

氏 名 (本 籍)	山 下 晃 弘 (京 都 府)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 3 3 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 1 9 年 3 月 2 6 日
学 位 論 文 題 目	Transient suppression of PPAR directed ES cells into an osteoblastic lineage (PPAR の一過性抑制による ES 細胞の骨芽細胞への分化)
審 査 委 員	主 査 教 授 工 藤 基 副 査 教 授 西 克 治 副 査 教 授 木 村 博

論文内容要旨

*整理番号	538	(ふりがな) 氏名	やました あきひろ 山下 晃弘
学位論文題目	Transient suppression of PPAR γ directed ES cells into an osteoblastic lineage. (PPAR γ の一過性抑制による ES 細胞の骨芽細胞への分化)		
<p>[目的]</p> <p>高齢化社会の到来に伴い骨粗鬆症の予防および治療は重要な課題の一つとなっている。高齢者や骨粗鬆症の患者の骨髄は黄色骨髄と呼ばれる脂肪組織に富んだ状態になっており、それと並行して骨の量が減少していることが知られている。すなわち骨髄の脂肪の量と骨の量とは反比例の関係にある。これは骨髄中において脂肪細胞と骨芽細胞とが共通の前駆細胞（間葉系幹細胞）から分化するためと考えられている。したがって共通前駆細胞の分化を人為的にコントロールし、脂肪細胞への分化を抑制することにより骨芽細胞への分化を促進することができれば、老化や骨粗鬆症による骨量の低下を予防および治療できる可能性が考えられる。これまでわれわれは増殖因子やホルモン等を用い、マウスおよびサルES細胞から骨芽細胞および脂肪細胞への分化系を確立してきた。本研究では、脂肪細胞への分化において鍵となる転写因子peroxisome proliferator-activated receptor γ(PPARγ)に注目し、その抑制により分化方向を脂肪細胞から骨芽細胞へ変えることを試みた。またその抑制手段として、近年容易なgene silencingの手法として用いられているsmall interfering RNA (siRNA)を利用した。すなわちマウスES細胞の脂肪細胞への分化系をモデルとして使用し、PPARγの発現をsiRNAを用いて一過性に抑制することにより、脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進させることを目的とした。</p> <p>[方法]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) マウス ES 細胞を retinoic acid 存在下で間葉系前駆細胞および脂肪前駆細胞へ分化させた。 2) この ES 由来初期分化細胞を骨髄中に存在する共通前駆細胞のモデルとして使用し、PPARγ をターゲットとする siRNA を導入した。Negative-control にはマウスゲノムに相同性を持たない siRNA を導入したものを、positive-control にはわれわれが確立した脂肪細胞および骨芽細胞への分化系を使用した。 3) 導入後、脂肪細胞へ分化する条件で培養し、脂肪細胞および骨芽細胞への分化に与える影響を経時的に調べた。脂肪細胞への分化は PPARγおよび分化マーカーとしてadipocyte fatty acid-binding protein (aP2)の発現を定量 PCR にて、蓄積脂肪を Oil Red O 染色にて調べた。骨芽細胞への分化は、初期分化マーカーとして collagen type 1、osteopontin、さらに後期分化マーカーとして Core binding factor α-1 (Cbfa1)、osteocalcin の発現を定量 PCR にて調べた。また、カルシウムの蓄積を Alizarin Red S 染色にて調べた。 			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

[結果]

- 1) Retinoic acid (10^{-7} M)を分化初期に添加することにより、分化 5 日目で PPAR γ の発現がみられることを RT-PCR にて確認した。
- 2) 脂肪細胞への分化：PPAR γ -siRNA の導入により PPAR γ の発現は negative-control と比較して、分化 10、15、20 日目において有意に抑制された。aP2 も 15 日目に抑制が確認できた。さらに蓄積脂肪を Oil Red O 染色にて調べた結果、PPAR γ -siRNA を導入した細胞において有意な減少が認められた。すなわち脂肪細胞への分化が抑制されていることが明らかとなった。
- 3) 骨芽細胞への分化：PPAR γ -siRNA の導入により Cbfa1 の発現は negative-control と比較して、15 日目に有意に高くなることがわかった。また osteocalcin は 20 日目において発現の上昇がみられた。Osteopontin においては negative-control および positive-control とほぼ同様の発現パターンを示した。一方で collagen type 1 は positive-control では処理直後 (10 日目) に急激な増加が認められたが、PPAR γ -siRNA 導入細胞では、20 日目に急激に増加し positive-control と同じレベルに達した。また Alizarin Red S 染色によりカルシウムを検出した結果、PPAR γ -siRNA 導入細胞において顕著なカルシウム沈着が認められた。このカルシウム蓄積量は negative-control の約 4 倍であり、従来法により分化させた positive-control とほぼ同等であった。以上の結果から、PPAR γ -siRNA の導入により骨芽細胞への分化が促進されることが明らかとなった。

[考察]

ES 細胞の脂肪細胞への分化過程で発現する PPAR γ を siRNA にて一過性に抑制すると、脂肪細胞への分化が抑制されるだけでなく、骨芽細胞への分化が促進されることが明らかとなった。また、siRNA による PPAR γ の抑制は、導入後少なくとも 10 日間継続することが明らかとなった。脂肪細胞への分化において、PPAR γ -siRNA の導入により aP2 も PPAR γ と同様に抑制されると思われたが、PPAR γ の様な顕著な抑制はみられなかった。また骨芽細胞への分化において、PPAR γ -siRNA の導入により、従来法で分化させた positive-control とほぼ同等量のカルシウム蓄積が認められた。しかし collagen type 1 の発現パターンは positive-control とは異なったことから、PPAR γ -siRNA の導入による骨芽細胞への分化は、増殖因子やホルモン等を用いた従来法とは作用機序が異なる可能性が考えられる。本研究から、PPAR γ は脂肪細胞への分化だけでなく、骨芽細胞への分化を抑制している可能性が示唆されたが、そのメカニズムの解明には今後より詳細な検討が必要である。

[結論]

ES 細胞において PPAR γ の発現を siRNA を用いて一過性に抑制した結果、脂肪細胞への分化を抑制し、さらに骨芽細胞への分化を促進できることを明らかにした。化学合成した siRNA は染色体に組込まれないためゲノムに変化を与えない利点があり、再生医療における細胞分化方法および生体における分化コントロール薬として適している。本研究の結果、PPAR γ -siRNA は骨粗鬆症の予防および治療への利用が期待できることが示唆された。今後ヒトへの応用に関し、霊長類 ES 細胞 (サル ES 細胞) 等を用いた研究が重要であると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	538	氏名	山下 晃弘
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>本研究は、骨粗鬆症で認められる脂肪細胞と骨芽細胞の分化に関する相関関係を明らかにするために、マウス ES 細胞の脂肪細胞への分化系をモデルとして使用し、peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPARγ) の発現を siRNA を用いて一過性に抑制することにより、脂肪細胞へ傾いた分化方向を、骨芽細胞への分化に変えることを目的としたものである。</p> <p>その結果、以下のことを明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) PPARγ-siRNA の導入により、その発現は抑制され、導入後少なくとも 10 日間低いレベルを維持した。また脂肪細胞分化マーカー aP2 や蓄積脂肪も抑制された。2) PPARγ-siRNA の導入により、骨芽細胞分化マーカーの増加およびカルシウムの蓄積が認められた。3) PPARγ-siRNA 導入細胞を免疫不全マウスに移植すると、骨を形成した。 <p>このように本論文は、ES 細胞において PPARγ の発現を siRNA を用いて一過性に抑制した結果、脂肪細胞への分化を抑制し、さらに骨芽細胞への分化を促進することを明らかにした。すなわち PPARγ-siRNA の使用は骨粗鬆症の予防および治療への利用が期待できることを示唆したものである。</p> <p>よって博士 (医学) の学位論文に値する。</p>			
(平成 19 年 2 月 1 日)			