



Title	骨発生におけるヘッジホッグシグナル関連転写因子 Gli の作動様式の理解
Author(s)	辻, 麻美
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105336
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (辻 麻美)	
論文題名	骨発生におけるヘッジホッグシグナル関連転写因子Gliの作動様式の理解
論文内容の要旨	
ヘッジホッグ (Hedgehog: Hh) シグナルは、胎生期において細胞の運命決定や細胞の増殖を制御する重要なシグナルである。その中でも、インディアンヘッジホッグ (Indian hedgehog: Ihh) は軟骨内骨化において①軟骨細胞の分化、②軟骨細胞の増殖、③骨芽細胞の運命決定に関与していることがわかっている。特に、③骨芽細胞の運命決定においては、遺伝子改変マウスの解析からIhhの入力がRunx2陽性骨芽細胞前駆細胞の発生に必須であることが明らかとなっている。しかしながら、これらの作用を担っているHh関連転写因子Gliファミリーのゲノムワイドな作動様式や標的遺伝子については未だ不明な点が多い。そこで、本研究では骨発生過程におけるHh応答性骨格系前駆細胞を対象として、次世代シーケンサーを用いてゲノムワイドデータを取得し、統合的に解析することにより、骨発生におけるHh関連転写因子Gliの作動様式を理解することを目的とした。 まず、Hhシグナル活性化剤であるSmoothened agonist (SAG) で処理した未分化間葉系細胞株C3H10T1/2においてRNAシーケンス (RNA-sequencing: RNA-seq)、Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing (ATAC-seq)、およびGli1に対するクロマチン免疫沈降シーケンス (Chromatin immunoprecipitation-sequencing: ChIP-seq) を行うことにより、Hh誘導性骨分化系における発現変動遺伝子 (Differentially expressed gene: DEG)、オープンクロマチン領域、Gli1結合領域を同定した。ChIP-seqデータにおいてde novo motif解析を行うと、Gli1結合領域にはGliのモチーフのほかRunxのモチーフの濃縮が認められ、GliとRunxとの間に相互作用がみられる可能性が示唆された。RNA-seqのデータにおいて同定されたDEGに対するGene Ontology (GO) 解析にて骨や細胞周期に関するGO termが認められた。ATAC-seqではSAG処理群のピークの多くがControl群に重複して認められた。 続いてマウス胎仔を用いたin vivoでの解析を行った。タモキシフェン依存性にGli1発現細胞とその子孫細胞でZsGreenを発現するGli1CreER^{T2};R26R-ZsGreenマウスを用いて、前肢におけるGli1陽性細胞系譜の局在を解析したところ、胎生12日齢から13日齢にかけて軟骨原基の周辺にZsGreen発現細胞の存在が認められた。これらのZsGreen発現細胞は、軟骨内骨化過程においてIhhの入力を受けたHh応答性前駆細胞であると考えられた。この結果を踏まえて、胎生13日齢マウス胎仔の前肢を用いたChIP-seqを行い、Gli2およびGli3の結合領域を同定した。Gli2、Gli3いずれのデータにおいてもde novo motif解析を行うとGliのモチーフの濃縮が認められ、GO解析では骨に関するGO termが認められた。また、これらGli2およびGli3の結合領域とC3H10T1/2におけるGli1結合領域と比較することにより、Gliの結合領域を機能的に分類することを試みた。Gli1およびGli2で共通して認められるピークを活性型Gli (Gli-Activator: GliA) の結合領域、Gli3のピークからGli1のピークを除いた領域を抑制型Gli (Gli-Repressor: GliR) の結合領域として抽出した。これらの結合領域に対してGO解析を行うと、GliAの結合領域では骨芽細胞分化に関連するtermが、GliRの結合領域では軟骨細胞分化および肢芽の発生に関連するtermが認められた。これらの結果は、GliAとして主に機能するGli1およびGli2が骨芽細胞分化に、GliRとして主に機能するGli3が軟骨細胞分化に寄与するという遺伝子改変マウスの解析から得られる既知の知見と一致していた。また、骨芽細胞分化において、GliRによる転写抑制の解除がRunx2の発現に、GliAによる転写活性化がSp7、Ibspなどの中後期の骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現に必要であるという先行研究に基づき、GliのChIP-seqのデータセットで共通して認めたRunx2およびSp7近傍のピーク領域をエンハンサー候補領域として着目した。これらのエンハンサー候補領域について、C3H10T1/2細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、in vitroでエンハンサー活性を検証すると、GliAによるエンハンサー活性の上昇と、GliRによるエンハンサー活性の低下見られた。さらに、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) にてGLIと候補エンハンサー領域との結合の検証を行い、エンハンサー配列内のGliモチーフとGLIが直接結合することが示された。 以上のように、本研究では、Hh応答性骨格系前駆細胞におけるゲノムワイドデータを統合することで、骨発生に	

おけるGliの結合領域とその標的遺伝子の機能的意義に関して洞察を得ると共に、Runx2およびSp7の新規エンハンサー候補を同定した。一連の結果から、骨発生における遺伝子発現制御において、GliAとGliRは機能的に異なる遺伝子セットの発現制御に関与すると考えられた。また、新規エンハンサー候補について*in vivo*でエンハンサー活性の検証を行い、GliAおよびGliRがこれらのエンハンサー配列に直接結合し、エンハンサー活性を制御することが示された。すなわち、軟骨内骨化の骨芽細胞分化過程において、マスター転写因子であるRunx2およびSp7のエンハンサーにGliが直接的に作用し、これらの発現を制御する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (辻 麻 美)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	大 庭 伸 介
	副 査	教授	阪 井 丘 芳
	副 査	教授	波 多 賢 二
	副 査	准教授	黒 坂 寛
論文審査の結果の要旨 本研究は、骨発生に重要なヘッジホッグ（Hedgehog: Hh）シグナルの下流で働く転写因子 Gli に着目し、次世代シーケンサー（NGS）によるゲノムワイドデータの取得と解析から、骨発生において Gli の標的となるゲノム領域や標的遺伝子を同定し、ゲノムワイドな観点で Gli の作動様式を理解することを目指したものである。 未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 を用いた古典的な Hh 誘導性骨芽細胞分化系において RNA-seq、ATAC-seq、Gli1 ChIP-seq を行うとともに、マウス胎仔から取得した細胞を用いて Gli2、Gli3 ChIP-seq を行った。その結果、活性型 Gli と抑制型 Gli の結合領域とその生物学的意義に関する知見を得た。さらに Gli 結合領域の中から、骨芽細胞分化のマスター転写因子である Runx2、Sp7 の新規エンハンサー候補領域を同定した。 以上の知見は、骨発生においてヘッジホッグシグナルの作用を担う Gli の作用機序の理解、さらには骨発生機構の全体像の理解と骨関連疾患の新しい治療標的の同定に貢献すると考えられ、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。			