



Title	骨芽細胞分化を制御するエピジェネティック機構の解明
Author(s)	若森, 幹太
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105338
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 (若森 幹太)

論文題名 骨芽細胞分化を制御するエピジェネティック機構の解明

論文内容の要旨

【緒言】

骨格形成の基盤となる骨形成は、間葉系幹細胞から分化した骨芽細胞による骨基質の産生および石灰化を通じて遂行される。骨形成過程における遺伝子発現は、ゲノム上の転写制御領域であるエンハンサーに、骨芽細胞分化に重要な転写因子が特定の塩基配列を認識し結合することで制御されている。一方、近年のゲノム解析技術の進歩により、細胞分化の前段階としてエンハンサー領域のクロマチン構造の弛緩と活性化を伴うエピジェネティック制御が不可欠であることが明らかになりつつある。したがって、骨芽細胞に特異的なエンハンサー領域の同定と、それらの活性化に関与する転写因子およびエピジェネティック機構の解明は、骨形成の分子メカニズムを理解する上で重要な課題である。そこで本研究では、ゲノムワイド解析を用いて骨芽細胞特異的エンハンサーとその制御因子を同定し、骨形成における機能的役割の解明を行った。

【方法】

初代培養骨芽細胞(OB)、初代培養軟骨細胞(Cho)、および骨・軟骨前駆細胞を豊富に含む肢芽間葉系細胞(LB)からゲノムDNAを精製し解析を行った。エンハンサー領域はオープンクロマチン領域を同定するATAC-seqならびに活性化エンハンサーの指標であるH3K27acのChIP-seqのデータを統合することで検出した。骨芽細胞分化は、骨芽細胞分化マーカー遺伝子である*Alp*ならびに*Sp7*の発現をRT-qPCRで解析することにより評価した。

【結果】

1. 骨芽細胞特異的エンハンサーの同定とその制御因子の同定

ゲノムワイド解析の結果、OBでは30,722領域、Choでは42,931領域、LBでは22,990領域のエンハンサーを検出した。そして、OBに特異的で他の細胞と重複しない5,527領域を骨芽細胞特異的エンハンサーとして同定した。転写因子結合配列のモチーフ解析を行った結果、骨芽細胞特異的エンハンサーに結合する複数の転写因子を見出した。RNA-seq解析によるOB、ChoおよびLBの遺伝子発現プロファイリングを参照し転写因子を絞り込んだ結果、骨芽細胞特異的エンハンサーの制御因子として転写因子*Zic1*を同定した。興味深いことに、ヒト*ZIC1*遺伝子の機能獲得型変異は頭蓋縫合早期癒合症を示すことが報告されている。

2. *Zic1*の発現および機能解析

生後7日齢マウス頭蓋骨を用いて免疫組織学的検討を行った結果、*Zic1*は骨芽細胞前駆細胞を含む間葉系細胞が集積する頭蓋縫合部に強く発現していた。また、公共データより入手したマウス頭蓋骨のscRNA-seq解析において、*Zic1*は骨芽細胞前駆細胞で高発現しているが、骨芽細胞分化に伴ってその発現が低下することが明らかとなった。

骨芽細胞分化における*Zic1*の役割を検討するために、初代培養骨芽細胞にアデノウィルスを用いて*Zic1*を過剰発現させたが、*Alpl*および*Sp7*の発現に変化は見られなかった。一方、線維芽細胞ならびに骨芽細胞前駆細胞を多く含むCalvarial Fibroblastにおいて、*Zic1*は単独で*Alpl*および*Sp7*の発現を促進し、その作用はBMP2により増強された。同様の結果は、未分化間葉系細胞株C3H10T1/2細胞および骨芽細胞分化能を有しないマウス線維芽細胞株

NIH3T3細胞においても認められた。

3. **Zic1**によるエピジェネティック機構の解明

Zic1による骨芽細胞分化誘導の詳細な分子メカニズムを明らかにするために、NIH3T3細胞に**Zic1**を過剰発現させエピゲノム解析を行った。その結果、**Zic1**により約4万か所のゲノム領域のクロマチン構造が緩みオープンな状態になること、その中には**Alp**遺伝子の35kb上流に存在する骨芽細胞特異的エンハンサーも含まれていることを見出した。さらに詳細な生化学的解析の結果、**Zic1**はこのエンハンサー領域に直接結合しエンハンサー活性を増強することが明らかとなった。

4. **Zic1**遺伝子欠損マウスの作製と解析

最後にゲノム編集法により**Zic1**遺伝子欠損マウス(KOマウス)を作製し骨形成の解析を行った。**Zic1** KOマウスは生後すぐに死亡し長管骨や脊椎の骨形成に異常は認められなかった。一方、**Zic1** KOマウスは野生型マウスに比較して、頭蓋縫合部の幅が増大する一方で石灰化領域が減少していることが明らかとなった。

【結論】

本研究により、頭蓋縫合部の間葉系細胞に発現する**Zic1**は、骨芽細胞特異的なエンハンサーをエピジェネティックに活性化することにより骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。本研究は**Zic1**による骨芽細胞分化のエピジェネティックな制御機構を明らかにするとともに、頭蓋縫合早期癒合症の病態解明に貢献すると期待できる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (若 森 幹 太)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	波多 賢二
	副 査	教授	野田 健司
	副 査	教授	大庭 伸介
	副 査	講師	岩山 智明
論文審査の結果の要旨 本研究は、骨芽細胞分化を制御するエピジェネティック機構を明らかにすることを目的に、骨芽細胞特異的エンハンサーをゲノムワイドに探索し、その制御を担う転写因子の同定と機能的役割の解明を行ったものである。 初代培養骨芽細胞を含む様々な骨格系細胞を用いたエピゲノム解析と遺伝子発現プロファイルを統合した結果、骨芽細胞特異的エンハンサーとその制御因子として転写因子 Zic1 を同定した。さらに、Zic1 は骨芽細胞特異的遺伝子のクロマチン構造を動的に制御することで骨芽細胞分化ならびに頭蓋縫合部の骨形成を促進することを見出した。 以上の知見は、骨芽細胞分化のエピジェネティック制御機構の解明と骨形成の分子基盤の理解に指針を提示するものであり、将来的な骨再生医療の発展に貢献することが期待される。 よって、本研究は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。			