. Huber R, Pietsch D, Panterodt T and Brand K, Regulation of C/EBPbeta and resulting functions in cells of the monocytic lineage. *Cell Signal* **24**, 1287-1296 (2012).
  45. Zhang Z, Bryan JL, DeLassus E, Chang LW, Liao W and Sandell LJ, CCAAT/enhancer-binding protein beta and NF-kappaB mediate high level expression of chemokine genes CCL3 and CCL4 by human chondrocytes in response to IL-1beta. *J Biol Chem* **285**, 33092-33103 (2010).
  46. Duitman J, Borensztajn KS, Pulskens WP, Leemans JC, Florquin S and Spek CA, CCAAT-enhancer binding protein delta (C/EBPdelta) attenuates tubular injury and tubulointerstitial fibrogenesis during chronic obstructive nephropathy. *Lab Invest* **94**, 89-97 (2014).
  47. Hasemann MS, Lauridsen FK, Waage J, Jakobsen JS, Frank AK, Schuster MB, Rapin N, Bagger FO, Hoppe PS, Schroeder T and Porse BT, C/EBPalpha is required for long-term self-renewal and lineage priming of hematopoietic stem cells and for the maintenance of epigenetic configurations in multipotent progenitors. *PLoS genetics* **10**, e1004079 (2014).
  48. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E and Tenen DG, Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* **27**, 619-628 (2009).
  49. Imamura T, Imamura C, McAlinden A, Davies SR, Iwamoto Y and Sandell LJ, A novel tumor necrosis factor alpha-responsive CCAAT/enhancer binding protein site regulates expression of the cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene in cartilage. *Arthritis Rheum* **58**, 1366-1376 (2008).
  50. Choy L and Derynck R, Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein(C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem* **278**, 9609-9619 (2003).



### 図1. 軟骨内骨化の分化過程

未分化間葉細胞が凝縮し軟骨細胞への分化が開始され軟骨基質を産生する。増殖を停止した軟骨細胞はCOL10A1などの肥大軟骨細胞固有の基質を産生する。その一方でMMP13を中心とした基質分解酵素により基質を分解し、VEGFAなどのサイトカインを分泌することにより血管侵入を促す。軟骨細胞はアポトーシスにより消失し、軟骨から骨への置換が起こる。

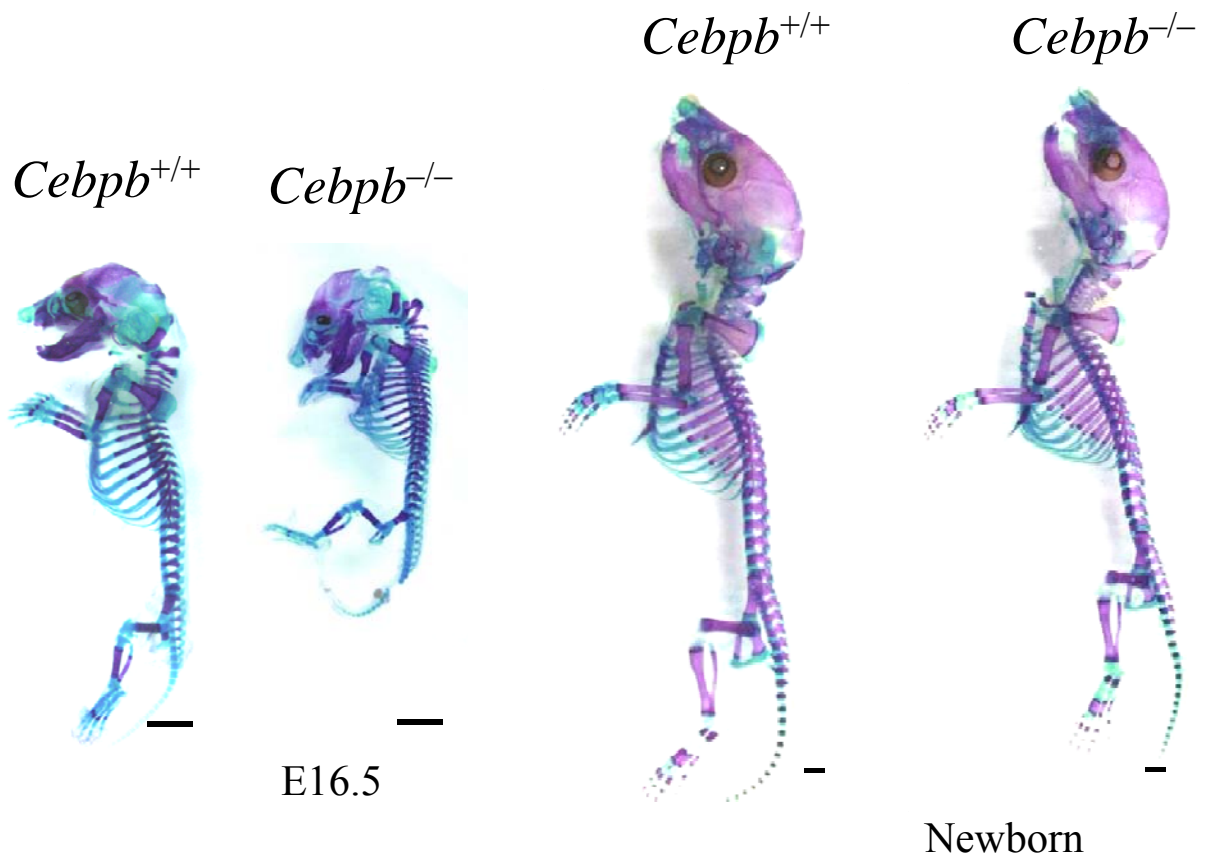


DP Ramji et al., *Biochem J.* 2002;365,561-75

## 図2. C/EBPファミリー

共通のロイシンジッパー構造を持つ転写因子群。C末端55-65アミノ酸残基には90%以上の同一塩基配列を共有するロイシンジッパー（bZIP）が存在する。N末端では転写活性化領域（TAD）の短い領域以外の相同性は20%以下である。

C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ 、C/EBP $\epsilon$ の4種類がTADを有している。



**図3. C/EBPβ<sup>-/-</sup>マウスの成長障害**

胎生16.5日と生後3日のマウス、アルシアンブルー-アリザリンレッド二重染色。  
胎生期は約25%の骨格成長障害を示すが、生後7日以内にcatch upする。

Scale bar: 2mm

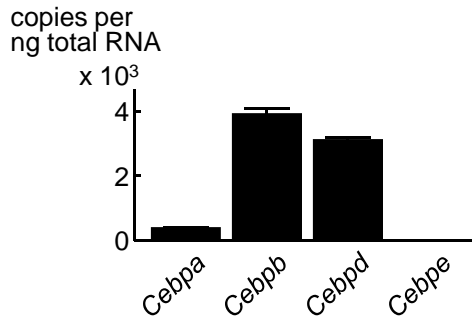


図4. マウス肋軟骨初代培養細胞におけるC/EBPファミリーの発現

mRNAをRT-PCRで測定。CebpbとCebpdは豊富に発現しており、Cebpaは中等度。Cebpeはほとんど発現が見られなかった。

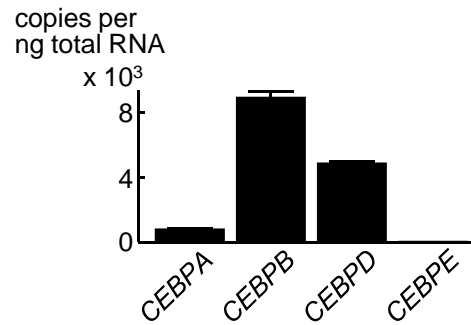
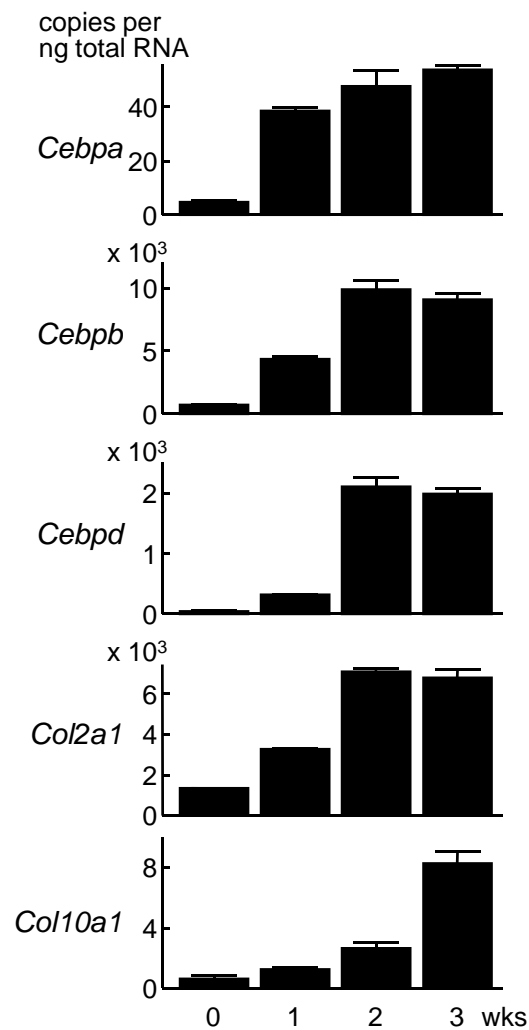
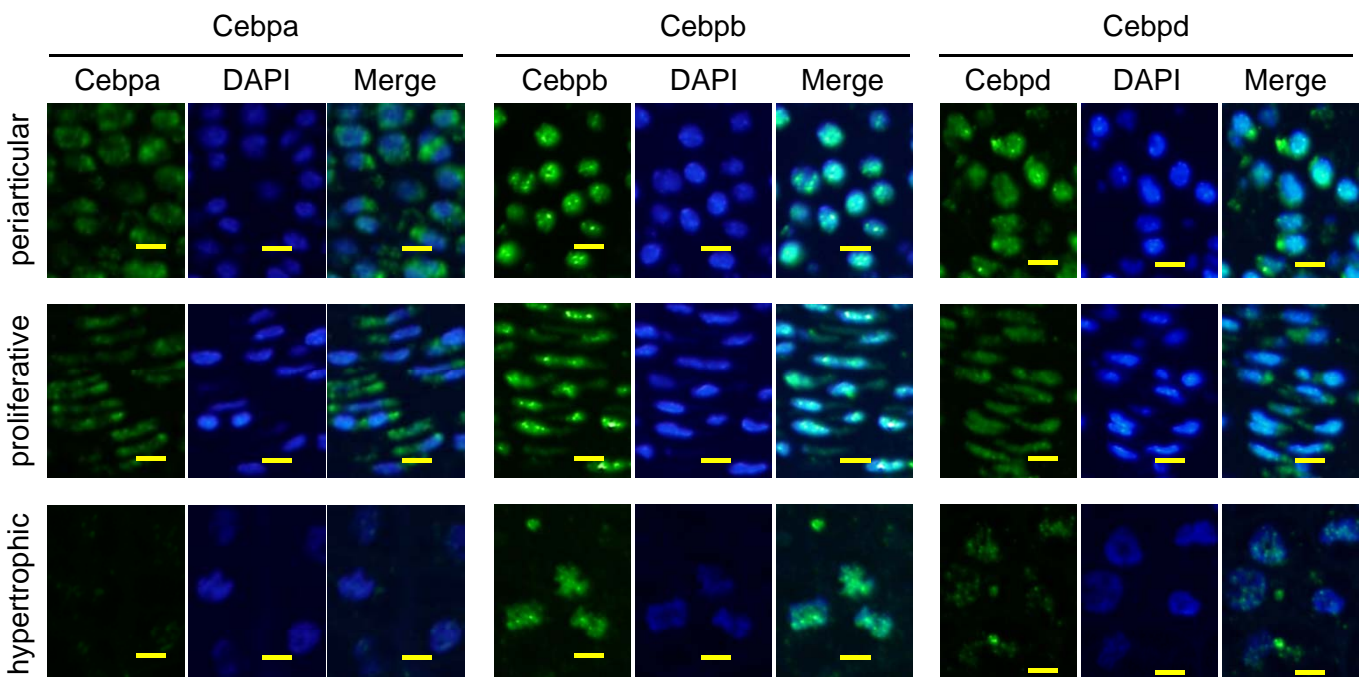
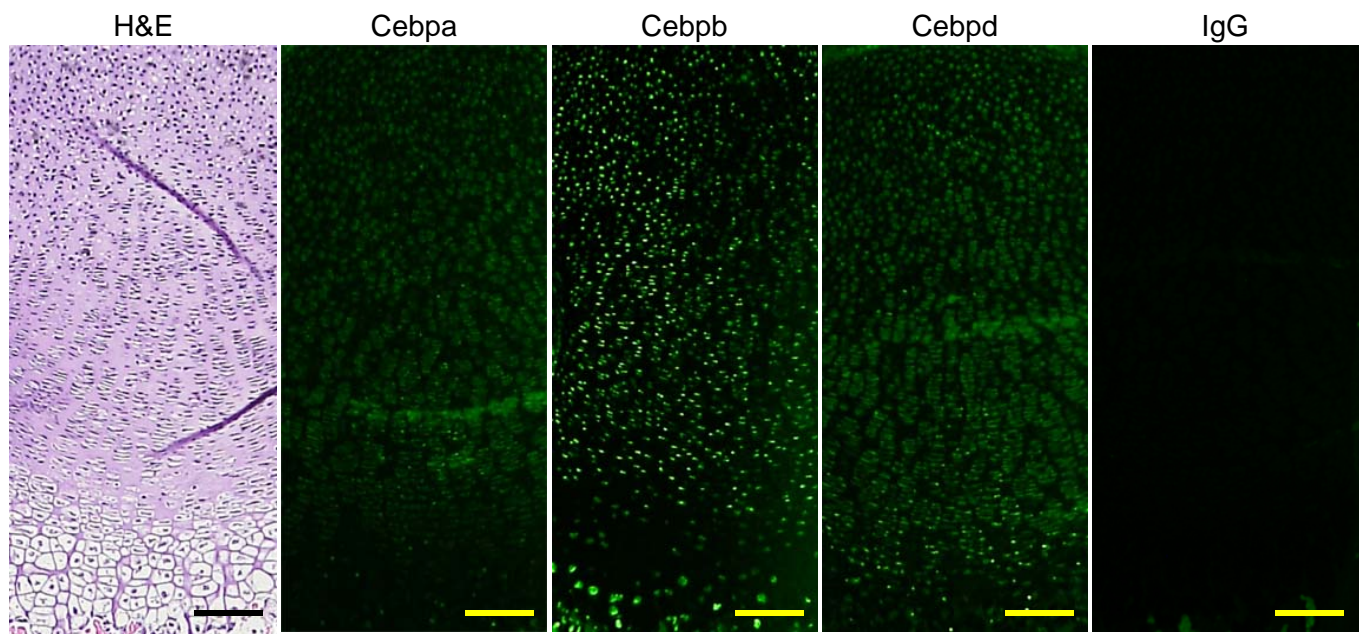


図5. ヒト気管支組織におけるC/EBPファミリーの発現

市販ヒト組織パネルを使用。mRNAをRT-PCRで測定。CebpbとCebpdは豊富に発現しており、Cebpaは中等度。Cebpeはほとんど発現が見られなかった。



**図6. ATDC5細胞分化誘導による各mRNA発現**  
 ATDC5細胞をITS添加下で平面培養し、1週、2週、3週でRNAを回収。リアルタイムRT-PCRでmRNAの発現を測定。*Cebpa*は初期分化が起きる1~2週、*Cebpb*、*Cebpd*は遅れて2~3週で発現が増加する。*Col2a1*は初期分化、*Col10a1*は肥大分化のそれぞれ指標となる。



### 図7. マウス成長板の免疫組織染色

胎生17.5日のマウスの脛骨成長板を用いて免疫組織染色を実施。  
 Cebpaは増殖層～前肥大層、CebpbとCebpdは前肥大層～肥大層にかけて  
 発現が見られた。Scale bar: 上段 100  $\mu$ m、下段 10  $\mu$ m

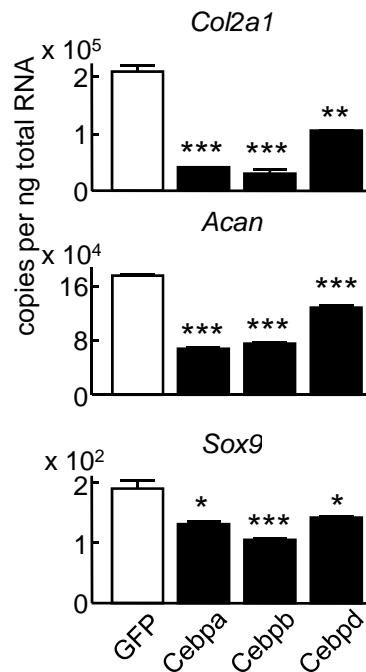


図8. C/EBPファミリー強制発現による初期分化マーカーmRNA発現  
DOX誘導性強制発現(TetO)システムを安定導入したATDC5細胞を  
0週からDOXを添加し、ITS存在下に培養して2週間で回収したmRNA。  
Cebpa, Cebpb, Cebpd いずれの強制発現においてもCol2a1, Aggrecan,  
Sox9 のmRNAレベルは低下した。\*\*\* P<0.005, \*\* P<0.01, \* P<0.05



図9. C/EBPファミリー強制発現による初期分化への影響  
DOX誘導性強制発現(TetO)システムを安定導入したATDC5細胞を  
0週からDOXを添加し、ITS存在下に培養した細胞をアルシアンブルーで染色。  
Cebpa, Cebpb, Cebpd いずれの強制発現においても染色性は軽度減弱した。



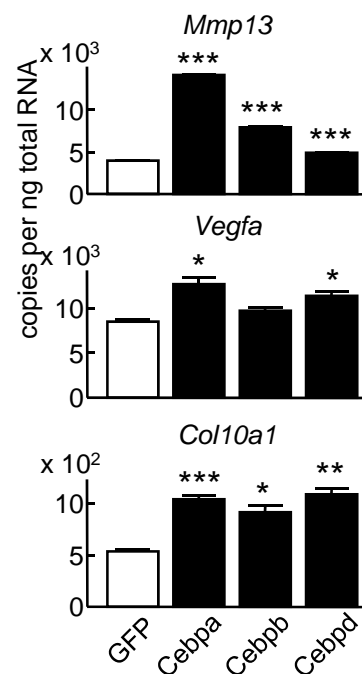


図10. C/EBPファミリー強制発現による肥大分化マーカーmRNA発現  
DOX誘導性強制発現(TetO)システムを安定導入したATDC5細胞を  
2週からDOXを添加し、ITS存在下に3週間、さらにリン存在下で2日間  
培養した後に回収したmRNA。  
Cebpa, Cebpb, Cebpd いずれの強制発現においてもMmp13, Vegfa, Col10a1の  
mRNAレベルは上昇した。\*\*\* P<0.005, \*\* P<0.01, \* P<0.05

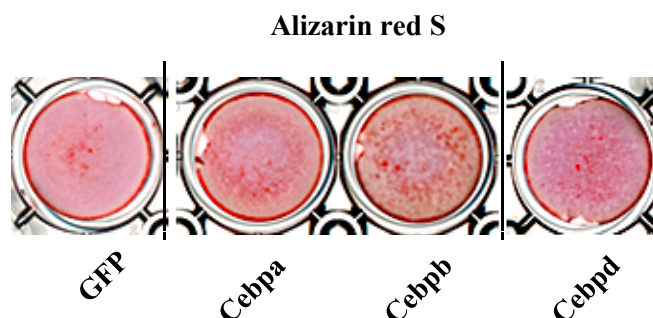
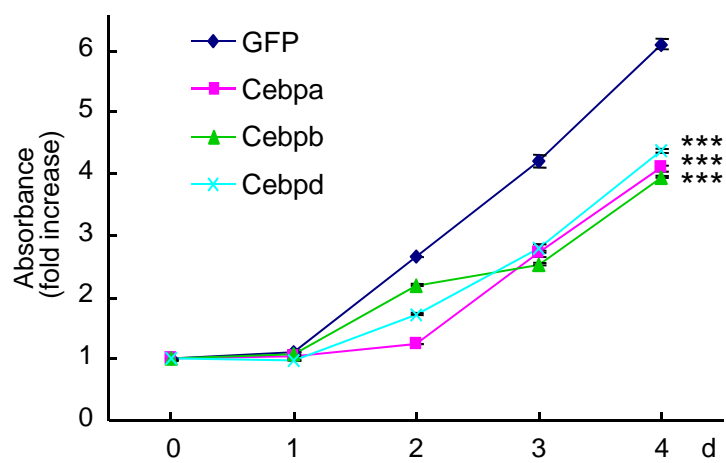
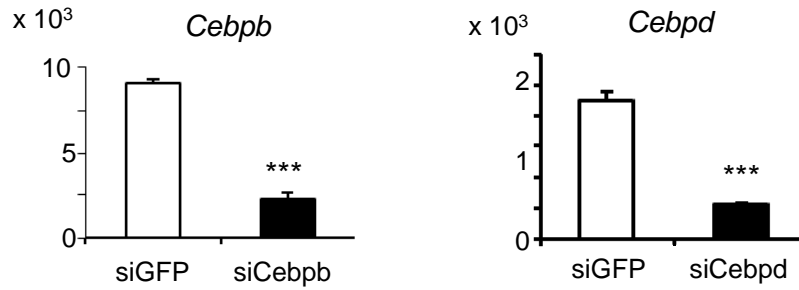


図11. C/EBPファミリー強制発現による肥大分化への影響  
DOX誘導性強制発現(TetO)システムを安定導入したATDC5細胞を  
2週からDOXを添加し、ITS存在下に3週間、さらにリン存在下で2日間  
培養した細胞をアリザリンレッドSで染色。  
Cebpa, Cebpb, Cebpd いずれの強制発現においても染色性は増強した。

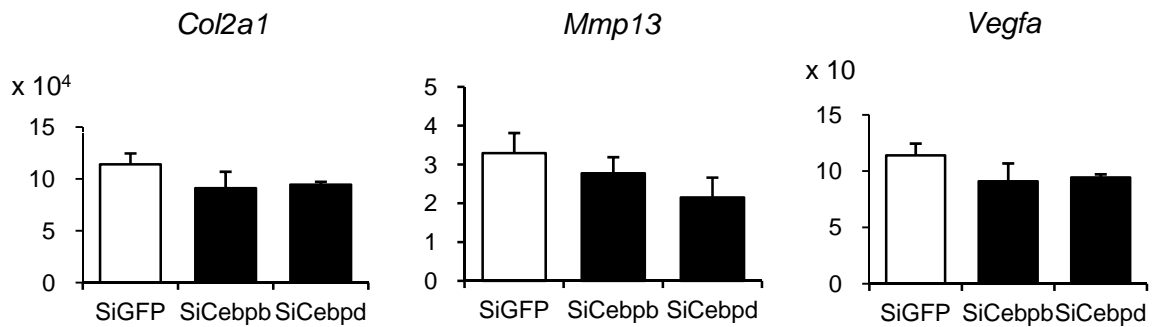


**図12. C/EBPファミリー強制発現系における細胞増殖率**  
 DOX誘導性C/EBPファミリー強制発現系のATDC5細胞をDOX添加して培養。CCK-8を用いて生細胞数を吸光度で測定。C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  いずれの強制発現によっても、細胞増殖速度は抑制された。\*\*\* P<0.005



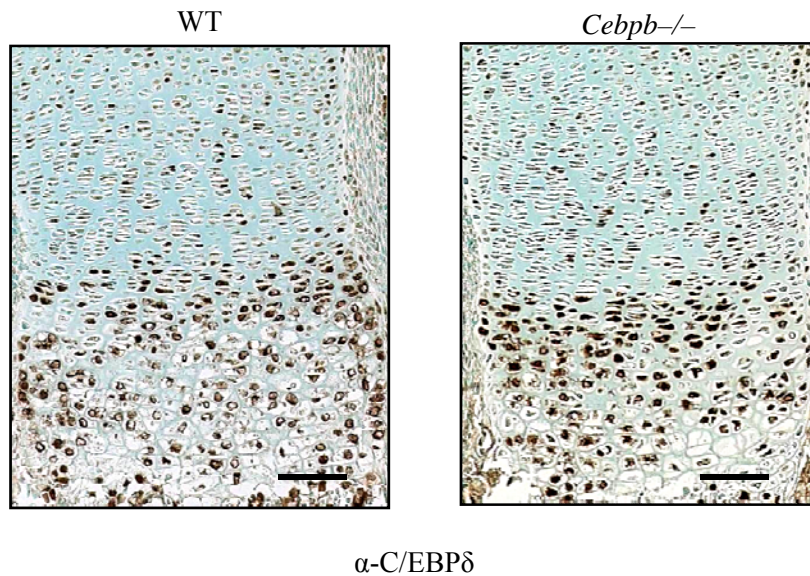
**図13. RNA干渉による抑制効果**

siRNAをATDC5細胞にlipofectionして72時間後にRNAを回収。RT-PCRでRNA干渉による抑制効果を確認した。Cebpb、Cebpdとも20～30%まで発現が抑制されていた。\*\*\* P<0.005

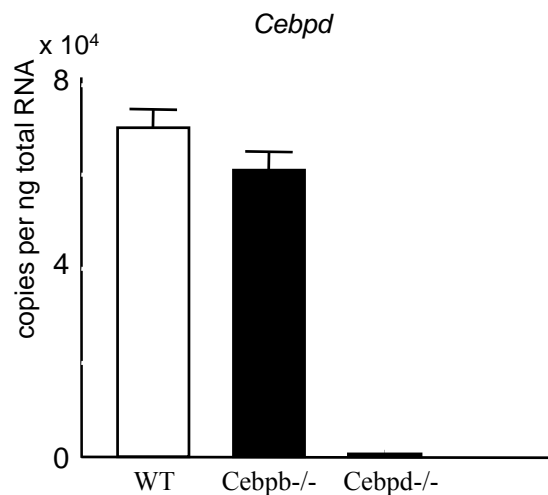


**図14. RNA干渉による軟骨分化マーカーへの影響**

siRNAをATDC5細胞にlipofectionして72時間培養してRNAを回収。Col2a1、Mmp13、Vegfaいずれもほとんど差が見られなかった。



**図15. *Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスの成長板における*Cebpd*の発現**  
 胎生17.5日の*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスの脛骨成長板に免疫組織染色を実施。  
 前肥大層において、*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスの方がわずかに発現が多く見られた。  
 Scale bar: 100μm



**図16. *Cebpb*<sup>-/-</sup>マウス肋軟骨初代培養細胞における*Cebpd*の発現**  
 野生型マウス、*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウスおよび*Cebpd*<sup>-/-</sup>マウス生後5日の  
 肋軟骨初代培養細胞を採取。RNAを回収しリアルタイムRT-PCRを用いて  
*Cebpd*のmRNA発現を測定。野生型と*Cebpb*<sup>-/-</sup>マウス間に差は  
 見られなかった。

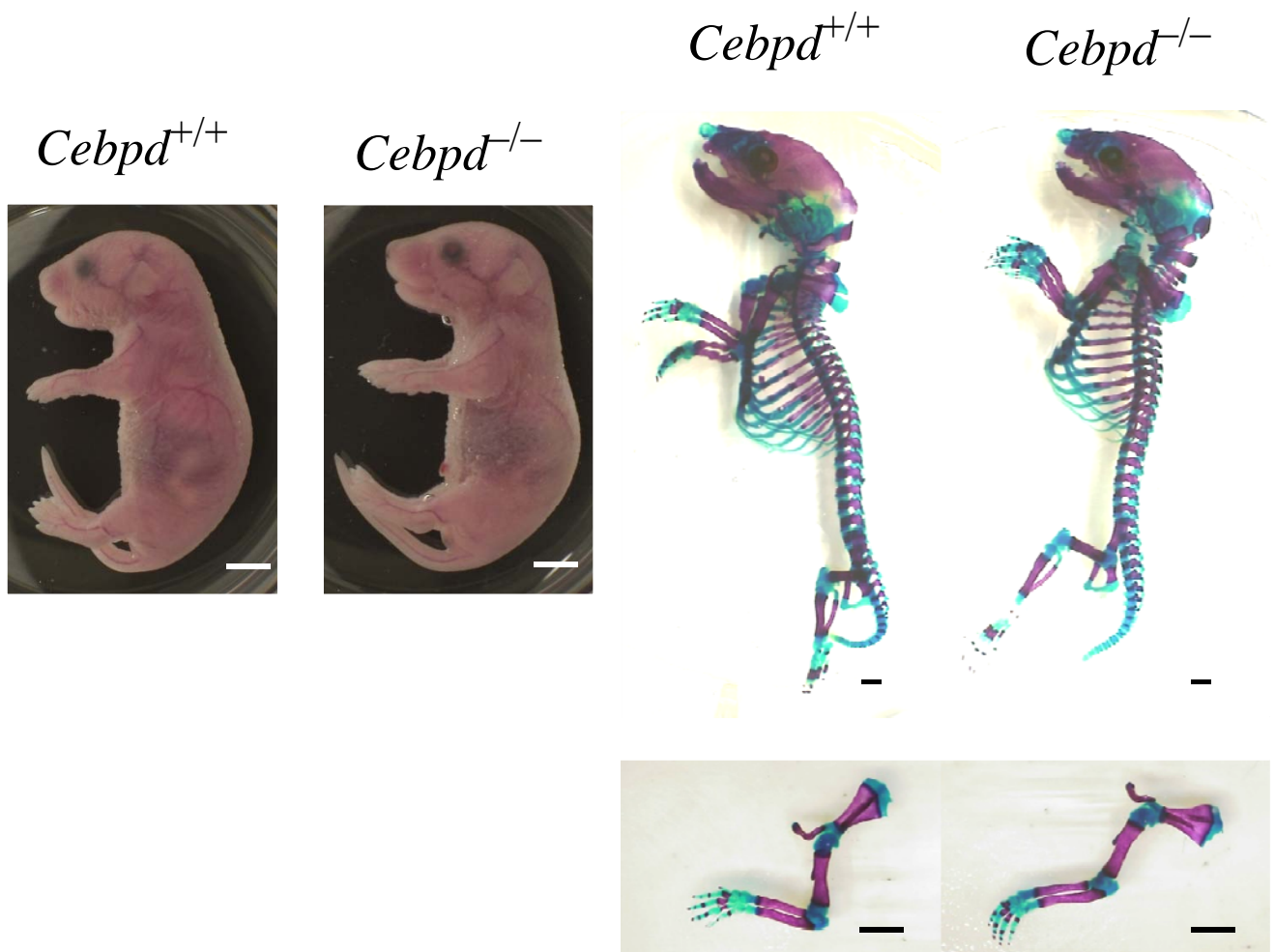


図17. *Cebpd*<sup>-/-</sup>マウスの成長障害

胎生16.5日と生後3日のマウス、肉眼所見とアルシアンブルー-アリザリンレッド二重染色。成長障害やパターンニング異常は見られず成長曲線も野生型と欠損マウスで差がなかった。

Scale bar: 2mm

<i>Cebpb</i>	+/+	+/-	+/-
<i>Cebpd</i>	+/-	+/-	-/-

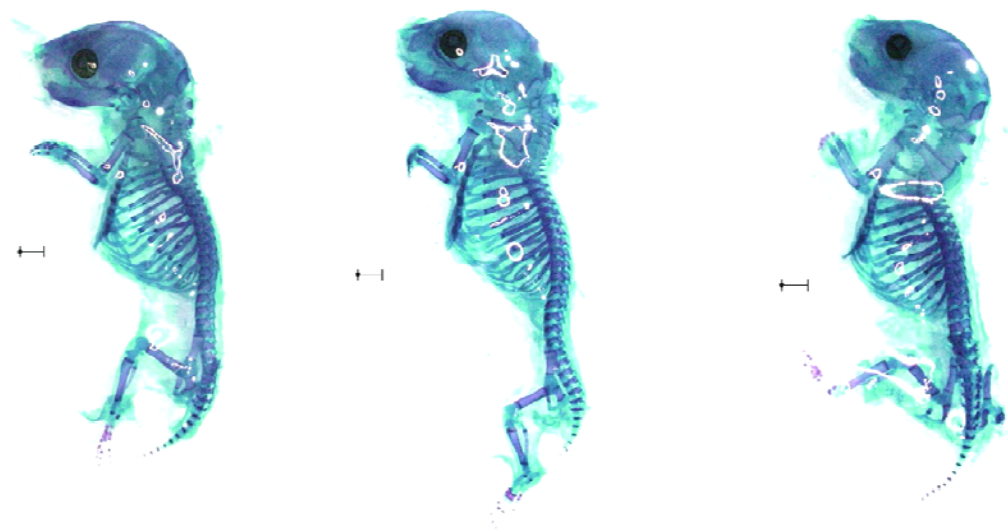
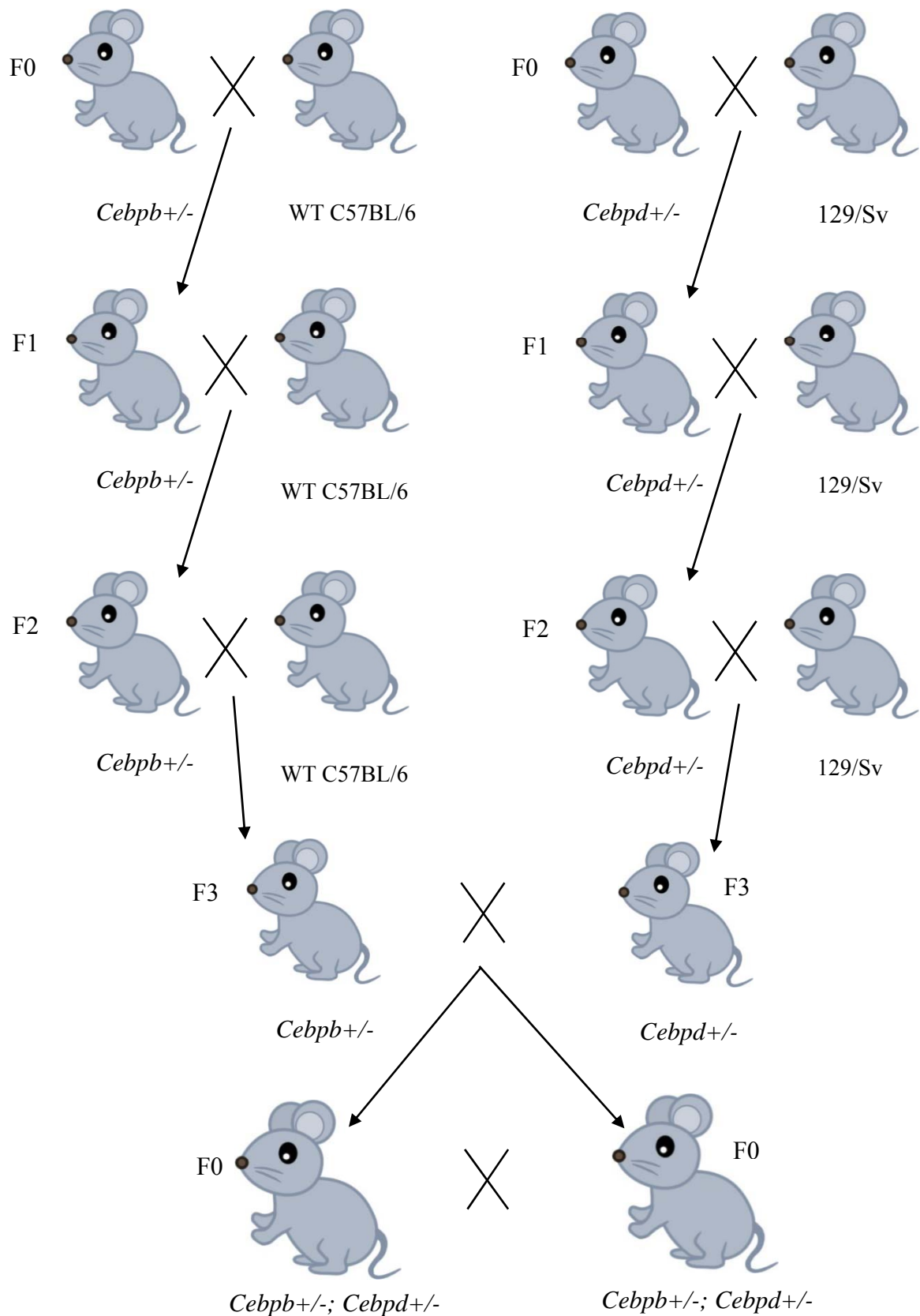


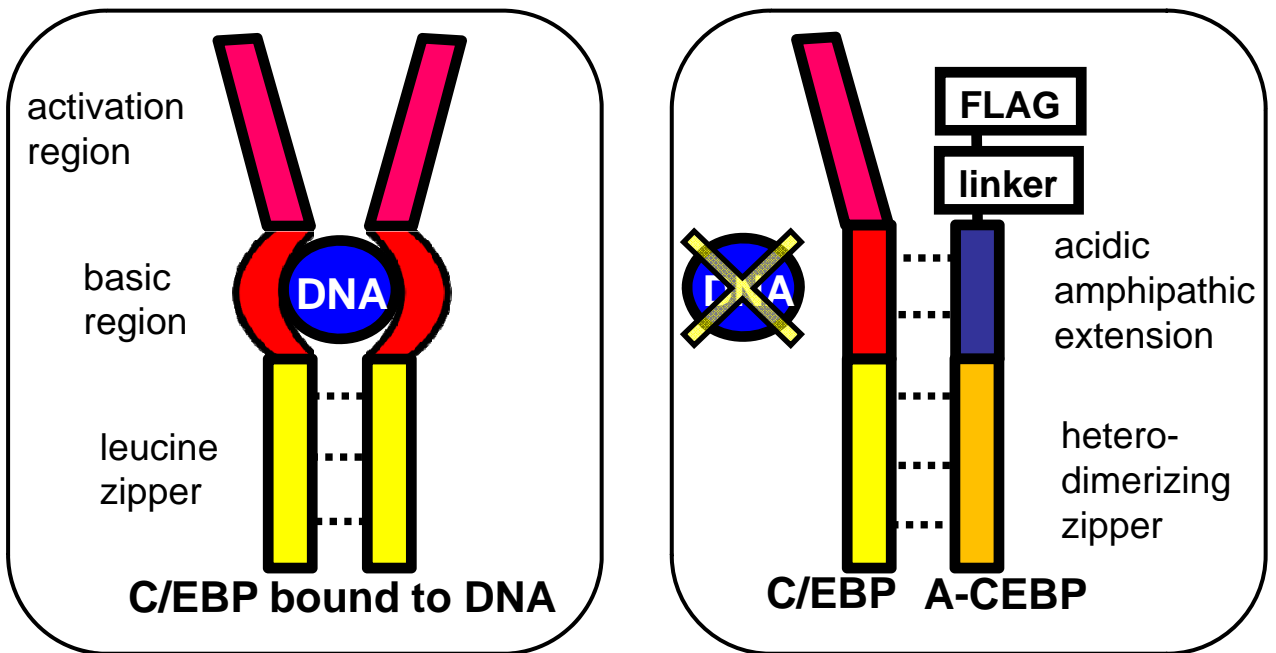
図18. *Cebpb*<sup>+/-</sup>-マウスと*Cebpd*<sup>+/-</sup>-マウスの掛け合わせ

胎生17.5日のマウス、アルシアンブルー-アリザリンレッド二重染色。  
ダブルノックアウトは生まれず。明らかな成長障害は見られない。

Scale bar: 1mm



**図19. Cebpb KOマウスとCebpd KOマウスのバッククロスと掛け合わせ**  
 C/EBP $\beta$ ヘテロKO( $Cebpb^{+/-}$ )マウスと野生型C57BL/6を交配。ヘテロKOで継代を重ね、F3の $Cebpb^{+/-}$ マウスを得た。同様にC/EBP $\delta$ ヘテロKO( $Cebpd^{+/-}$ )マウスと野生型129/Svを交配させ、F3の $Cebpd^{+/-}$ マウスを得た。 $Cebpb^{+/-}$ マウスと $Cebpd^{+/-}$ マウスとを交配させ、C/EBP $\beta$ ;C/EBP $\delta$ ダブルヘテロKO( $Cebpb^{+/-}; Cebpd^{+/-}$ )マウスを作出。 $Cebpb^{+/-}; Cebpd^{+/-}$ マウス同士を交配させ、ダブルノックアウトマウスの作出を試みた。



Moitra et al., *GenDev*, 1998

Vinson et al., *MCB*, 2002

### A-CEBP

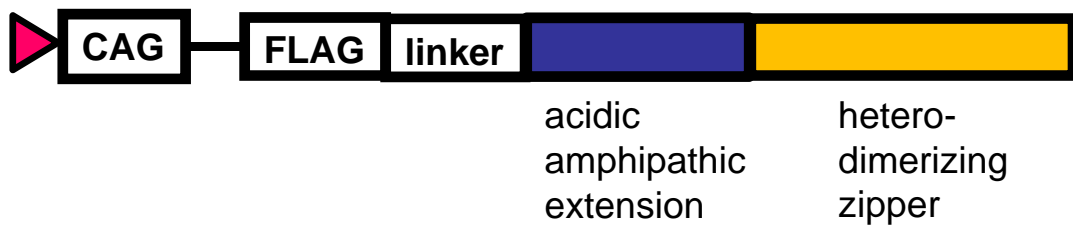
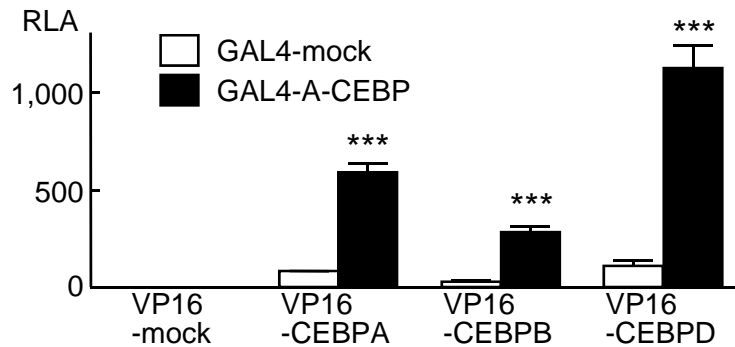


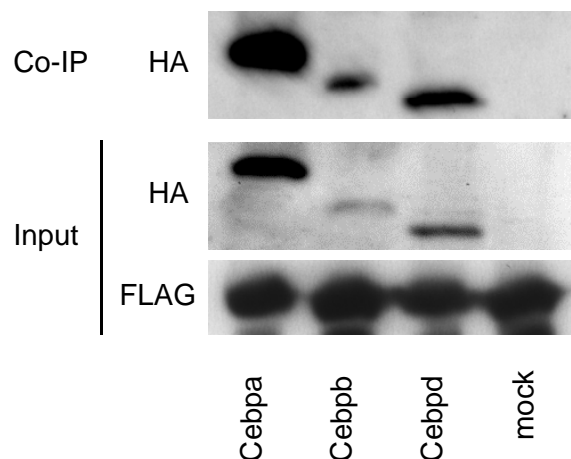
図20. A-CEBPの構造

C/EBPファミリーのロイシンジッパー構造に特異的にヘテロダイマーを形成するジッパー構造と、C/EBPファミリーのDNA結合部位を阻害する酸親媒性エクステンションを連結した上に、LinkerでFLAG-tagを標識している。

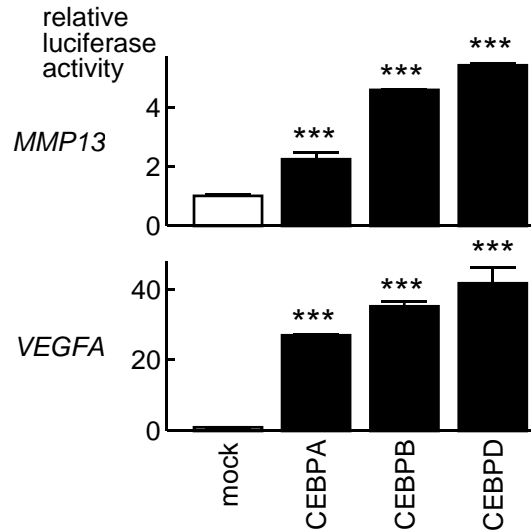




**図21. 哺乳類ツーハイブリッド法によるA-CEBPとC/EBPファミリーの親和性の評価**  
 GAL4を含むpBINDベクターにA-CEBPを組み込んだもの、VP16を含むpACTベクターに各C/EBPファミリーを組み込んだもの、双方をレポーターベクターpG5Lucと共にHeLa細胞へ共遺伝子導入して48時間培養。ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発光度を測定して、pBINDに元々含まれるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の発光度でトランスフェクション効率の補正を行った。A-CEBPは、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ のいずれとも相互作用があることが確認された。\*\*\* P<0.005

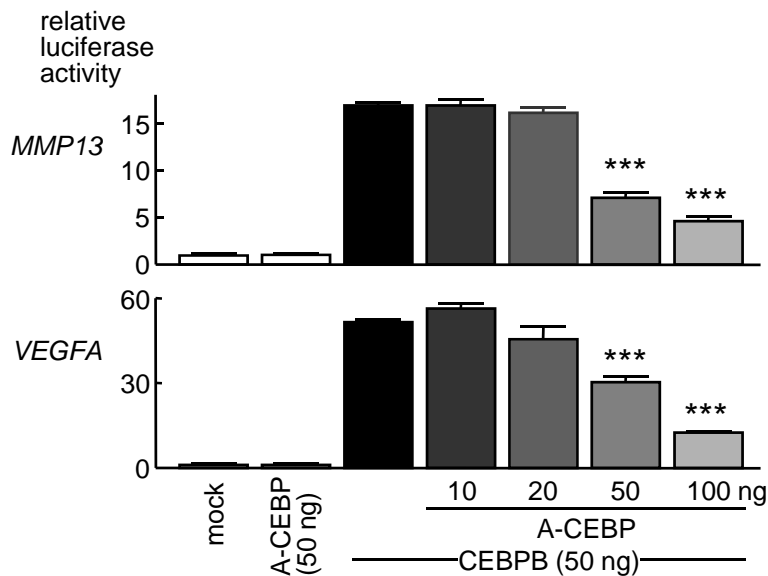


**図22. 共免疫沈降法によるA-CEBPとC/EBPファミリーのタンパク結合能の評価**  
 A-CEBPを3xFLAG-Tagで、各C/EBPファミリーを3xHA-Tagで標識したベクターを作成。HeLa細胞に共遺伝子導入して48時間培養した。細胞溶解液を回収し、EZ view Red Anti-FLAG M2 Affinity Gel に吸着させたサンプルを抗HA抗体で検出した。A-CEBPは、C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ のいずれともタンパク結合能を有することが確認された。



**図23. C/EBPファミリーのMMP13, VEGFAに対するプロモーター活性**

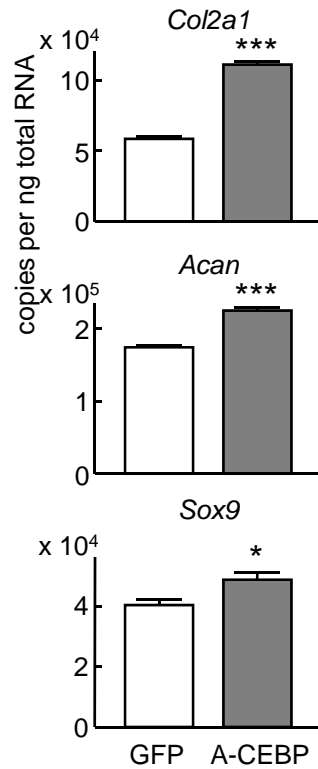
HeLa細胞に各C/EBPファミリー発現ベクターとレポーターベクターを共遺伝子導入。ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発光度を、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の発光度で補正した。C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$ はいずれもMMP13およびVEGFAのプロモーター活性を上昇させた。\*\*\* P<0.005



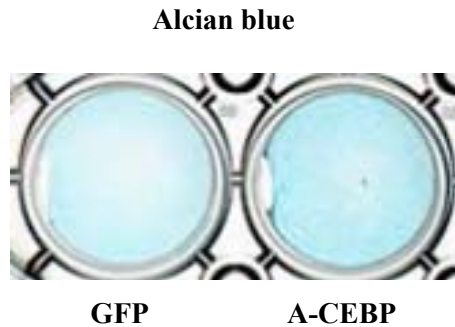
**図24. A-CEBPのC/EBPファミリーに対する競合阻害能**

C/EBP $\beta$ 発現ベクターとA-CEBP発現ベクターを共遺伝子導入したHeLa細胞を培養しMMP13とVEGFAのプロモーター活性を観察した。ベクターは総量150 ngとなるようGFP発現ベクターを追加して調節した。C/EBP $\beta$ によるMMP13およびVEGFAへのプロモーター活性上昇効果は、A-CEBPの用量依存的に阻害された。

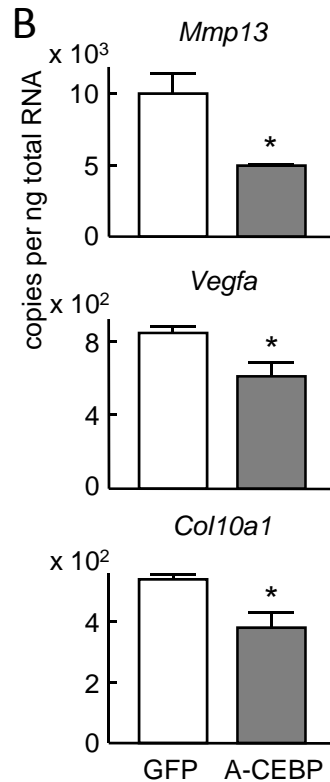
\*\*\* P<0.005



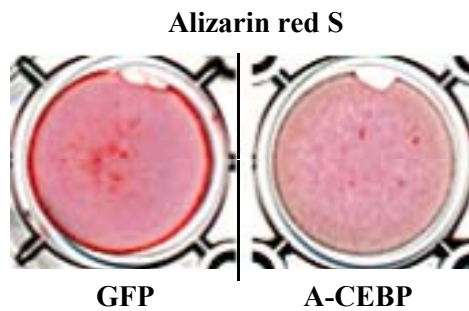
**図25. A-CEBP強制発現による初期分化マーカーmRNA発現**  
 DOX誘導性強制発現(TetO)システムを安定導入したATDC5細胞を、0週からDOXを添加し、ITS存在下に2週間培養した後に回収したmRNA。Col2a1, Aggrecanで上昇、Sox9で軽度の上昇が見られた。  
 \*\*\* P<0.005, \* P<0.05



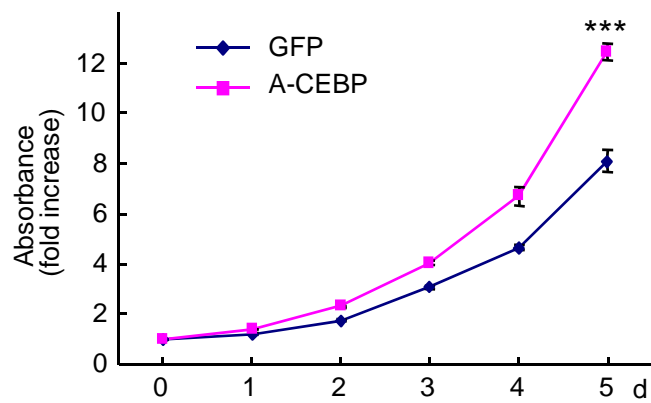
**図26. A-CEBP強制発現による初期分化への影響**  
 DOX誘導性強制発現(TetO)システムを安定導入したATDC5細胞を0週からDOXを添加し、ITS存在下に2週間培養した後にアルシアンブルー染色。A-CEBPによって染色性の増強が見られた。



**図27. A-CEBP強制発現による肥大分化マーカーmRNA発現**  
 DOX誘導性強制発現(TetO)システムを安定導入したATDC5細胞を2週からDOXを添加し、ITS存在下に3週間培養した後に回収したmRNA。  
 \* P<0.05



**図28. A-CEBP強制発現による肥大分化への影響**  
 DOX誘導性強制発現(TetO)システムを安定導入したATDC5細胞を2週からDOXを添加し、ITS存在下に3週間培養した細胞にアリザリンレッドSによる染色を行った。  
 A-CEBPは染色性を低下させた。



**図29. A-CEBP強制発現系における細胞増殖率**

DOX誘導性A-CEBP強制発現系のATDC5細胞をDOX添加して培養。CCK-8を用いて生細胞数を吸光度で測定。A-CEBPによって、細胞増殖速度は促進された。\*\*\* P<0.005

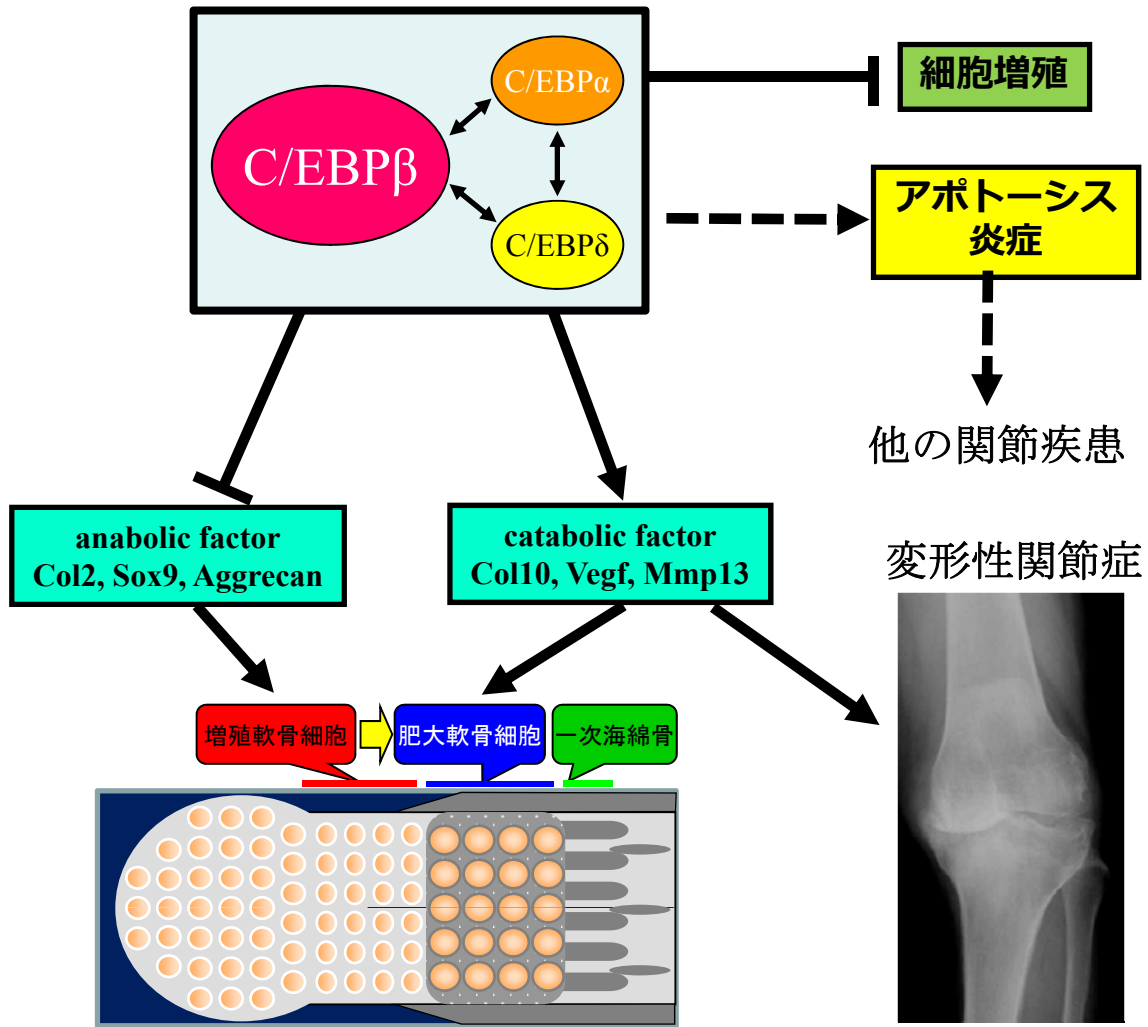


図30. C/EBPファミリーの包括的な機能

C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\delta$  は、軟骨細胞の初期分化を抑制し肥大分化を促進、細胞増殖を抑制するという類似した機能を有する。

表1. *Cebpb*<sup>+/-</sup>;*Cebpd*<sup>+/-</sup> マウス同士の掛け合わせの出生状況

<i>Cebpb</i>		<i>Cebpd</i>	
+/+	56		
+/-	88		
		+/+	0
-/-	1	+/-	1
		-/-	0

表2. バッククロス後を含めた*Cebpb*<sup>+/-</sup>;*Cebpd*<sup>+/-</sup> マウス同士の掛け合わせの総出生状況

<i>Cebpb</i>		<i>Cebpd</i>	
+/+	92		
+/-	145		
		+/+	2
-/-	4	+/-	2
		-/-	0

表3. A-CEBP強制発現によって低下した骨格成長関連遺伝子 (log2 <-1)

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio (log2)	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Mmp9</i>	NM_013599	-7.450879821	1375.881586	7.863986119
2	<i>Pax1</i>	NM_008780	-6.599195248	786.4176399	8.111431961
3	<i>Sox11</i>	NM_009234	-6.26548783	530.1428006	6.891172061
4	<i>Myf6</i>	NM_008657	-3.416057564	86.375571	8.091986281
5	<i>Hoxa11</i>	NM_010450	-2.982280827	55.80648919	7.062016329
6	<i>Sox15</i>	NM_009235	-2.33941969	38.15908374	7.539845365
7	<i>Dmpk</i>	NM_001190491	-2.026711424	95.37385344	23.40606457
8	<i>Igf2bp2</i>	NM_183029	-1.741202877	1687.603092	504.7961314
9	<i>Nlgn1</i>	BC005523	-1.623140727	33.50159947	10.87555668
10	<i>Slc8a1</i>	NM_011406	-1.542833505	21.0786904	7.234432384
11	<i>Fam20c</i>	NM_030565	-1.523934299	6927.619459	2408.984957
12	<i>Hoxd3</i>	NM_010468	-1.485944225	22.82767414	8.149817444
13	<i>Hoxb1</i>	NM_008266	-1.449790365	18.30773338	6.701996423
14	<i>Gas1</i>	NM_008086	-1.369957065	427.7348105	165.4917798
15	<i>Dscaml1</i>	NM_001081270	-1.355049659	17.95738363	7.019924931
16	<i>Dlx1</i>	ENSMUST00000126400	-1.309900965	30.54906962	12.32192345
17	<i>Epb4.1l5</i>	NM_001113416	-1.211018851	68.57759055	29.62301257
18	<i>Gja5</i>	NM_001271628	-1.206730796	45.03897524	19.51310288
19	<i>Wnt7a</i>	NM_009527	-1.11535404	18.45937471	8.520438847
20	<i>Hivep3</i>	ENSMUST00000123698	-1.080561197	253.3630282	119.8014042
21	<i>Ryr1</i>	NM_009109	-1.07490302	18.85676675	8.951363175



表4. A-CEBP強制発現によって上昇した骨格成長関連遺伝子 ( $\log_2 > 1$ )

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio ( $\log_2$ )	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Tnnt1</i>	ENSMUST00000108587	4.123377634	13.74847499	239.6154842
2	<i>Sox8</i>	NM_011447	2.4962156	24.77908602	139.8044691
3	<i>Meg3</i>	NR_027652	1.569070505	12.90192456	38.28175025
4	<i>Edn1</i>	NM_010104	1.560300917	32.28262884	95.20642793
5	<i>Cntfr</i>	NM_001136056	1.506072075	11.97337126	34.00864424
6	<i>Ihh</i>	NM_010544	1.504266097	647.6353213	1837.213987
7	<i>Mypn</i>	NM_182992	1.394452857	9.391600122	24.68946791
8	<i>Eomes</i>	NM_010136	1.391974876	9.139202242	23.98471038
9	<i>Hoxc8</i>	NM_010466	1.356067166	14.21432261	36.38673275
10	<i>Tnni2</i>	NM_009405	1.315063717	8383.851112	20860.13824
11	<i>Tnnt3</i>	NM_011620	1.29169783	42.00240411	102.8286043
12	<i>Megf10</i>	NM_001001979	1.20646874	458.4448456	1057.962743
13	<i>Gja5</i>	AK038780	1.197448461	30.95624457	70.9931055
14	<i>Jag2</i>	NM_010588	1.186490103	32.92535001	74.93755359
15	<i>Asb2</i>	U76382	1.157118924	11.19264035	24.96088927
16	<i>Satb2</i>	NM_139146	1.134132678	27.72350684	60.84937473
17	<i>Cav3</i>	NM_007617	1.090993028	623.0865366	1327.302749

表5. A-CEBP強制発現によって低下した軟骨関連遺伝子 ( $\log_2 < -1$ )

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio (log2)	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Hoxa11</i>	NM_010450	-2.982280827	55.80648919	7.062016329
2	<i>Hoxd3</i>	NM_010468	-1.485944225	22.82767414	8.149817444
3	<i>Mmp13</i>	NM_008607	-1.126243878	14485.18155	6635.761269
4	<i>Wnt7a</i>	NM_009527	-1.11535404	18.45937471	8.520438847
5	<i>Smad1</i>	AK084505	-1.067359015	18.78894352	8.965928709
6	<i>Otor</i>	NM_020595	-1.009341945	231.4340552	114.970141

表6. A-CEBP強制発現によって上昇した軟骨関連遺伝子 ( $\log_2 > 1$ )

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio ( $\log_2$ )	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Hand1</i>	NM_008213	1.767081317	9.046723349	30.79185061
2	<i>Edn1</i>	NM_010104	1.560300917	32.28262884	95.20642793
3	<i>Ihh</i>	NM_010544	1.504266097	647.6353213	1837.213987
4	<i>Acan</i>	NM_007424	1.245007169	4612.228701	10931.89211
5	<i>Frzb</i>	NM_011356	1.185485497	5409.919132	12304.31575
6	<i>Satb2</i>	NM_139146	1.134132678	27.72350684	60.84937473
7	<i>Fgfr3</i>	NM_001163215	1.106863563	7835.567892	16876.00368
8	<i>Wnt7b</i>	NM_001163634	1.000131573	22.2768057	44.55767483

表7. A-CEBP強制発現によって低下した細胞増殖関連遺伝子 ( $\log_2 < -1$ )

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio ( $\log_2$ )	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Il12b</i>	NM_008352	-6.72347437	630.6802583	5.968178122
2	<i>Mx1</i>	NM_010846	-4.04844488	449.1122703	27.1426081
3	<i>Mecom</i>	NM_021442	-2.658124	72.39715419	11.46955161
4	<i>Ccna1</i>	NM_007628	-2.28790064	32.29335408	6.612815943
5	<i>Muc1</i>	NM_013605	-2.23508684	31.10021084	6.605948017
6	<i>E2f5</i>	NM_007892	-2.20950931	2631.686302	568.9911886
7	<i>Gmnc</i>	NM_001013761	-2.19138677	36.7583791	8.047911712
8	<i>Brca1</i>	NM_009764	-2.04017867	32.63735548	7.935238547
9	<i>Ush1c</i>	NM_153677	-2.00055189	27.03685556	6.7566287
10	<i>Pdpn</i>	NM_010329	-1.9765281	27.70401541	7.039607992
11	<i>Ern1</i>	ENSMUST00000106800	-1.94770244	30.72454207	7.964684203
12	<i>Map3k8</i>	NM_007746	-1.92113783	786.2400844	207.6036894
13	<i>Fgf10</i>	NM_008002	-1.88220704	36.5637004	9.918576878
14	<i>Csrp2bp</i>	AK052742	-1.87106576	75.71057304	20.69710566
15	<i>Spdya</i>	NM_001142631	-1.69787063	24.95014439	7.6906505
16	<i>Nsl1</i>	NM_198654	-1.66178749	25.04481173	7.91534576
17	<i>Fam5c</i>	ENSMUST00000125331	-1.56720023	21.46285257	7.242911276
18	<i>Sycp3</i>	Y08485	-1.49600201	16.37260155	5.804652344
19	<i>Syce3</i>	NM_001162880	-1.48717199	21.01177231	7.495132401
20	<i>Ahr</i>	NM_013464	-1.45604295	11359.25611	4140.352221
21	<i>Ifng</i>	NM_008337	-1.3975688	33.96474408	12.89193826
22	<i>Gas1</i>	NM_008086	-1.36995706	427.7348105	165.4917798
23	<i>Rabgap1</i>	NM_001033960	-1.33930226	18.22695306	7.203505975
24	<i>Taf1</i>	NM_001081008	-1.33699743	23.20869932	9.187016004
25	<i>Nr4a3</i>	NM_015743	-1.29401364	14.91135197	6.081071384
26	<i>Plk2</i>	NM_152804	-1.25103221	2263.314422	950.925886
27	<i>Irf1</i>	NM_001159393	-1.21913393	47.18036656	20.26587827
28	<i>D7Ert443e</i>	NM_001199941	-1.15210319	21.15303557	9.518205602
29	<i>Krtap21-1</i>	NM_028621	-1.13991694	17.84472516	8.097681129
30	<i>Dmc1</i>	NM_010059	-1.11212508	16.18270891	7.486317026
31	<i>Junb</i>	NM_008416	-1.08903007	494.7486231	232.5700984
32	<i>Trim21</i>	NM_009277	-1.05656746	1211.711682	582.5601822
33	<i>Sept14</i>	NM_028826	-1.04604564	12.40417398	6.007264226
34	<i>Nek6</i>	NM_021606	-1.02202772	5493.422296	2705.091668
35	<i>Sfn1</i>	NM_011407	-1.01185399	15.91507374	7.892421176
36	<i>Ticrr</i>	AK045208	-1.00319727	23.74395726	11.84569732

表8. A-CEBP強制発現によって上昇した細胞増殖関連遺伝子 ( $\log_2 > 1$ )

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio ( $\log_2$ )	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Hras1</i>	NM_001130444	2.535546778	11.2939313	65.48182537
2	<i>Foxo4</i>	ENSMUST00000150558	1.946408875	11.3459568	43.72890284
3	<i>Ppp1cb</i>	ENSMUST00000015100	1.879817193	13.7910164	50.75486026
4	<i>Uba3</i>	NM_011666	1.784055464	269.9174753	929.5766616
5	<i>Camk2b</i>	NM_001174053	1.730111841	1264.919314	4196.414548
6	<i>Smpd3</i>	NM_021491	1.438643779	5348.470296	14497.8806
7	<i>Myb</i>	NM_001198914	1.397367498	21.23417546	55.93516627
8	<i>Khdc3</i>	NM_025890	1.3929795	8.322257206	21.85595294
9	<i>Npat</i>	NM_001081152	1.272370471	11.10933805	26.8355104
10	<i>Rassf4</i>	NM_178045	1.232721088	49.66603206	116.7200562
11	<i>Hepacam</i>	NM_175189	1.175512228	10.23189271	23.11108946
12	<i>Fgf2</i>	AY027558	1.174307295	10.96154169	24.73849983
13	<i>Eid1</i>	NM_025613	1.172284173	8.715387663	19.64171517
14	<i>Ccnd2</i>	NM_009829	1.14966355	4811.735623	10675.42002
15	<i>Hes1</i>	NM_008235	1.130590605	68.0482098	148.9904353
16	<i>Ccnd1</i>	NM_007631	1.082687121	2738.799885	5800.715962
17	<i>Esco2</i>	NM_028039	1.014548378	16.04189202	32.40895909

表9. A-CEBP強制発現によって低下した炎症関連遺伝子 (log2 <-1)

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio (log2)	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Cxcl5</i>	NM_009141	-8.226528306	5478.962434	18.29222533
2	<i>Ccl3</i>	NM_011337	-7.055578392	2296.297341	17.26185206
3	<i>Il12b</i>	NM_008352	-6.72347437	630.6802583	5.968178122
4	<i>Cxcl1</i>	NM_008176	-6.439210599	36959.54255	425.9229566
5	<i>Cxcl3</i>	NM_203320	-5.914330963	1560.050787	25.86709827
6	<i>Ccl7</i>	NM_013654	-5.874842921	8854.882808	150.8964
7	<i>Ccl2</i>	NM_011333	-5.864288363	14431.20815	247.7285098
8	<i>Cxcl10</i>	NM_021274	-5.318667421	18619.47224	466.5400552
9	<i>C3</i>	NM_009778	-5.132436586	9409.893795	268.2670655
10	<i>Nos2</i>	NM_010927	-4.333801396	21051.54871	1043.95033
11	<i>Il6</i>	NM_031168	-4.260912493	4862.010366	253.6024303
12	<i>Kng1</i>	NM_001102411	-4.254924608	314.688369	16.4824116
13	<i>Chma7</i>	NM_007390	-3.858318408	117.6699646	8.113272242
14	<i>Cxcl2</i>	NM_009140	-3.818572515	102.4637862	7.262155297
15	<i>Naip2</i>	NM_010872	-2.82579679	463.5787044	65.38436074
16	<i>Il23r</i>	NM_144548	-2.755162615	50.62060369	7.497918751
17	<i>Mecom</i>	NM_021442	-2.658123996	72.39715419	11.46955161
18	<i>Tlr2</i>	NM_011905	-2.48212631	16242.62149	2907.111249
19	<i>Cxcl9</i>	NM_008599	-2.394508841	74.82753198	14.23122992
20	<i>Fas</i>	NM_007987	-2.366331025	4951.975955	960.3773506
21	<i>Ccl5</i>	NM_013653	-2.105426518	6541.112616	1520.040259
22	<i>Slc7a2</i>	NM_007514	-2.0863221	728.7278472	171.6010074
23	<i>Ccl8</i>	NM_021443	-2.015056321	356.0455349	88.08726954
24	<i>Nfkbiz</i>	NM_030612	-1.976385427	1037.912367	263.7602772
25	<i>Tlr12</i>	NM_205823	-1.96876185	40.15478532	10.25843089
26	<i>Fabp4</i>	NM_024406	-1.967090285	3710.65838	949.0690109
27	<i>Fcgr2b</i>	NM_001077189	-1.928679407	23.79059038	6.249062466
28	<i>Vnn1</i>	NM_011704	-1.926579525	235.1798316	61.86454868
29	<i>Aoah</i>	NM_012054	-1.915931969	23.07905405	6.115965287
30	<i>Tnf</i>	NM_013693	-1.887675638	30.20992868	8.163994641
31	<i>Sbno2</i>	NM_183426	-1.832701946	2809.246768	788.663299
32	<i>S100a8</i>	NM_013650	-1.812346765	251.276503	71.54530518
33	<i>Lbp</i>	NM_008489	-1.704436748	534.9503143	164.1446984
34	<i>Itgb2</i>	NM_008404	-1.69091455	799.7231436	247.6986643
35	<i>Adora1</i>	NM_001008533	-1.592883708	36.37685795	12.05922528
36	<i>Cnr1</i>	ENSMUST00000133462	-1.57273558	35.05263113	11.78365552
37	<i>Bdkrb1</i>	NM_007539	-1.556586938	482.6531502	164.0800523
38	<i>Hyal3</i>	NM_178020	-1.513861619	23.01739319	8.060061949
39	<i>Fcgr2b</i>	NM_001077189	-1.478780887	20.67964928	7.419690078
40	<i>P2rx7</i>	NM_001038887	-1.423380634	1740.35394	648.8694314
41	<i>Tnfrsf1b</i>	NM_011610	-1.402546902	156.9038915	59.35058817
42	<i>Ifng</i>	NM_008337	-1.397568799	33.96474408	12.89193826
43	<i>Il33</i>	NM_001164724	-1.367480673	1021.742169	395.9940102
44	<i>Itga2</i>	NM_008396	-1.354025855	14.65239619	5.73200098
45	<i>Nlrc4</i>	NM_001033367	-1.349220569	17.28042847	6.782638088
46	<i>Ccl24</i>	NM_019577	-1.315913568	17.77367816	7.139172176
47	<i>Apoa1</i>	NM_009692	-1.239596329	25.33576965	10.72947382
48	<i>Zfp36</i>	NM_011756	-1.216888997	44.75411769	19.25364278
49	<i>Tpsb2</i>	NM_010781	-1.200098371	30.06086637	13.08385992
50	<i>Il1rl1</i>	NM_010743	-1.197391018	3511.033667	1531.032398

表9. (続き)

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio (log2)	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
51	<i>Adora3</i>	NM_009631	-1.074339033	18.76232259	8.910012729
52	<i>Il17c</i>	NM_145834	-1.070994871	16.91001693	8.049009889
53	<i>Adora2a</i>	NM_009630	-1.031724407	68.40220489	33.45723967
54	<i>Adora2b</i>	NM_007413	-1.026999789	39.25478224	19.26348373
55	<i>Plaa</i>	NM_172695	-1.017603444	25.7330873	12.71050287

表10. A-CEBP強制発現によって上昇した炎症関連遺伝子 ( $\log_2 > 1$ )

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio ( $\log_2$ )	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Reg3a</i>	NM_011259	3.661796095	13.33687355	168.7969116
2	<i>Itgb6</i>	NM_021359	1.874708699	10.16755488	37.28722617
3	<i>Il17b</i>	NM_019508	1.868912693	297.8776319	1088.019483
4	<i>Camk4</i>	NM_009793	1.840571582	10.49140025	37.57514898
5	<i>Il25</i>	NM_080729	1.72564432	10.38979808	34.36195064
6	<i>Lta</i>	NM_010735	1.599367517	10.4225479	31.58140858
7	<i>Il4</i>	NM_021283	1.496327824	12.25989278	34.58806212
8	<i>Nlrp3</i>	NM_145827	1.486189119	23.33174827	65.36342279
9	<i>Ptgis</i>	NM_008968	1.291910904	20767.80708	50850.42353
10	<i>Agtr1a</i>	NM_177322	1.043314016	74.46555185	153.470259
11	<i>Chrm7</i>	NM_007390	1.029250505	10.39349302	21.21274171
12	<i>Kit</i>	NM_001122733	1.011562259	10.71710405	21.60667949



表11. A-CEBP強制発現によって低下したアポトーシス関連遺伝子 ( $\log_2 < -1$ )

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio ( $\log_2$ )	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Mmp9</i>	NM_013599	-7.450879821	1375.881586	7.863986119
2	<i>Ccl3</i>	NM_011337	-7.055578392	2296.297341	17.26185206
3	<i>Lcn2</i>	NM_008491	-7.010805102	27817.14505	215.699891
4	<i>Il12b</i>	NM_008352	-6.72347437	630.6802583	5.968178122
5	<i>Ccl2</i>	NM_011333	-5.864288363	14431.20815	247.7285098
6	<i>Casp4</i>	NM_007609	-5.299212206	1679.360152	42.65029276
7	<i>Niacr1</i>	NM_030701	-5.296697587	628.3760044	15.98654965
8	<i>Nos2</i>	NM_010927	-4.333801396	21051.54871	1043.95033
9	<i>Il6</i>	NM_031168	-4.260912493	4862.010366	253.6024303
10	<i>Ntrk2</i>	NM_001025074	-3.414227699	64.89972414	6.087765307
11	<i>Tnfsf15</i>	NM_177371	-3.247484554	642.167926	67.6173816
12	<i>Pak7</i>	NM_172858	-3.08437382	113.2427817	13.35123657
13	<i>Bcl3</i>	NM_033601	-3.051559184	3268.884906	394.2655054
14	<i>Naip2</i>	NM_010872	-2.82579679	463.5787044	65.38436074
15	<i>Scn2a1</i>	NM_001099298	-2.73307915	522.5577583	78.59510444
16	<i>Ifit3</i>	NM_010501	-2.715652135	38993.33424	5936.050978
17	<i>Zc3h12a</i>	NM_153159	-2.710442928	792.8800651	121.1386908
18	<i>Mecom</i>	NM_021442	-2.658123996	72.39715419	11.46955161
19	<i>Wt1</i>	NM_144783	-2.59736179	127.0838658	20.99938659
20	<i>Serpina3g</i>	NM_009251	-2.517926876	354.8904322	61.96162151
21	<i>Fas</i>	NM_007987	-2.366331025	4951.975955	960.3773506
22	<i>Barhl1</i>	NM_019446	-2.294171334	181.8969369	37.08608582
23	<i>Lhx3</i>	NM_001039653	-2.268481233	199.5302321	41.41215321
24	<i>Muc1</i>	NM_013605	-2.235086839	31.10021084	6.605948017
25	<i>Nlrp1a</i>	NM_001004142	-2.221587468	111.532508	23.91316181
26	<i>Il19</i>	NM_001009940	-2.063126534	84.17959872	20.14391497
27	<i>Brca1</i>	NM_009764	-2.040178666	32.63735548	7.935238547
28	<i>Dmpk</i>	NM_001190491	-2.026711424	95.37385344	23.40606457
29	<i>Igfbp3</i>	NM_008343	-1.988924686	481.3253276	121.2586491
30	<i>Em1</i>	ENSMUST00000106800	-1.947702443	30.72454207	7.964684203
31	<i>Vnn1</i>	NM_011704	-1.926579525	235.1798316	61.86454868
32	<i>Casp1</i>	NM_009807	-1.920436415	181.1818792	47.86364779
33	<i>Csf2</i>	NM_009969	-1.905561867	28.29632173	7.552638605
34	<i>Tnf</i>	NM_013693	-1.887675638	30.20992868	8.163994641
35	<i>Fgf10</i>	NM_008002	-1.882207043	36.5637004	9.918576878
36	<i>Hsh2d</i>	NM_197944	-1.874103347	47.08712512	12.84519949
37	<i>Aars</i>	NM_146217	-1.8320887	44.13083834	12.39448609
38	<i>S100a8</i>	NM_013650	-1.812346765	251.276503	71.54530518
39	<i>Xaf1</i>	NM_001037713	-1.798597109	5776.579932	1660.500869
40	<i>Birc3</i>	BC011338	-1.747305094	103.3892694	30.79528457
41	<i>Plac8</i>	NM_139198	-1.737736007	528.5693513	158.4861496
42	<i>Tcf7</i>	NM_009331	-1.667400563	154.124999	48.5216435
43	<i>Ifih1</i>	NM_027835	-1.649304983	2325.131513	741.2372741
44	<i>Pax8</i>	NM_011040	-1.642420951	48.00375543	15.37649115
45	<i>Xdh</i>	NM_011723	-1.608084755	11492.82695	3770.03273
46	<i>Il1m</i>	NM_001039701	-1.606144928	54.44997504	17.88545052
47	<i>Tnfsf10</i>	NM_009425	-1.6012451	50.13335518	16.52357306
48	<i>Fgf8</i>	NM_010205	-1.599472284	48.2699399	15.92896739
49	<i>Adora1</i>	NM_001008533	-1.592883708	36.37685795	12.05922528
50	<i>Ank2</i>	AK046947	-1.580528276	24.72200044	8.266034045

表11. (続き)

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio (log2)	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
51	<i>Cnr1</i>	ENSMUST00000133462	-1.57273558	35.05263113	11.78365552
52	<i>Gcg</i>	NM_008100	-1.528293089	22.26882066	7.720317405
53	<i>Epo</i>	NM_007942	-1.522911947	42.46318049	14.77645797
54	<i>Egr3</i>	NM_018781	-1.521730872	36.68908038	12.77762647
55	<i>Sycp3</i>	Y08485	-1.496002011	16.37260155	5.804652344
56	<i>Syce3</i>	NM_001162880	-1.487171988	21.01177231	7.495132401
57	<i>Sema3a</i>	NM_009152	-1.479651378	3419.974474	1226.318886
58	<i>Lrp1</i>	ENSMUST00000118455	-1.46657596	24.88005212	9.002599516
59	<i>Hic1</i>	NM_010430	-1.463446625	28.54661052	10.35173674
60	<i>Ahr</i>	NM_013464	-1.456042951	11359.25611	4140.352221
61	<i>Dram1</i>	NM_027878	-1.4241287	673.3950047	250.9368453
62	<i>Rffl</i>	NM_026097	-1.424029667	158.2632078	58.97993911
63	<i>P2rx7</i>	NM_001038887	-1.423380634	1740.35394	648.8694314
64	<i>Sarm1</i>	NM_172795	-1.41903807	39.66768559	14.83419003
65	<i>Ripk2</i>	NM_138952	-1.413484909	854.7992002	320.894853
66	<i>Ifng</i>	NM_008337	-1.397568799	33.96474408	12.89193826
67	<i>Osm</i>	NM_001013365	-1.393683433	38.44363132	14.6313327
68	<i>Fam3b</i>	NM_020622	-1.386003987	49.3399722	18.87861484
69	<i>Gas1</i>	NM_008086	-1.369957065	427.7348105	165.4917798
70	<i>Ifi204</i>	NM_008329	-1.353121066	29368.61068	11496.1752
71	<i>Nlrc4</i>	NM_001033367	-1.349220569	17.28042847	6.782638088
72	<i>Tia1</i>	ENSMUST00000152852	-1.345222878	32.94065054	12.96521534
73	<i>Wnk3</i>	NM_001271678	-1.334069802	27.67221165	10.97611994
74	<i>Sp110</i>	NM_175397	-1.327660189	31.61225761	12.59476218
75	<i>Lhx4</i>	NM_010712	-1.326405119	14.39753212	5.741168969
76	<i>Ccl19</i>	NM_011888	-1.322590249	31.4091599	12.55789894
77	<i>Grin1</i>	NM_008169	-1.321225775	44.66638146	17.87525234
78	<i>Dlx1</i>	ENSMUST00000126400	-1.309900965	30.54906962	12.32192345
79	<i>Rassf6</i>	NM_028478	-1.295911414	16.09297642	6.554327948
80	<i>Nr4a3</i>	NM_015743	-1.294013638	14.91135197	6.081071384
81	<i>Chl1</i>	NM_007697	-1.283549844	23.43159844	9.625314134
82	<i>Gdnf</i>	NM_010275	-1.262643819	4075.377477	1698.533738
83	<i>Ret</i>	NM_001080780	-1.251284011	53.75666542	22.5817867
84	<i>Plk2</i>	NM_152804	-1.251032211	2263.314422	950.925886
85	<i>Nckap1l</i>	NM_153505	-1.240973094	21.05270183	8.907128431
86	<i>Irf1</i>	NM_001159393	-1.219133928	47.18036656	20.26587827
87	<i>Inhbb</i>	NM_008381	-1.201659	555.4249936	241.4849198
88	<i>Prkcg</i>	NM_011102	-1.194895685	52.55139583	22.95539726
89	<i>Kdr</i>	NM_010612	-1.193942848	92.05078806	40.23600936
90	<i>Akr1c18</i>	NM_134066	-1.150463717	247.3769774	111.4384829
91	<i>Ntrk1</i>	NM_001033124	-1.146237485	17.46946556	7.892739221
92	<i>Mt1</i>	AK154954	-1.143340629	1423.997641	644.6581021
93	<i>Angpt1</i>	NM_009640	-1.129360913	314.432947	143.733015
94	<i>Sox7</i>	NM_011446	-1.115547307	12.90100702	5.954021667
95	<i>Wnt7a</i>	NM_009527	-1.11535404	18.45937471	8.520438847
96	<i>Stat1</i>	NM_009283	-1.090371983	127.9149793	60.07402507
97	<i>Eif2ak2</i>	NM_011163	-1.085458946	2350.485249	1107.648154
98	<i>Krt8</i>	NM_031170	-1.078095233	86.65879187	41.0462633
99	<i>Irak3</i>	NM_028679	-1.054341047	286.1062722	137.7650638
100	<i>5330417C22Rik</i>	NM_001033304	-1.050883463	15.76189492	7.607833222

表11. (続き)

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio (log2)	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
101	<i>Ntn1</i>	NM_008744	-1.045634883	2026.130272	981.5216896
102	<i>Wnt4</i>	NM_009523	-1.042365623	1772.090747	860.4044322
103	<i>Adora2a</i>	NM_009630	-1.031724407	68.40220489	33.45723967
104	<i>Tfap2a</i>	NM_011547	-1.027140554	14.47229886	7.101292569
105	<i>Nek6</i>	NM_021606	-1.022027717	5493.422296	2705.091668
106	<i>Pglyrp1</i>	NM_009402	-1.019605954	299.8921181	147.9221041
107	<i>Adcy10</i>	NM_173029	-1.009000973	25.67129004	12.75581274
108	<i>Adar</i>	NM_001038587	-1.005795434	2286.380519	1138.607174

表12. A-CEBP強制発現によって上昇したアポトーシス関連遺伝子 (log2>1)

	Gene Symbol	Accession No.	Ratio (log2)	Signal Intensity	
				GFP	A-CEBP
1	<i>Dcc</i>	NM_007831	2.967114976	9.007734293	70.43786364
2	<i>Cdh1</i>	NM_009864	2.82105421	13.1344454	92.8183141
3	<i>Hras1</i>	NM_001130444	2.535546778	11.2939313	65.48182537
4	<i>Slc5a8</i>	NM_145423	2.529489199	10.93218552	63.11885552
5	<i>Sox8</i>	NM_011447	2.4962156	24.77908602	139.8044691
6	<i>Scg2</i>	NM_009129	2.379049093	15.64094143	81.36320126
7	<i>Pak7</i>	NM_172858	2.202319738	25.4629971	117.185485
8	<i>Cd38</i>	NM_007646	2.105977126	16.684514	71.82503489
9	<i>Egln3</i>	NM_028133	1.950038698	1706.942011	6595.36611
10	<i>Rag1</i>	NM_009019	1.933876186	8.837886084	33.76782895
11	<i>Wdr92</i>	NM_178909	1.922106919	11.31819392	42.89325141
12	<i>Lsp1</i>	NM_019391	1.899021665	9344.790936	34852.35051
13	<i>Camk2b</i>	NM_001174053	1.730111841	1264.919314	4196.414548
14	<i>Bnip3</i>	NM_009760	1.699904505	358.6096745	1165.04915
15	<i>Lta</i>	NM_010735	1.599367517	10.4225479	31.58140858
16	<i>C5ar1</i>	NM_001173550	1.569755519	8.180501701	24.28417961
17	<i>Edn1</i>	NM_010104	1.560300917	32.28262884	95.20642793
18	<i>Hoxa13</i>	NM_008264	1.512560273	18.09652664	51.63227237
19	<i>Cntfr</i>	NM_001136056	1.506072075	11.97337126	34.00864424
20	<i>Ihh</i>	NM_010544	1.504266097	647.6353213	1837.213987
21	<i>Il4</i>	NM_021283	1.496327824	12.25989278	34.58806212
22	<i>Nlrp3</i>	NM_145827	1.486189119	23.33174827	65.36342279
23	<i>Ar</i>	NM_013476	1.473009085	21.13640834	58.67473124
24	<i>Cx3cr1</i>	NM_009987	1.425057492	11.09758616	29.79981557
25	<i>Flt4</i>	NM_008029	1.42133369	10.57151474	28.31400432
26	<i>Nckap1l</i>	NM_153505	1.398222199	11.11802364	29.30450674
27	<i>Dbh</i>	NM_138942	1.358235762	18.87522905	48.3907035
28	<i>Adm</i>	NM_009627	1.32592483	2481.694056	6221.44672
29	<i>Ptgis</i>	NM_008968	1.291910904	20767.80708	50850.42353
30	<i>Peg3</i>	NM_008817	1.277941014	34.78603749	84.35358381
31	<i>Arb1</i>	NM_177231	1.271336959	926.869749	2237.325987
32	<i>Megf10</i>	NM_001001979	1.20646874	458.4448456	1057.962743
33	<i>Dapl1</i>	NM_029723	1.192876781	57.21212868	130.7915838
34	<i>Jag2</i>	NM_010588	1.186490103	32.92535001	74.93755359
35	<i>Frzb</i>	NM_011356	1.185485497	5409.919132	12304.31575
36	<i>Higd1a</i>	NM_019814	1.1824807	30500.61383	69226.23935
37	<i>Fgf2</i>	AY027558	1.174307295	10.96154169	24.73849983
38	<i>Mul1</i>	ENSMUST00000105815	1.157368728	35.56397115	79.3255245
39	<i>Gpld1</i>	NM_008156	1.107305444	37.54046647	80.87826346
40	<i>Fgfr3</i>	NM_001163215	1.106863563	7835.567892	16876.00368
41	<i>Ikzf3</i>	NM_011771	1.072358308	43.23560893	90.91877944
42	<i>Fndc1</i>	NM_001081416	1.065593116	3614.800725	7565.887019
43	<i>Ripk3</i>	NM_019955	1.056412662	8.733712334	18.16397027
44	<i>Fam162a</i>	NM_027342	1.051230977	45630.52522	94560.01321
45	<i>Agtr1a</i>	NM_177322	1.043314016	74.46555185	153.470259
46	<i>Krt20</i>	NM_023256	1.014558597	10.60870096	21.43259601
47	<i>Wnt7b</i>	NM_001163634	1.000131573	22.2768057	44.55767483