

| | |
|---------|--|
| ふりがな氏名 | たなべ じゅんいち 田邊 順一 |
| 学位の種類 | 博士（歯学） |
| 学位記番号 | 乙 第 1582 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 25 年 12 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項に該当 |
| 学位論文題目 | Acceleratory Effect of Novel Synthesized Collagen-like Peptide from Adiponectin on Osteoblastic Differentiation (アディポネクチンコラーゲン様ペプチドの骨芽細胞分化促進作用) |
| 学位論文掲載誌 | Journal of Oral Tissue Engineering 第 11 巻 第 1 号 平成 25 年 9 月 30 日 |
| 論文調査委員 | 主査 池尾 隆 教授 副査 神原 正樹 教授 副査 福島 久典 教授 |

論文内容要旨

アディポネクチンは脂肪細胞から豊富に分泌される因子（アディポカイン）の 1 つで、エネルギーの恒常性維持、抗動脈硬化作用やインスリン抵抗性改善作用などの生理活性を有している。その構造は約 30 kDa のポリペプチドで、N 末端シグナル配列、コラーゲン様ドメインおよび C 末端球状ドメインからなり、血中では完全長のアディポネクチンと C 末端球状ドメインが切断されて遊離した球状アディポネクチン（gAN）の存在が知られている。最近、アディポネクチンの骨代謝への関与が指摘されるようになり、骨代謝調節因子としての役割が注目されている。私たちはこれまでに、アディポネクチンの分子構造の差異が骨芽細胞の分化に影響を及ぼすかどうかを検討し、完全長のアディポネクチンは骨芽細胞の分化に促進的に作用するのに対し、gAN は抑制的に作用することを明らかにしてきた。このことから、アディポネクチンの骨芽細胞分化促進作用がコラーゲン様ドメインにある可能性が考えられた。そこで、このコラーゲン様ドメインの一次構造から約 6kDa のペプチド（cAN）を新規合成し、骨芽細胞の分化に及ぼす影響をマイクロアレイ法を用いて網羅的に検索した。

実験には、分化培地（VC+ β -グリセロリン酸）の添加で分化誘導できるマウス前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。また、cAN の対照として、これまでの研究で使用した recombinant gAN を同時に検討した。cAN または gAN 存在下分化誘導 3 日後の細胞から RNA を抽出し、cDNA に逆転写後マイクロアレイ解析を行った。約 4 万種類の遺伝子について試料相互の発現比を求め、いずれかの比較組み合わせのなかで 1.5 倍以上の変動のあった遺伝子のデータを抽出し、Cluster3.0 ソフトウェアを用いた階層的クラスタリングで、発現パターンの類似性による分類を行った。解析結果は Java Treeview にて表示し、heatmap を作成した。

その結果、gAN と cAN では heatmap 上で異なるパターンを示し、骨芽細胞の遺伝子発現に異なる

影響を及ぼすことが明らかになった。Heatmap 上の特徴的なパターンを示す部分を 5 つの cluster に分け、各 cluster に含まれる遺伝子の GO (gene ontology) term を抽出し、その機能を考察した。分化培地添加で up-regulate する遺伝子は骨芽細胞分化や細胞の成長に関連するものが多く、私たちが以前から骨代謝に関連が深いことを指摘してきたアディポネクチン受容体 AdipoR2 もこの cluster に含まれていた。さらに gAN と cAN の両方で up-regulate する cluster には脂質代謝、糖代謝および細胞接着に関与する遺伝子が含まれており、cAN で著明に上昇する cluster には Wnt のような骨代謝関連シグナル伝達系の遺伝子群やその下流に位置する Jun 関連の遺伝子群が含まれていた。これに対し、gAN のみで up-regulate する遺伝子群は形態形成や神経系に関連するものが多く、以前の研究成果と同様に gAN が神経系への分化誘導に関与する可能性が示唆された。Real time RT-PCR によるオステオカルシンの定量的解析でも、分化培地による発現上昇が gAN で抑制されたのに対し cAN では促進された。

以上の結果から新規合成ペプチド cAN は骨代謝関連シグナル伝達系の発現を介した骨芽細胞分化促進作用をもつことが示唆された。

論文審査結果要旨

本論文は、アディポネクチンが分子内の機能ドメインによって骨芽細胞の分化に促進的にも抑制的にも作用するというこれまでの研究成果から、新規合成ペプチドをデザインし、その効果をマイクロアレイ法を用いて網羅的に調べたものである。

脂肪組織が単なるエネルギー貯蔵器官ではなく、アディポサイトカインと呼ばれる様々な因子を分泌する内分泌臓器として機能していることが明らかになり、これらの因子が糖・脂質代謝のみならず、骨代謝にも影響を及ぼす可能性が指摘されている。アディポサイトカインのなかでもアディポネクチンは、正常な脂肪細胞から分泌され、血液中に多く存在して、抗動脈硬化作用やインスリン抵抗性改善作用などの生理活性を有していることから、メタボリックシンドロームの予防や改善への効果が期待されている。近年の *in vitro* 研究では、アディポネクチンは骨形成を促進すると報告しているが、臨床的には血中アディポネクチン量と骨量に相関性は得られていない。本論文では、アディポネクチン分子内の C 末端球状ドメイン (gAN) が骨芽細胞の分化を抑制するこれまでの知見から、中間部分のコラーゲン様ドメインに促進作用があるのではないかと仮説をたて、ドメインの一次構造から約 6 kDa のペプチド (cAN) を新規合成し、骨芽細胞の分化に及ぼす影響をマイクロアレイ法を用いて網羅的に検索した。

その結果、gAN と cAN では、遺伝子発現情報をクラスター解析して作成した heatmap 上で異なるパターンを示し、骨芽細胞の遺伝子発現に異なる影響を及ぼすことを明らかにした。gAN のみで up-regulate する遺伝子群は細胞形態や神経系に関連していたのに対し、cAN で著明に上昇する cluster には骨代謝関連シグナル伝達系の遺伝子群が含まれていた。また、real time RT-PCR によるオステオカルシンの定量的解析でも、分化培地による発現上昇が gAN で抑制されたのに対し cAN 添加では促進された。

以上の結果から、新規合成ペプチド cAN が骨代謝関連シグナル伝達系の発現を介した骨芽細胞分化促進作用をもつことを明らかにし、硬組織再生への応用の可能性を提示した点において、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。

なお、外国語 1 か国語 (英語) について試問を行った結果、合格と認定した。