



Title	インディアンヘッジホッグにより誘導される骨芽細胞分化過程におけるシグナル伝達因子Gli2およびGli3の役割
Author(s)	下山, 安津子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45159
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

氏 名	しも やま あ づ こ 下 山 安 津 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 6 0 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学 位 論 文 名	インディアンヘッジホッグにより誘導される骨芽細胞分化過程における シグナル伝達因子 Gli2 および Gli3 の役割
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 米 田 俊 之 (副査) 教 授 天 野 淳 雄 助教授 米 原 典 史 助教授 島 袋 善 夫

論 文 内 容 の 要 旨

目的

インディアンヘッジホッグ *lhh* は、ショウジョウバエの体節での極性決定に関わるサイトカイン *hh* の哺乳類のホモログ Hedgehog (Hh) ファミリーの一員である。*lhh* は、骨芽細胞、成長軟骨に発現し、骨格組織の発生、分化においても重要な役割を果たしている。骨、軟骨の発育および形成における *lhh* の重要性は、*lhh* ノックアウトマウスが、長管骨での骨芽細胞分化障害、軟骨細胞の著しい増殖と分化抑制を示すことから裏づけられている。また *in vitro* においても *lhh* が、未分化間葉系細胞を骨芽細胞に分化誘導することが報告されている。しかし、*lhh* による骨芽細胞の分化制御メカニズム、特に *lhh* の作用発現に関与する細胞内シグナルについては、未だ不明である。本研究では、*lhh* のシグナル伝達分子として知られている Gli2 および Gli3 が *lhh* によって誘導される骨芽細胞分化において演じる役割を検討し、*lhh* による骨芽細胞分化誘導の分子メカニズムの解明を試みた。

方法

1. 未分化間葉系細胞の骨芽細胞分化の評価

骨芽細胞分化能を有する未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞ならびに、3 日齢マウス頭蓋骨より採取した初代骨芽細胞を用い、骨芽細胞の初期の分化はアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、後期の分化はアリザリンレッド染色法による石灰化を指標に評価した。

2. *lhh* 細胞内シグナルの解析

RT-PCR 法により *lhh* シグナル伝達分子 Gli2 および Gli3 の発現の検討を行った。

3. アデノウイルス発現系による Gli2、Gli3、骨形成制御転写因子 Cbfa1 の過剰発現

野生型あるいはドミナントネガティブ型 (DN) Gli2、Gli3、あるいは Cbfa1 cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターを細胞に感染させた。導入したタンパクの発現はウェスタンブロッティング法により検討した。

4. Cbfa1 の転写活性の測定

Cbfa1 の直接的な標的遺伝子であるオステオカルシン遺伝子のプロモーター活性を指標として測定した。

結果

1. 骨芽細胞分化に対する *lhh* の効果

C3H10T1/2 細胞に *lhh* を添加すると ALP 活性が誘導された。また、*lhh* は初代骨芽細胞の石灰化を誘導した。

2. Gli2 および Gli3 の発現

RT-PCR により C3H10T1/2 細胞は Gli2、および Gli3 を発現することが示された。

3. 骨芽細胞分化における Gli2、Gli3 の効果

アデノウイルスシステムを用いて、C3H10T1/2 細胞あるいは初代骨芽細胞に Gli2 を過剰発現させると、骨芽細胞の分化が誘導された。この Gli2 の骨芽細胞分化誘導効果は *lhh* により増強された。さらに DN-Gli2 の過剰発現は、*lhh* によって誘導される骨芽細胞分化を抑制した。一方、C3H10T1/2 細胞に Gli3 を過剰発現させると *lhh* によって誘導される骨芽細胞分化が抑制された。また DN-Gli3 の過剰発現は *lhh* に誘導される骨芽細胞分化を促進した。

4. Cbfa1 の発現および転写活性に対する Gli2 および Gli3 の効果

Gli2 の骨芽細胞分化誘導のメカニズムを検討する目的で、骨芽細胞分化において中心的役割を果たす転写因子 Cbfa1 に対する Gli2 の効果を検討した。C3H10T1/2 細胞に Gli2 を過剰発現させると、Cbfa1 の発現が誘導された。さらに、Gli2 の過剰発現は、Cbfa1 の転写活性を促進した。一方、Gli3 を C3H10T1/2 細胞に過剰発現させても Cbfa1 の発現は誘導されなかった。また、Gli3 の過剰発現は、Cbfa1 の転写活性に影響を与えなかった。

5. BMP2 シグナルに対する Gli2 および Gli3 の効果

骨芽細胞分化における Gli2 および Gli3 と BMP2 の相互関係について検討を行った。C3H10T1/2 細胞に BMP2 を作用させるとアルカリフォスファターゼ活性が誘導された。このアルカリフォスファターゼ活性は Gli2 の過剰発現により促進された。しかし、Gli3 の過剰発現はこの BMP2 誘導性のアルカリフォスファターゼ活性を抑制した。

結論・考察

本研究により *lhh* により誘導される骨芽細胞分化においては、*lhh* により活性化される Gli2 が重要な役割を担っていることが明らかとなった。一方、Gli3 は *lhh* の骨芽細胞分化誘導能に対しては抑制的に作用することが示された。さらに Gli2 は Cbfa1 の発現および機能を誘導および促進することにより、骨芽細胞分化を制御していることが示された。したがって、*lhh*-Gli2-Cbfa1 軸が骨芽細胞の分化誘導過程において重要な役割を担っていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は骨形成の分子メカニズムの解明を目的として、骨芽細胞の分化過程におけるシグナル伝達分子 Gli2 および Gli3 の役割について検討したものである。その結果、Gli2 は転写因子 Cbfa1、あるいは強力な骨形成促進サイトカイン BMP2 と協働して骨芽細胞の分化を促進し、一方 Gli3 は骨芽細胞の分化を抑制することが明らかとなった。以上の結果は、骨形成のメカニズムの一端を明らかにしたのみならず、骨粗鬆症などの骨疾患の治療を考える上でも有益な指針を与えるものであり、博士（歯学）を授与するに値すると認める。