



|              |                                                                             |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Krüppel-Like Factor4は一次繊毛のヘッジホッグシグナルを介して骨芽細胞の分化を抑制する                        |
| Author(s)    | 竹内, 優斗                                                                      |
| Citation     | 大阪大学, 2019, 博士論文                                                            |
| Version Type | VoR                                                                         |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/76191">https://doi.org/10.18910/76191</a> |
| rights       |                                                                             |
| Note         |                                                                             |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

学位論文

Krüppel-Like Factor 4 は一次繊毛のヘッジホッグシグナル  
を介して骨芽細胞の分化を抑制する

大阪大学大学院歯学研究科  
口腔科学専攻  
口腔分化発育情報学講座  
(顎顔面口腔矯正学教室)

竹内 優斗

2019 年 9 月

## 緒言

繊毛は、ほとんどの細胞が有している微小管を中心とした軸糸を繊毛膜が取り囲んだ構造をもつ細胞小器官であり、運動性の繊毛と非運動性の繊毛がある。運動性の繊毛は、精子細胞のように細胞の推進力を生み出す、もしくは肺から粘液や細胞片を除去するような細胞外液を動かすといった機能を有している。これに対して、非運動性の繊毛は、一次繊毛とも呼ばれ、単体では移動することがなく、細胞周囲の外部環境もしくは細胞からのシグナルを伝達するアンテナとしての機能を果たしている (Pedersen, et al., 2016, Spasic and Jacobs, 2017). 一次繊毛の形成は、細胞周期における  $G_0/G_1$  期への移行によりはじめて開始するといった細胞周期との関連性が過去に報告されている (Sanchez and Dynlacht, 2016). 一次繊毛の正常な形成や機能は、正常な器官発生やそれらの恒常性の維持に必要不可欠であるとされ、一次繊毛の形成および機能異常は、多指症、多発性嚢胞腎、内臓逆位や網膜変性など広範囲にわたる疾患と関連しており、これらの疾患は総じて “ciliopathies”, つまり「繊毛病」と称されている (Reiter and Leroux, 2017).

骨格に関連した繊毛病の病態として、胸郭低形成、四肢短縮および多指症が挙げられ、関連する疾患としては、短肋骨多指症候群 (short-rib polydactyly syndromes), 窒息性胸郭ジストロフィー (asphyxiating thoracic dystrophy), Ellis-van Creveld 症候群, 頭蓋外胚葉異形成症 (cranioectodermal dysplasia) といった骨系統疾患が知られている (Zhang, et al., 2018). 一次

繊毛の形成異常では、伝達する主要なシグナルが細胞種により異なることや、伝達されるシグナルのバランスなどが変化することから、個々の疾患の表現型は驚くほどバラエティーに富んでいる。過去に報告された骨格に関連した繊毛病関連遺伝子の多くは、一次繊毛の形成や機能維持における基盤を担い、繊毛内へ受容体や繊毛の構成タンパク等を輸送する繊毛内輸送 (Intraflagellar transport: IFT) システムに関連したタンパク質をコードする遺伝子である。また、基底小体 (Basal body) タンパク質をコードする遺伝子 (Reiter and Leroux, 2017) や、繊毛の骨格として働くチューブリンを形成する中心小体が占める特殊な細胞質マトリクスの形成異常で骨格形成に異常が出る例なども報告されており (Reiter and Leroux, 2017, Watanabe, et al., 2019), 今後さらに繊毛に関連する骨系統疾患が増えていくものと思われる。

一次繊毛はモルフォゲンなどのシグナルを、繊毛膜に局在する特異的な受容体を介して、細胞内に伝達している。その中で最も代表的なものが、正常な骨形成に不可欠であるとされるヘッジホッグシグナルである (Bangs and Anderson, 2017, He, et al., 2017, Yang, et al., 2015). ヘッジホッグシグナルは、そのリガンドが Patched (Ptch) と呼ばれる細胞表面の受容体に結合するところから開始され、Ptch を介在して抑制されていた Smoothened (SMO) の機能を活性化させる。その結果、繊毛の膜上にあった Ptch は、ヘッジホッグシグナルのネガティブレギュレーターとして機能するオーファン受容体である Gpr161 も含めて、繊毛外へ移

動する。活性化した SMO は繊毛内へ移動し, Suppressor of Fused (Sufu) タンパクの作用を抑制することで, ヘッジホッグシグナルの下流因子である glioma-associated oncogene homolog (GLI) タンパクを活性化させる。一方, ヘッジホッグリガンドがない時は, GLI タンパクは繊毛内のキナーゼによるリン酸化の修飾を受けることで部分的に切断され, 転写活性化部位を欠落した状態で核内に移行し, シグナル伝達を積極的に抑制している (Kong, et al., 2019). つまり, 一次繊毛はヘッジホッグシグナルの伝達を開始する場でもあり, 逆にリガンドがない時はシグナルを強く抑制する場でもある。

Krüppel-Like Factor 4 (KLF4) は, zinc finger タイプの転写因子で, 体表上皮や消化管上皮 (内皮) の発生に必要不可欠である (Shields, et al., 1996, Ton-That, et al., 1997). KLF4 は上皮や内皮の分化の進んだ細胞に多く発現しており, これらの細胞の細胞周期を止めると同時に最終分化に必須の役割を担う。KLF4 遺伝子欠損マウスは皮膚のバリア機能形成が未熟であるため, 生後すぐに極度の脱水状態となり, 24 時間以内に致死となる (Segre, et al., 1999). また, 腸管では杯細胞の形成が見られない (Katz, et al., 2002). 一方で, KLF4 は iPS 細胞を誘導するための 4 因子の一つとしても知られており (Takahashi and Yamanaka, 2006), この場合は体細胞を初期化, すなわち未分化な状態へ誘導する因子として作用する。KLF4 が細胞を分化させる方向に働くか, または未分化な状態に導くかは, 核内で作用する際のクロマチンの状態や共発現する他の転写因子, 転写共役因子との組み合わせで決まると思われる

(He, et al., 2015). KLF4 は正常な骨格の発達にも関与しており、骨芽細胞の分化を抑制していることが示されている (Michikami, et al., 2012, Kim, et al., 2014). 骨芽細胞において特異的に KLF4 を過剰発現するトランスジェニックマウス (*Colla1-Klf4* トランスジェニックマウス; Michikami, et al., 2012) では、頭蓋冠における石灰化不良、長管骨における石灰化領域の短縮や血管侵入の大幅な遅延といった、膜性骨化と軟骨内骨化の異常に起因した骨格発生異常が見られ、骨芽細胞における KLF4 の発現の減弱が正常な骨格の発達に極めて重要であることが示唆される。しかしながら、その詳細な機序は不明である。培養細胞では、細胞の増殖を停止させると KLF4 の産生が誘導され (Shields, et al., 1996), また KLF4 の発現を細胞に促すと、細胞の分裂は停止する (Shie, et al., 2000) ことが示されている。さらに、KLF4 の細胞周期を抑制する機能は、線維芽細胞や腸上皮細胞といった多岐にわたる細胞においてみられる (Chen, et al., 2001, Dang, et al., 2003). そのため、一次繊毛と細胞周期との関連性から、KLF4 が一次繊毛の形成や形態に関与していること、さらには KLF4 とヘッジホッグシグナルの骨形成への関連性から、KLF4 が一次繊毛のシグナルに影響を与えていることが考えられる。そこで、本研究では骨芽細胞において、KLF4 が一次繊毛の形成や形態ならびに細胞周期、また一次繊毛におけるシグナルを介した骨形成に影響しているとの仮説を立て、それらについて検証を行った。さらに、転写因子である KLF4 の効果を伝え、骨芽細胞の分化に関係している可能性がある遺伝子の同定を試みた。

## 材料ならびに方法

本実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査・承認（承認番号：動歯-27-001-0, 動歯-27-007-0), 大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査・承認（承認番号：#4080)のもとに行った。

### KLF4 の一次繊毛の形成と維持に対する影響

#### ① 骨芽細胞の調製

頭蓋冠由来の初代骨芽細胞は、生後直後の ICR 系マウスから採取した。実体顕微鏡下で採取した頭蓋冠を、1 mg/ml コラゲナーゼ (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), 2 mg/ml ディスパーゼ (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を含む滅菌リン酸緩衝食塩水 (PBS) を用いて 37°C 20 分で 5 回処理した。1 回目の処理で得られた溶液からの細胞は破棄し、その後の処理で得られた溶液から細胞を回収した。回収した細胞は、10% ウシ胎仔血清 (FBS, Thermo Fisher Scientific) および 10 mg/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加した  $\alpha$ -MEM (Thermo Fisher Scientific) にて、37°C でインキュベート、サブコンフルエントまで培養を行った。培養した細胞は、細胞数を測定し、Banbanker freezing solution (Wako Pure Chemical Industries) にて凍結させるか、直接実験に使用した。すべての培養実験は、継代 2 代目の骨芽細胞を用いて行った。

## ② レトロウイルスの作製と骨芽細胞への導入

緑色蛍光タンパク (green fluorescent protein: GFP) および KLF4 タンパクを発現するレトロウイルスは, pMX-GFP, pMX-KLF4 (Addgene, Cambridge, MA, USA) を使用した. ウイルス液の調製, 骨芽細胞への感染は Takahashi らの方法 (2007) に従った. 6 well の細胞培養用ディッシュ (Thermo Fisher Scientific) に  $1 \times 10^6$  cells のパッケージング細胞 (plat-E 細胞) をピューロマイシン、ブラストシジンを追加して播種し, 37°Cで一晩培養した. ScreenFect A (Wako Pure Chemical Industries) を用いて, pMX-GFP, pMx-KLF4 を plat-E 細胞に遺伝子導入し, 6 時間インキュベーションした. その後, 培地を 10% FBS 添加 DMEM 培地に交換し, 37°Cで約 36 時間培養したものをフィルター処理し, ポリブレン溶液 (4  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加したものをレトロウイルス液として使用した. サブコンフルエントに達した骨芽細胞に, 調整したレトロウイルス液を追加し, 37°Cで 4 時間培養を行った. その後, この培養液にウイルス液と等量の培地を加え, 37°Cで一晩培養し, 新しい培地に交換, コンフルエントに達するまで培養した. 感染効率は GFP の蛍光によって確認し, またウエスタンブロッティングによって KLF4 タンパクの産生を確認した. ウイルス液の調整に用いた培養皿やチップはオートクレーブ滅菌後に廃棄した.

### ③ 一次繊毛の免疫細胞染色および定量化

前述の手法で培養を行った GFP, KLF4 を発現する骨芽細胞を用いて、一次繊毛形成への影響を検討することを目的として、次の3つの条件で培養を行った。

1) 72hrs; 72 時間培養液を交換せずに骨芽細胞を培養。

2) FBS starved; 骨芽細胞を 48 時間培養後, 24 時間血清を除去して培養 (一次繊毛が形成されるように促した条件)。

3) FBS recovered; 骨芽細胞を 48 時間培養後, 21 時間血清を除去し, その後3時間血清含有培地で培養 (一次繊毛の退縮が生じるように促した条件)。

前述の培養条件で、培養を行った細胞を PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドを用いて室温にて 15 分間固定した。固定した細胞は PBS にて洗浄し、免疫蛍光染色を行った。

免疫蛍光染色を行う際には、PBS 中にて 0.3% Triton X-100 を用いて、10 分間処理し、5% 正常ヤギ血清 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて1時間ブロッキングを行った。

一次繊毛の確認には抗アセチル化  $\alpha$  チューブリンマウスモノクローナル抗体 (Abcam,

Cambridge, MA, USA, ab24610; 1:750) を一次抗体として使用し、二次抗体として Cy3 標識ヤ

ギ抗マウス免疫グロブリン G (Abcam, ab97035; 1:500) にて反応させた。核は 1  $\mu\text{g/ml}$  4',

6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) にて 15 分間反応させた。試料を蛍光顕微

鏡 (Axioskop 2 plus microscope, Carl Zeiss, CA, USA) にて観察し, Axio Vision ソフトウェア

(Release 4.6.3) を使用して画像を取得した。得られた蛍光染色画像を用いて、細胞核に近接しドット状に染色されたものを一次繊毛と判断し、繊毛を形成する頭蓋冠由来の骨芽細胞の割合を測定した。

#### ④ 走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscope; SEM) による一次繊毛の長さの測定

骨芽細胞を、24 well の細胞培養プレート中の Cell Desk LF1 (Wako Pure Chemical Industries) 上で前述の条件で培養し、2% ホルムアルデヒドおよび 2.5% グルタルアルデヒドを用いて固定を行った。続いて、1% 四酸化オスミウムで後固定し、その後 1% タンニン酸と 1% 四酸化オスミウム溶液を用いて染色した。試料を、エタノールを用いた臨界点乾燥法によって乾燥させ、真空蒸着法により四酸化オスミウムで被覆し、S-4800 電界走査型電子顕微鏡 (Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan) で観察した。一次繊毛の長さを、得られた SEM 画像から Image J software (version 2.3.77) を用い測定した。一次繊毛の長さの測定に用いたものは可能な限り水平に近い線状のものであり、その基底部から先端部までの繊毛の中央部の長さを測定した。

#### ⑤ KLF4 の骨芽細胞における細胞周期への影響

GFP もしくは KLF4 を発現させた骨芽細胞を回収し、70% エタノールにてアルコール固定

を行った。その後、RNase 処理を行い、propidium iodide による DNA 染色を行った。約 2 万個の骨芽細胞に対し、BD FACSAria III (BD bioscience, NJ, USA) を用いて、細胞周期解析を行った。

#### ⑥ 生体における KLF4 の一次繊維形成に対する影響の解析

*Colla1-Klf4* トランスジェニックマウス (Michikami, et al., 2012) の上腕骨切片を解析に使用した。野生型および TG マウス各 3 個体から組織を採取、パラフィン包埋した後、厚さ 7 $\mu$ m の組織切片を作成し、上腕骨近位部の三角筋粗面原基を含む軟骨膜から骨膜に移行する部位に免疫組織染色を施した。抗原賦活化はクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) もしくは 1mM EDTA を含む 10mM Tris (pH8.0) の中で切片を、100℃で 10 分間加熱処理して行った。続いて、トリス緩衝水溶液 (TBS) にて洗浄後、5% 正常ヤギ血清 (Vector Laboratories) にて 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体として抗アセチル化  $\alpha$  チューブリンウサギモノクローナル抗体 (Abcam, ab179484; 1:1000)、抗 KLF4 ウサギポリクローナル抗体 (GeneTex, LA, USA GTX101509; 1:1000) を使用し、室温にて 16 時間インキュベーションを行った。その後、抗 KLF4 抗体を反応させた切片は 0.3% 過酸化水素にて内在性ペルオキシダーゼを不活化し、2 次抗体として HRP-conjugated streptavidin (Thermo Fisher Scientific) と反応させ、検出用基質として 3,3'-diamino- benzidine (DAB) を使用し、可視化した。発色後、染色切片をエオジ

ンにて対比染色させ、脱水処理を行い封入した。免疫蛍光法の際には、蛍光標識二次抗体として FITC 標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン G (Abcam, ab6717; 1:500) を反応させた後、核を DAPI にて染色し、カバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡にて観察した。

#### KLF4 によるヘッジホッグシグナルへの影響の解析

##### ① 培養骨芽細胞におけるリアルタイム PCR を用いた *Gli1*, *Ptch1* の mRNA 量の測定

GFP, KLF4 を発現する骨芽細胞において、*Gli1*, *Ptch1* の mRNA 量はリアルタイム PCR 法を用いて測定した。リアルタイム PCR は、Mini Opticon Real-Time PCR System (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用し、試薬は THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて行った (Abe et al., 2010)。解析は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて行った。さらに、一次繊毛の形成に必須とされる Ift88 タンパク (Boehlke, et al., 2015) を siRNA を用いてノックダウンさせ、ウェスタンブロッティングにてタンパクの発現を確認した。さらに、一次繊毛の形成を阻害した際の *Gli1*, *Ptch1* の mRNA の発現量、また SMO アゴニスト (SAG) 添加時の *Gli1* の発現量も同様の手法で測定した。また、本研究で使用したプライマーは Table 1 に示す。

## ② 培養骨芽細胞の石灰化染色, 遺伝子発現解析

KLF4 による骨芽細胞の石灰化の抑制効果への SAG の影響を調べるため, アリザリンレッド染色を行った. GFP, KLF4 をそれぞれ発現させた骨芽細胞を, DMSO (SAG の溶媒として使用) および SAG を培地に添加した状態で培養し, 10% 中性緩衝ホルマリンを用いて固定後, 2 回蒸留水にて十分に洗浄を行った. 2% Alizarin Red S (Wako Pure Chemical Industries) を 30 分間反応させ, 2 回蒸留水にて十分に洗浄を行い, 70% エタノールにて脱水後乾燥させた後にスキャナーで画像の取り込みを行った. 骨芽細胞遺伝子の発現解析は前述のリアルタイム PCR 法を用いて行った.

## KLF4 による骨芽細胞における遺伝子発現解析

### ① マイクロアレイ解析のための全 RNA 調製および遺伝子発現解析

培養後コンフルエントに達した 2 日後にマウス頭蓋冠由来の初代骨芽細胞を用いてマイクロアレイ分析を行った. Cy3-labelled cRNA を断片化し, SurePrint G3 Mouse GE 8× 60 K V.2 マイクロアレイ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) にハイブリダイズさせた. スライドは 1 色スキャン設定を使用して, Agilent SureScan マイクロアレイスキャナー (G2600D) で行った. 特異的に発現が増加もしくは減少した遺伝子を DAVID オンラインリソース (<https://david-d.ncifcrf.gov>) にアップロードして遺伝子オントロジー (GO) 濃縮分析

を行い、経路濃縮を Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes (KEGG) データベース

(<https://www.kegg.jp>) を用いて評価した.

## ② マイクロアレイ分析によって見出された遺伝子による骨芽細胞の石灰化、ヘッジホッグ

### シグナルへの影響の解析

マイクロアレイ分析の結果から、繊毛の形成やヘッジホッグシグナル、骨芽細胞の分化に関係している可能性がある遺伝子を選択した. 選択した遺伝子を発現するレトロウイルスを作製, 培養骨芽細胞に導入し, 上記と同様の手法で, 骨芽細胞の石灰化に対する作用, ヘッジホッグシグナルへの影響を調べた.

### 統計分析

実験結果は平均値±標準誤差として表記した. 2 群間に対して統計学的検定を行う場合は, Student's *t* 検定を用いて比較を行った. 3 群間以上の検定には, R 用のグラフィックユーザーインターフェースである EZR を使用し, 一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後, Tukey's post-hoc test を行った (Kanda, 2013). 有意水準は  $P < 0.05$  とした.

## 結果

### KLF4 の一次繊毛の形成と維持に対する影響

レトロウイルスシステムを用いて, GFP もしくは KLF4 を発現させた初代骨芽細胞を 72 時間培養液の交換を行わずに培養し (Fig.1 a-c, Fig.2 a), 抗アセチル化  $\alpha$  チューブリン抗体による免疫染色を行った. 繊毛を形成した骨芽細胞の割合は, コントロールの骨芽細胞 (Fig.1 a, c; GFP  $40.2 \pm 10.2\%$ ) と比較して KLF4 を発現させた骨芽細胞 (Fig.1 b, c; KLF4  $67.3 \pm 2.5\%$ ,  $P < 0.005$ ) において有意に高かった. KLF4 を骨芽細胞に発現させたときの一次繊毛の長さ (Fig.2 a; KLF4  $1.10 \pm 0.63 \mu\text{m}$ ) は, コントロールの骨芽細胞における一次繊毛の長さと比較して有意に短かった (Fig. 2 a; GFP  $2.03 \pm 0.84 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.005$ ). 続いて, 血清を除去した状態で最後の 24 時間培養を行い, 一次繊毛の形成が促される条件とした場合には, 繊毛を有する骨芽細胞の割合は, コントロール (Fig.1 d, f; GFP  $79.5 \pm 6.8\%$ ) と KLF4 を発現させた骨芽細胞 (Fig.1 e, f; KLF4  $77.6 \pm 1.8\%$ ) とで同程度であった. また, この培養条件における繊毛を形成する細胞の割合は, 培養液を交換せずに 72 時間培養した場合と比較して, コントロールと KLF4 の産生を促した骨芽細胞の両方において, 上昇が見られた (Fig.1 f). しかしながら, 培養骨芽細胞の表面に認められた繊毛は, コントロールの骨芽細胞 (Fig. 2 b;  $2.11 \pm 0.79 \mu\text{m}$ ) と比較して KLF4 を発現させた骨芽細胞 (Fig. 2 b;  $1.18 \pm 0.50 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.005$ ) において有意に短かった. 血清除去時間を 21 時間とし, 10% FBS を含有する培地を 3 時間加

え、一次繊毛の退縮が生じやすい条件で培養すると、繊毛を形成する細胞の割合は、コントロール (Fig. 1 g, i) において  $59.8 \pm 6.0\%$ であったが、KLF4 の発現を促した細胞 (Fig. 1 h, i) では  $67.4\% \pm 1.2\%$ であった。繊毛の長さは、コントロールの細胞 (Fig. 2 c;  $1.80 \pm 0.70 \mu\text{m}$ ) と比較して、KLF4 を発現する細胞 (Fig. 2 c;  $1.21 \pm 0.40 \mu\text{m}$ ) ではより短かった。いずれの培養方法においても、GFP および KLF4 の発現を促した骨芽細胞における一次繊毛の形態はほぼ直線的であり、先端が膨らんだような構造異常は見られなかった (Fig. 2 a-c)。

#### KLF4 の骨芽細胞における細胞周期への影響

GFP もしくは KLF4 を発現させた骨芽細胞を回収し、細胞周期解析を行った。ゲーティングによって選別された骨芽細胞中における各周期毎の細胞の割合を調べたところ、KLF4 は骨芽細胞の細胞周期に大きな影響を与えなかった (Fig. 3)。

#### 生体における KLF4 の一次繊毛形成に対する影響

骨芽細胞で KLF4 を発現させた *Colla1-Klf4* トランスジェニックマウスの上腕骨切片を用いて、生体における KLF4 の繊毛形成に対する影響を調べた。KLF4 は胎生 16.5 日齢の野生型マウスの骨膜および軟骨膜において弱く検出された (Fig. 4a)。一方、*Colla1-Klf4* トランスジェニックマウスにおける骨膜の骨芽細胞において KLF4 の強い染色反応があった (Fig.

4b). アセチル化  $\alpha$  チューブリンの免疫染色によって一次繊毛を検出すると, *Coll1a1-Klf4* トランスジェニックマウスにおいて繊毛を形成する細胞の割合が顕著に増加した (Fig. 4c; 野生型マウス  $20.7 \pm 0.03\%$ , 4d; トランスジェニックマウス  $36.9 \pm 0.06\%$ ,  $P < 0.05$ ).

#### 骨芽細胞における KLF4 のヘッジホッグシグナルに対する影響

ヘッジホッグシグナルは一次繊毛に局在する受容体にリガンドが結合することで伝達される. KLF4 は特に繊毛の長さへの作用が見られたため, *Gli1*, *Ptch1* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した. 骨芽細胞において, *Gli1* の発現は KLF4 によって抑制された (Fig. 5a). 一方, *Ptch1* の発現は増加傾向を示した (Fig. 5b). 繊毛の形成を Ift88 タンパクのノックダウンにより抑制すると, KLF4 による *Gli1* の発現の低下は増加に転じた (Fig. 6). 次に, GFP と KLF4 を発現させた骨芽細胞において, SMO アゴニスト (SAG) 添加時にヘッジホッグシグナルが誘導されるかどうかについて調べたところ, *Gli1* と *Ptch1* はいずれの骨芽細胞においても, 発現の上昇が認められた (Fig. 7). さらに, 本研究では Gli を介在した転写を活性化させることで, 骨芽細胞の石灰化に対する KLF4 の抑制効果を回復することができるかどうかを調べた. KLF4 を発現させた骨芽細胞において認められた石灰化の抑制は, SAG を添加することで石灰化の回復が見られた (Fig. 8a). また, 骨芽細胞関連遺伝子の発現に対する SAG の影響を調べたところ, *Alp* および *Sp7* の発現はともに, KLF4 により抑制されたが,

SAG 添加時には、石灰化の回復と相関して、これらの遺伝子発現が増加した (Fig. 8b).

#### KLF4 による骨芽細胞における遺伝子発現解析

骨芽細胞において、転写因子である KLF4 が一次繊毛の形成に作用している可能性のある候補分子を同定するために、KLF4 を発現させた骨芽細胞の包括的な遺伝子発現解析を行ったところ、発現の変化する遺伝子が 1400 以上見出された (Fig. 9a). KLF4 により 809 種類の遺伝子が 2 倍以上増加し、そして 676 個の遺伝子が半分以下に抑制された. GO 解析により KLF4 によって発現変化する遺伝子には、細胞外領域や細胞膜、そして細胞接着に関連しているものが多く見られ、その一部に繊毛形成と関連する因子が含まれていると考えられた (Fig. 9b).

#### KLF4 によって誘導された核内受容体である Pregnane X receptor (Pxr) の骨芽細胞の石灰化に対する影響

KLF4 によって誘導され、骨芽細胞分化に対して KLF4 と同様の効果を発揮する可能性のある遺伝子の同定を試みた. マウス胚におけるトランスクリプトームデータベースである Euxpress を利用し、候補遺伝子が生体で骨細胞に発現しているかどうかを調べた (<http://www.euxpress.org/ee/>). この中から繊毛の形成やヘッジホッグシグナル、骨芽細胞の

分化に関係している可能性がある遺伝子を選択し、骨芽細胞の石灰化に対する作用を調べた。選択した遺伝子を発現するレトロウイルスを作製し、培養骨芽細胞に導入した。培養開始 9 日後、KLF4 はコントロールと比較して石灰化を抑制したが、Pxr においても KLF4 以上の強い石灰化の抑制が見られた (Fig. 10)。今回検証を行った遺伝子の中で、KLF4 および Pxr 以外の遺伝子では、石灰化の抑制は見られなかった。*Gli1* の発現についても調べたところ、Pxr は KLF4 と同様に発現を抑制した (Fig. 11a)。また、Pxr により抑制された骨芽細胞の石灰化は、SAG 添加により回復した (Fig. 11b)。

## 考察

### KLF4 は一次繊毛の形成や長さに影響する

一次繊毛は、ほぼ全ての種類の細胞から突出した細胞小器官であり、骨格の正常な発達および恒常性の維持において重要な役割を果たしている (Yuan, et al., 2015). 一次繊毛の合成や機能の異常は繊毛病と呼ばれる疾患を引き起こす. 報告されている繊毛病の数は、繊毛病関連遺伝子の数と同様に、現在も増加している (Reiter and Leroux, 2017).

一次繊毛の形成は、細胞周期が G0/G1 期に移行した後に開始され、G1 期から S 期へと進行するにつれて急速に短くなり、有糸分裂時には観察できなくなる (Sanchez and Dynlacht, 2016). G1 期の長さが細胞分化に関連している報告 (Ruijtenberg and Heuvel, 2016) があることから、KLF4 が骨芽細胞の分化を抑制する際には、細胞周期に影響を与えている可能性が考えられたが、実際 KLF4 は骨芽細胞の細胞周期にほぼ影響を与えなかった. しかし、KLF4 による繊毛を有する骨芽細胞の割合は、本研究で行った培養条件によっては有意に高かったことから、細胞周期に対する作用についてさらなる詳細な検討が必要と思われる. 一方、KLF4 を発現する骨芽細胞における一次繊毛の長さが、本実験で行った培養条件ですべて短くなったことから、KLF4 は繊毛の長さを調節する因子を制御している可能性が考えられた. 繊毛の長さを調節する因子は、前述した繊毛病と関連しているものが含まれ、その中でも IFT システムに関係するタンパク質が多い. 繊毛内での順行性輸送は IFT-B 複合体とキネシ

ン-2 モーターを用いて行われる (Scholey, 2008, Taschner, et al., 2012) が, IFT88 を含め, これらの異常は繊毛の欠如もしくは短縮が生じるとされる (Hou et al., 2007, Matsuura et al., 2002, Pazour, et al., 2000). そして, IFT-A 複合体およびダイニン-2 モーターで行われる逆行性輸送 (Taschner, et al., 2012) において, これらのタンパク質の異常は, 繊毛の先端部に IFT 粒子が蓄積されるため, 先端が膨らんだ構造異常が生じるとされる (Iomini, et al., 2009, Merrill, et al., 2009). 本研究で得られた SEM 画像による KLF4 による繊毛の形態は, 先端が膨らんだ形とはなっておらず, 繊毛内輸送で特に順行性輸送に影響が強く出ていると考えられた.

Nek1 (NIMA-related kinase 1) もまた KLF4 によって発現が誘導され, 一次繊毛の長さとの関連性が疑われた因子である. Nek1 は, 一次繊毛の基底小体に局在しており, 繊毛の安定性の調節に関与しているとされる (Shalom, et al., 2008, Wang, et al., 2014). Nek1 の異常は, *in vivo* において, 多嚢胞性嚢胞腎や短肋骨といった繊毛病と関連した表現型が認められ (Thiel, et al., 2011), また一次繊毛の長さが短くなることが報告されている. しかしながら, 繊毛を形成する細胞の割合も減少するとされているため, 本研究で得られた知見とは逆の結果であった. このことを含め, 今回の遺伝子発現解析では, 順行性輸送に関与する IFT タンパクをコードする遺伝子などの明瞭な発現低下は見いだせなかったため, 一次繊毛の長さに影響した因子について, 今後タンパクレベルでの繊毛内局在の解析が必要と思われた.

## KLF4によるヘッジホッグシグナルの調節メカニズム

ヘッジホッグシグナルは正常な骨形成に不可欠であることが, *in vivo* と *in vitro* の両方において示されている (Yang, et al., 2015). 最近の報告では, 骨前駆細胞が成熟するには時間的に制御された動的なヘッジホッグシグナルの伝達が必要であると指摘されている (Li, et al, 2017). 未分化間葉細胞は, 多数の骨芽細胞特異的タンパク質を産生する前に遊走, 増殖, 凝集する. この初期段階では, ヘッジホッグシグナルは GLI の負の調整因子である Sufu によってきわめて低いレベルで維持される必要がある (Li, et al., 2017). 次の段階では, 高レベルのヘッジホッグシグナルが骨芽細胞前駆細胞に対する特異化に必要となる. したがって, 適切なタイミングでヘッジホッグシグナルの持続期間や強さが制御されることが正常な骨格の発達に重要となる. つまり, リガンド濃度が低いときには基礎活性を強く抑制しながら, ヘッジホッグリガンドに反応する能力が維持されることが重要である. KLF4 は未熟な骨芽細胞で高発現し, その発現が骨芽細胞の成熟中に減弱することが知られている (Garrett-Shinha, et al., 1996). 本研究では, KLF4 の発現を誘導した骨芽細胞は, ヘッジホッグシグナルに対する反応を維持しながら, より短い繊毛を形成した. この結果は, KLF4 が一級繊毛の特徴を変化させることで, ヘッジホッグシグナルの基底レベルでの活性を抑制し, 適切なタイミングでこのシグナルの強さを微調節することによって骨形成を調節していると考えられる.

## ヘッジホッグシグナルと一次繊毛との関係性

四肢発生時に、ヘッジホッグシグナルの全てが一次繊毛上の *Ptch* を経由して行われているか、厳密にはいまだ不明瞭な点がある。一次繊毛がないショウジョウバエにおいて、ハエの GLI ホモログ (*HH-Ci*) のシグナル伝達機構が *Ptch* を経由して行われる (Davenport and Yoder, 2005, Yang, et al., 2015) ことから、繊毛だけからのシグナル受容に関しては注意深い検討が必要である。脊椎動物の肢発生では、極性化活性体とよばれる領域の細胞から分泌されるソニックヘッジホッグ (*Shh*) の濃度勾配によって、前後軸の極性が決定するとされるが、*Gli1* ゲノム配列に *Cre* リコンビナーゼを組み込んだマウスと *Cre* レポーターマウスとの交配によって生まれるダブル TG マウスでは、*Shh* を産生する領域周囲の細胞がすべてレポーター陽性となっていない (Ahn and Joyner, 2004)。このことは生体内での四肢発生時には、細胞において *Shh* のシグナルを受容するための何らかの条件があることが示唆しており (Wong, et al., 2009)、この必要条件の一つが一次繊毛の存在の可能性がある。本研究では、一次繊毛の形成を *Ift88* タンパクのノックダウンにより抑制した際に、*KLF4* による *Gli1* の発現の低下が見られなくなったことから、*KLF4* は骨芽細胞におけるヘッジホッグシグナルのうち、繊毛を介在した一部のシグナルに影響していることが示唆される。

## Pxr は骨芽細胞の石灰化、ヘッジホッグシグナルを抑制する

本研究で行ったマイクロアレイ分析によって見出された Pxr は、主に肝臓や腸に強く発現している核内受容体であるが、骨芽細胞においても低レベルで発現することが知られている (Tabb, et al., 2003). 本研究において、Pxr の発現を骨芽細胞に誘導すると、KLF4 と同様に骨芽細胞の石灰化を強く抑制し、また *Gli1* の発現も抑制することが見出された。しかしながら、既に報告のある Pxr ノックアウトマウスの表現型は骨密度が有意に減少した骨減少症を示し (Azuma, et al., 2010), 本研究で示された知見とは逆の結果であった。このことに関して、骨肉腫細胞株では、Pxr のリガンドの一つとしてビタミン K が考えられており、骨特異的遺伝子の転写を制御していることが報告されていることや (Tabb, et al., 2003, Ichikawa, et al., 2006), また肝臓や腸では、Pxr により CYP3A4 や Cyp24 などの代謝酵素が誘導されることによってビタミン D 受容体の機能やビタミン D そのものの活性に影響を与えていることが報告されていることから (Pascussi, et al., 2005, Zhou, et al., 2006), 個体レベルにおいて、Pxr は骨組織外でカルシウムやリン酸の恒常性の調節を介して間接的に骨代謝に影響を及ぼしているため、*in vivo* と *in vitro* において逆の知見が得られた可能性が考えられた。

## 結論

本研究では, KLF4 を発現させた骨芽細胞において, KLF4 が及ぼす一次繊毛の形成や形態, ならびに一次繊毛におけるシグナルを介した骨形成への影響について検討し, さらに転写因子である KLF4 の効果を伝え, 骨芽細胞の分化に関係している可能性がある遺伝子の同定を試みたところ, 以下の結果を得た.

- (1) KLF4 は, 一次繊毛の形成や維持, そして長さに影響を及ぼす.
- (2) KLF4 は骨芽細胞の細胞周期にほぼ影響を与えなかった.
- (3) KLF4 は, ヘッジホッグシグナルを抑制している. そして, そのシグナルの一部は一次繊毛を介在している.
- (4) KLF4 による骨芽細胞における遺伝子発現解析によって見出された Pxr は, KLF4 の下流でヘッジホッグシグナルを抑制する.

以上の結果から, KLF4 は一部の一次繊毛を介在するヘッジホッグシグナルを抑制することで, 骨芽細胞の分化を抑制しており, また Pxr が KLF4 の下流でヘッジホッグシグナルを抑制している可能性が示唆された (Fig. 12).

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇意なるご指導を賜りました 大阪大学大学院歯学研究科 口腔分化発育情報学講座（顎顔面口腔矯正学教室）山城 隆 教授に心から敬意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、終始様々な御指導と御検閲をいただきました大阪大学大学院歯学研究科 口腔分化発育情報学講座（口腔解剖学第一教室）脇坂 聡 教授、および阿部 真土 博士に厚く御礼申し上げます。最後になりますが、終始研究に対し御理解と御協力をいただいた、顎顔面口腔矯正学教室ならびに口腔解剖学第一教室の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- Abe M., Michikami I., Fukushi T., Abe A., Maeda Y., Ooshima T., Wakisaka S. (2010) Hand2 regulates chondrogenesis in vitro and in vivo. *Bone* 46: 1359-1368
- Ahn S., Joyner A.L. (2004) Dynamic changes in the response of cells to positive hedgehog signaling during mouse limb patterning. *Cell* 118: 505-516
- Azuma K., Casey S.C., Ito M., Urano T., Horie K., Ouchi Y., Kirchner S., Blumberg B., Inoue S. (2010) Pregnane X receptor knockout mice display osteopenia with reduced bone formation and enhanced bone resorption. *J Endocrinol* 207: 257-263
- Bangs F., Anderson K.V. (2017) Primary cilia and mammalian Hedgehog signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9: a028175
- Boehlke C., Janusch H., Hamann C., Powelske C., Mergen M., Herbst H., Kotsis F., Nitschke R., Kuehn E.W. (2015) A cilia independent role of Ift88/Par1 during cell migration. *PLoS One* 10: e0140378
- Chen X., Johns D.C., Geiman D.E., Marban E., Dang D.T., Hamlin G., Sun R., Yang V.W. (2001) Krüppel-like factor 4 (gut-enriched Krüppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *J Biol Chem* 276: 30423-8
- Dang D.T., Chen X., Feng J., Torbenson M., Dang L.H., Yang V.W. (2003) Overexpression of

Krüppel-like factor 4 in the human colon cancer cell line RKO leads to reduced tumorigenicity.

Oncogene 22: 3424-30

Davenport J.R. and Yoder B.K. (2005) An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten. Am J Physiol Renal Physiol 289: F1159-69

Garrett-Shinha L.A., Eberspaecher H., Seldin M.F., Crombrughe B. (1996) A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. J Biol Chem 271: 31384-31390

He M., Agbu S., Anderson K.V. (2017) Microtubule motors drive Hedgehog signaling in primary cilia. Trends Cell Biol 27: 110-125

He M., Zheng B., Zhang Y., Zhang X.H., Wang C., Yang Z., Sun Y., Wu X.L., Wen J.K. (2015) KLF4 mediates the link between TGF- $\beta$ 1-induced gene transcription and H3 acetylation in vascular smooth muscle cells. FASEB J 29: 4059-70

Hou Y., Qin H., Follit J.A., Pazour G.J., Rosenbaum J.L., Witman G.B. (2007) Functional analysis of an individual IFT protein: IFT46 is required for transport of outer dynein arms into flagella. J Cell Biol 176: 653-665

Ichikawa T., Inoue K., Ikeda K., Blumberg B., Inoue S. (2006) Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen

accumulation in osteoblastic cells. J Biol Chem 281: 16927-34

Iomini C., Babaev-Khaimov V., Sassaroli M., Dutcher S.K. (2009) Retrograde intraflagellar

transport mutants identify complex A proteins with multiple genetic interactions in

*Chlamydomonas Reinhardtii*. Genetics 183: 885-896

Kanda Y. (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical

statistics. Bone Marrow Transplant 48: 452-458

Katz J.P., Perreault N., Goldstein B.G., Lee C.S., Labosky P.A., Yang V.W., Kaestner K.H. (2002)

The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in

the colon. Development 129: 2619-2628

Kim J.H., Kim K., Youn B.U., Lee J., Kim I., Shin H.I., Akiyama H., Choi Y., Kim N. (2014)

Krüppel-like factor 4 attenuates osteoblast formation, function, and cross talk with osteoblast. J

Cell Biol 204: 1063-1074

Kong J.H., Siebold C., Rohatgi R. (2019) Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling.

Development 146

Li J., Cui Y., Wang Q., Yang X., Li Y., Zhang X., Qiu M., Zhang Z., Zhang Z. (2017) Suppressor of

Fused restraint of Hedgehog activity level is critical for osteogenic proliferation and

differentiation during calvarial bone development. J Biol Chem 292: 15814-15825

- Matsuura K., Lefebvre P.A., Kamiya R., Hirono M. (2002) Kinesin-II is not essential for mitosis and cell growth in *Chlamydomonas*. *Cell Motil Cytoskeleton* 52: 195-201
- Merrill A.E., Merriman B., Farrington-Rock C., Camacho N., Sebald E.T., Funari V.A., Schibler M.J., Firestein M.H., Cohn Z.A., Priore M.A., Thompson A.K., Rimoin D.L., Nelson S.F., Cohn D.H., Krakow D. (2009) Ciliary Abnormalities Due to Defects in the Retrograde Transport Protein DYNC2H1 in Short-Rib Polydactyly Syndrome. *Am J Hum Genet.* 84, 542-549
- Michikami I., Fukushi T., Tanaka M., Egusa H., Maeda Y., Ooshima T., Wakisaka S., Abe M. (2012) Kruppel-like factor 4 regulates membranous and endochondral ossification. *Exp Cell Res* 318: 311-325
- Pascussi J.M., Robert A., Nguyen M., Debray O.W., Garabedian M., Martin P., Pineau T., Saric J., Navarro F., Maurel P., Vilarem M.J. (2005) Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* 115: 177-186
- Pazour G.J., Dickert B.L., Vucica Y., Seeley E.S., Rosenbaum J.L., Witman G.B., Cole D.G. (2000) *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 151: 709-718
- Pedersen L.B., Mogensen J.B., Christensen S.T. (2016) Endocytic control of cellular signaling at the primary cilium. *Trends Biochem Sci* 41: 784-797

- Reiter J.F., Leroux M.R. (2017) Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18: 533-547
- Ruijtenberg S., van den Heuvel S. (2016) Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle* 15: 196-212
- Sanchez I., Dynlacht B.D. (2016) Cilium assembly and disassembly. *Nat Cell Biol* 18: 711-717
- Scholey J.M. (2008) Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J Cell Biol* 14: 23-29
- Segre J.A., Bauer C., Fuchs E. (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 22: 356-360
- Shalom O., Shalva N., Altschuler Y., Motro B. (2008) The mammalian Nek1 kinase is involved in primary cilium formation. *FEBS Lett* 582: 1465-1470
- Shie J.L., Chen Z.Y., Brien M.J., Pestell R.G., Lee M.E., Tseng C.C. (2000) Role of gut-enriched Krüppel-like factor in colonic cell growth and differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G806-814
- Shields J.M., Christy R.J., Yang V.W. (1996) Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched krüppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 271:

20009-20017

Spasic M., Jacobs C.R. (2017) Primary cilia: cell and molecular mechanosensors directing whole tissue function. *Semin Cell Dev Biol* 71: 42-52

Tabb M.M., Sun A., Zhou C., Grün F., Errandi J., Romero K., Pham H., Inoue S., Mallick S., Lin M., Forman B.M., Blumberg B. (2003) Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 278: 43919-27

Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* 2: 3081-3089

Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676

Taschner M., Bhogaraju S., Lorentzen E. (2012) Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation* 83: S12-S22

Thiel C., Kessler K., Giessel A., Dimmler A., Shalev S.A., von der Haar S., Zenker M., Zahnleiter D., Stöss H., Beinder E., Jamra R.A., Ekici A.B., Schröder-Kress N., Aigner T., Kirchner T., Reis A., Brandstätter J.H., Rauch A. (2011) NEK1 mutations cause short-rib polydactyly syndrome type majewski. *Am J Hum Genet* 88: 106-14

Ton-That H., Kaestner K.H., Shields J.M., Mahatanankoon C.S., Yang V.W. (1997) Expression of

the gut-enriched Krüppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis.

FEBS Lett 419: 239-243

Wang W., Wu T., Kirschner M.W. (2014) The master cell cycle regulator APC-Cdc20 regulates

ciliary length and disassembly of the primary cilium. *Elife* 3

Watanabe K., Takao D., Ito K.K., Takahashi M., Kitagawa D. (2019) The Cep57-pericentrin module

organizes PCM expansion and centriole engagement. *Nat Commun* 10: 931

Wong S.Y., Seol A.D., So P.L., Ermilov A.N., Bichakjian C.K., Epstein E.H., Dlugosz A.A., Reiter

J.F. (2009) Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent

tumorigenesis. *Nat Med* 15: 1055-1061

Yang J., Andre P., Ye L., Yang Y. (2015) The Hedgehog signaling pathway in bone formation. *Int J*

*Oral Sci* 7: 73-79

Yuan X., Serra R.A., Yang S. (2015) Function and regulation of primary cilia and intraflagellar

transport proteins in the skeleton. *Ann N Y Acad Sci* 1335: 78-99

Zhang W., Taylor S.P., Ennis H.A., Forlenza K.N., Duran I., Li B., Sanchez J.A., Nevarez L.,

Nickerson D.A., Bamahad M., Lachman R.S., Krakow D., Cohn D.H. (2018) Expanding the

genetic architecture and phenotypic spectrum in the skeletal ciliopathies. *Hum Mutat* 39:152-166

Zhou C., Assem M., Tay J.C., Watkins P.B., Blumberg B., Schuetz E.Z., Thummel K.E. (2006)

Steroid and xenobiotic receptor and vitamin D receptor crosstalk mediates CYP24 expression and drug-induced osteomalacia. *J Clin Invest* 116: 1703-1712

Table 1; リアルタイム PCR に使用したプライマー

|           |                                                                 |
|-----------|-----------------------------------------------------------------|
| Alp       | 5'-TTGTGCCAGAGAAAGAGAGAGA-3'<br>5'-GTTTCAGGGCATTTCATCAAGGT-3'   |
| Gli1      | 5'-CACCAAGCCAACTTTATGTCAGG-3'<br>5'-GGGAATCCTAAAGAAGGGCTCAT-3'  |
| Hprt1     | 5'-GCAGTACAGCCCCAAAATGG-3'<br>5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'     |
| Ift88     | 5'-AATGAGGGAACAGCGCATAAAAT-3'<br>5'-TTCATCAGCAAAAATCATCCTCGT-3' |
| KLF4      | 5'-GCGGGAAGGGAGAAGACACT-3'<br>5'-GGTCGTTGAACTCCTCGGGTCT-3'      |
| Ptch1     | 5'-AGCCCCTAACAAAAATTCAACCA-3'<br>5'-CCCTGTCTTCATTCCAGTTGATG-3'  |
| Sp7       | 5'-CCACTGGCTCCTCGGTTCT-3'<br>5'-GTCCCGCAGAGGGCTAGAG-3'          |
| Ubiquitin | 5'-CGGTCTTTCTGTGAGGGTGT-3'<br>5'-TCACTGGGCTCCACCTCTA-3'         |

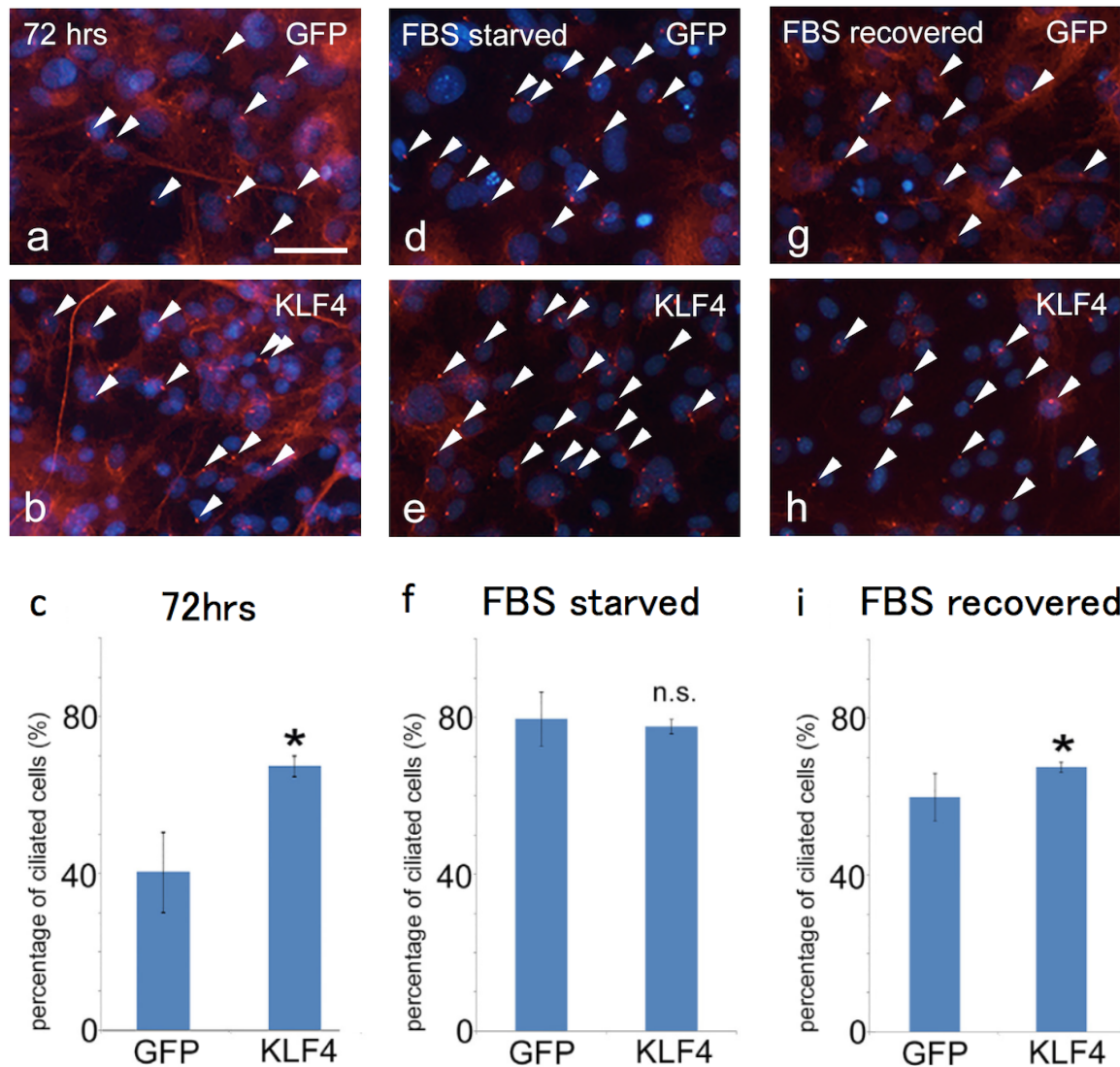


Fig. 1; KLF4 の骨芽細胞における一次繊毛形成に対する作用

(a, b, d, e, g, h) 初代骨芽細胞に GFP (a, d, g) もしくは KLF4 (b, e, h) を発現させ、培地を変えずに 72 時間培養を行った免疫染色像 (a, b; 72hrs), 24 時間無血清培地で培養した免疫染色像 (d, e; FBS starved), 21 時間無血清培地で培養後、3 時間血清添加培地に変えて培養した免疫染色像 (g, h; FBS recovered). 抗アセチル化チューブリン抗体による一次繊毛の染色 (赤色蛍光), DAPI による核染色 (青色蛍光). 矢頭は代表的な一次繊毛の染色像を示す. スケールバー; 200 $\mu$ m.

(c, f, i) 各培養条件における GFP もしくは KLF4 を発現させた骨芽細胞の一次繊毛を有する細胞の割合.

\* $P < 0.05$ , n.s.; 有意差なし.

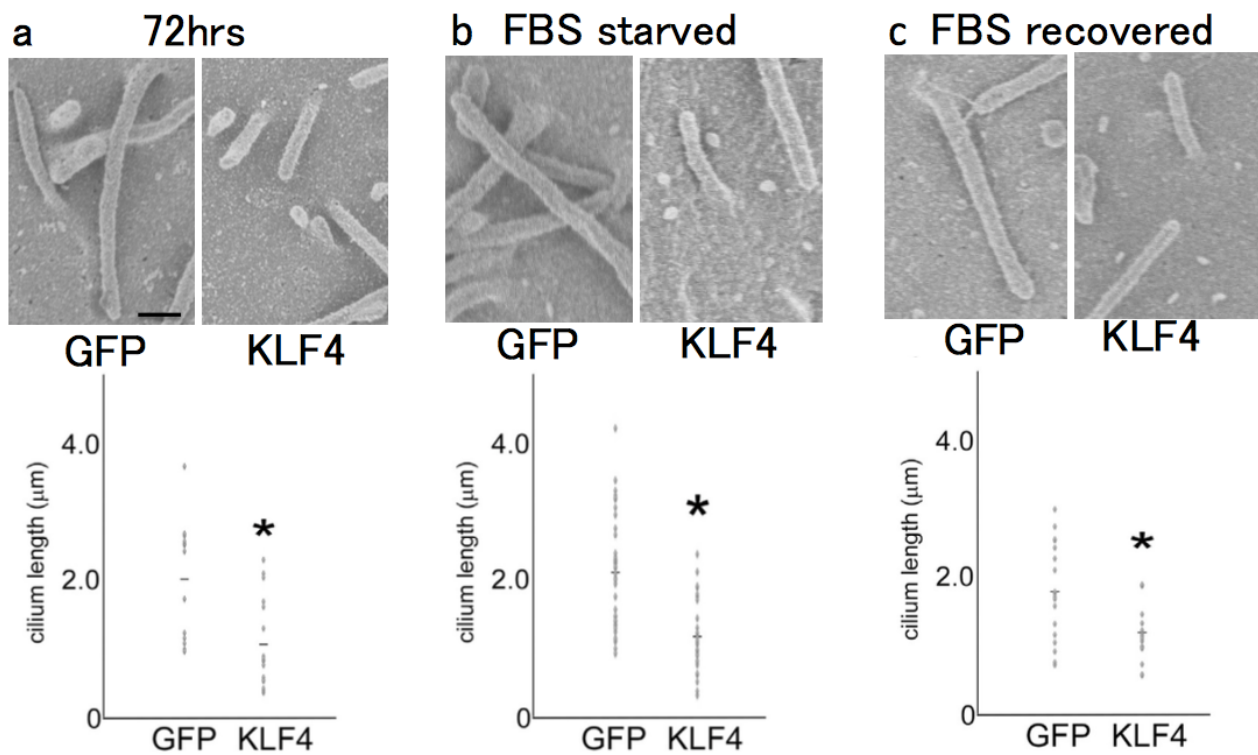


Fig. 2; KLF4 の骨芽細胞における一次繊毛の長さに対する作用

(a, b, c 上図) 各培養条件における GFP もしくは KLF4 を発現させた骨芽細胞の SEM 画像.

(a, b, c 下図) 各培養条件における SEM 画像から計測した一次繊毛の長さ.

KLF4 ではいずれの培養条件においても一次繊毛の長さが有意に短くなっている. \* $P<0.05$ . スケールバー;  $0.5\mu\text{m}$ .

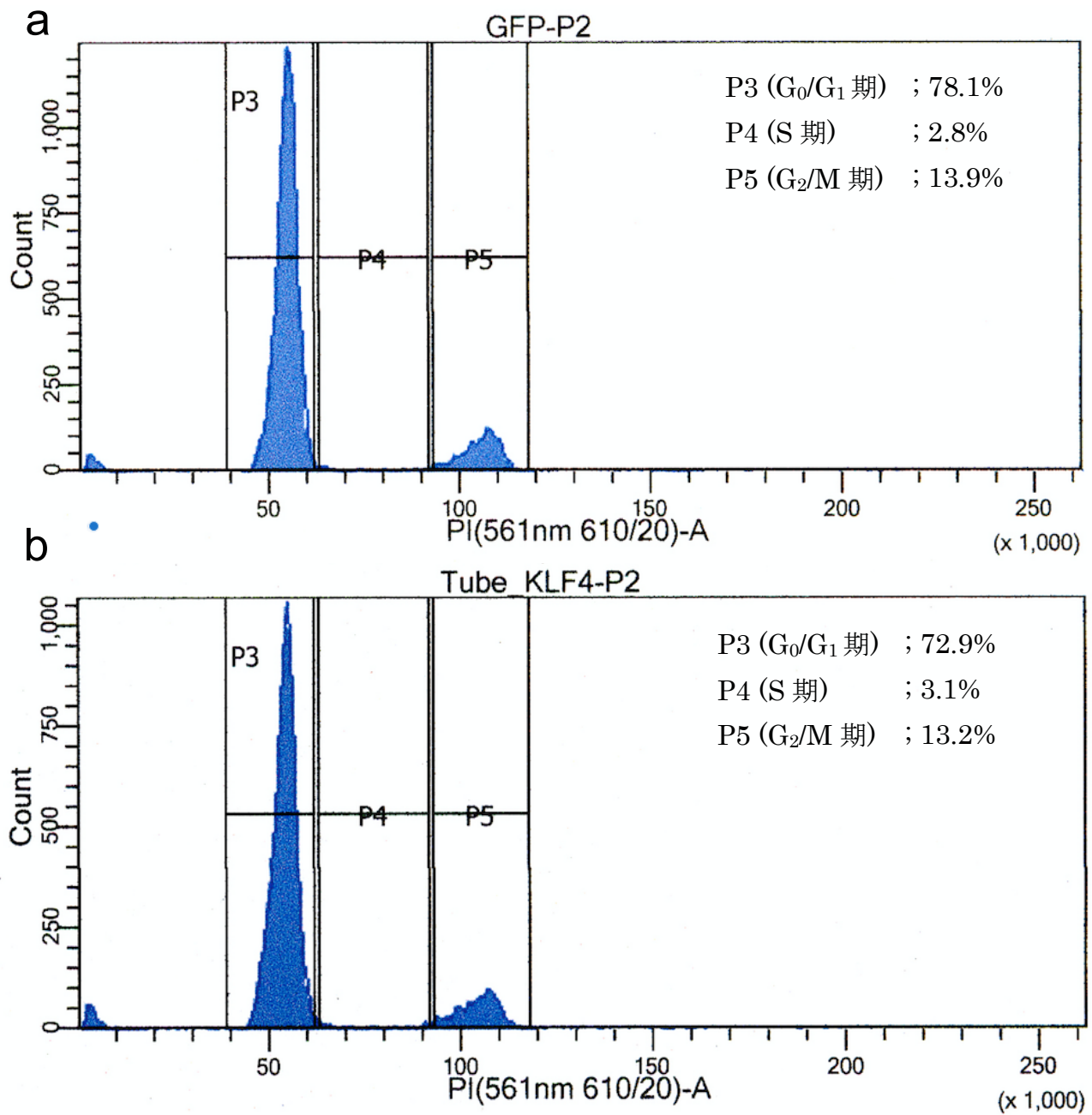


Fig. 3; KLF4 の骨芽細胞における細胞周期への作用

GFP (a) もしくは KLF4 (b) を発現した骨芽細胞の細胞周期を反映したヒストグラム。横軸は蛍光強度、縦軸は蛍光強度毎の細胞数を表す。また、P3, P4, P5 はそれぞれ G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, S 期, G<sub>2</sub>/M 期を示しており、ヒストグラム中の各パーセンテージはゲーティングによって選別された骨芽細胞中における各周期毎の細胞の割合を示す。KLF4 による骨芽細胞の細胞周期への大きな影響は見られない。

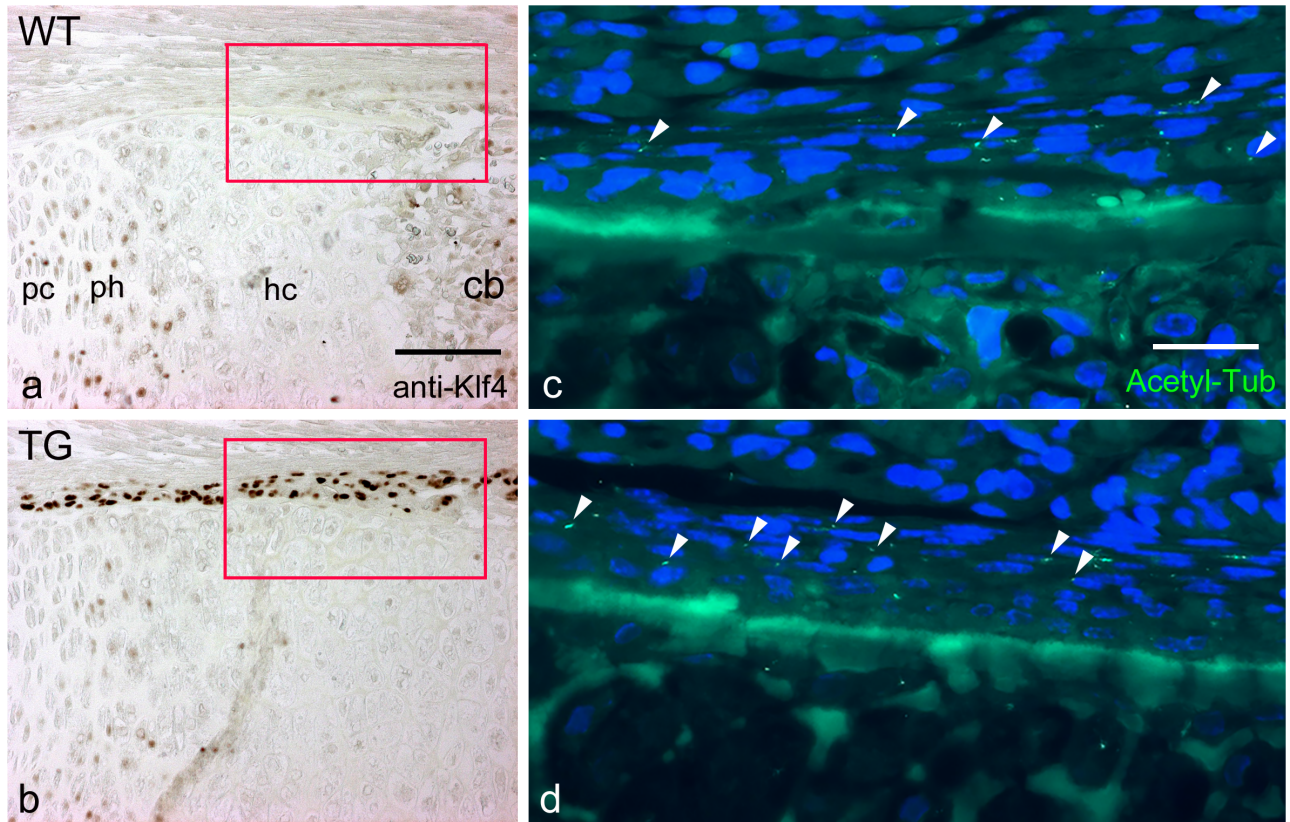


Fig. 4; *Coll1a1-Klf4* トランスジェニックマウスの上腕骨骨膜における一次繊毛の免疫染色像

胎生 16.5 日齢野生型マウス (a, c) とトランスジェニックマウス (b, d) の上腕骨骨膜での抗 KLF4 抗体 (a, b; 茶褐色), 抗アセチル化チューブリン抗体 (c, d; 緑色蛍光)による免疫染色画像. (c, d) は(a, b) の近接する切片で, 赤枠付近を強拡大したものである. DAPI による核染色 (青色蛍光). 矢頭は代表的な一次繊毛の染色像を示す. 一次繊毛を形成する骨芽細胞の割合が有意に増加している. pc; 増殖軟骨細胞層, ph; 前肥大軟骨細胞層, hc; 肥大軟骨細胞層, cb; 海綿骨. スケールバー; 200 $\mu$ m (a), 100 $\mu$ m (b)

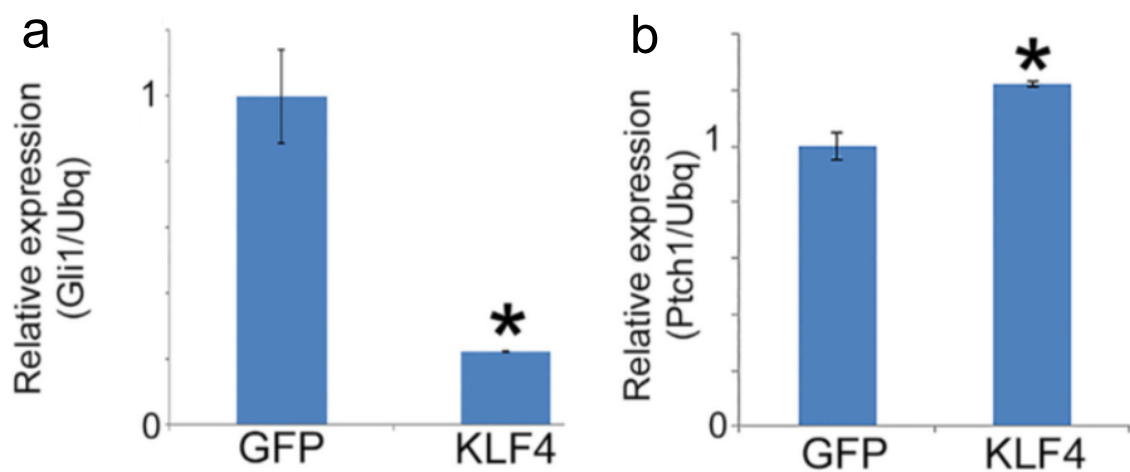


Fig. 5; KLF4による骨芽細胞における *Gli1* および *Ptch1* の遺伝子発現に対する作用

GFP もしくは KLF4 を発現させた骨芽細胞におけるコンフルエント 3 日目のサンプルから RNA を抽出、逆転写後、*Gli1* (a) および *Ptch1* (b) の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて測定した。KLF4 により、*Gli1* の発現は有意に低下し、*Ptch1* の発現は緩徐だが有意に増加している。\*P<0.05.

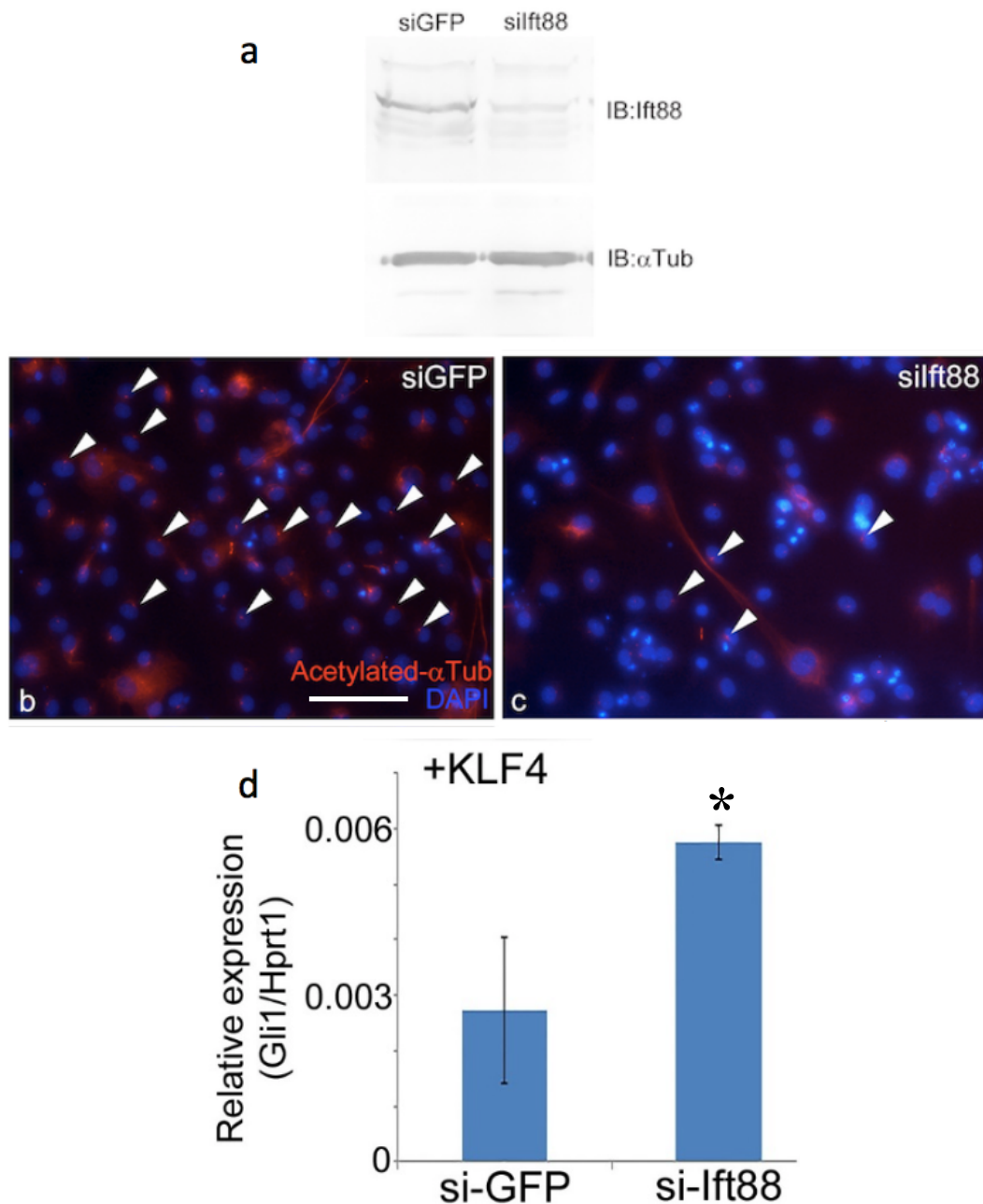


Fig. 6; 骨芽細胞で一次繊毛の形成を阻害したときの KLF4 による *Gli1* の遺伝子発現に対する作用

骨芽細胞に KLF4 を発現させ、コントロールとして GFP に対する siRNA もしくは siIf88 をトランスフェクションした。

(a) 上記の骨芽細胞からタンパクを抽出し、抗 Ift88 抗体を用いたウェスタンブロッティングによるタンパクの発現を確認した。(b, c) 上記の細胞の免疫染色画像。抗アセチル化チューブリン抗体による一次繊毛の染色 (赤色蛍光), DAPI による核染色 (青色蛍光)。矢頭は代表的な一次繊毛の染色像を示す。\* $P < 0.05$ 。

(d) 上記の細胞を用いて、*Gli1* の相対的遺伝子発現をリアルタイム PCR にて測定した。一次繊毛の消失に伴い、*Gli1* の遺伝子発現に対する KLF4 の作用が打ち消されている。スケールバー; 200 $\mu$ m。

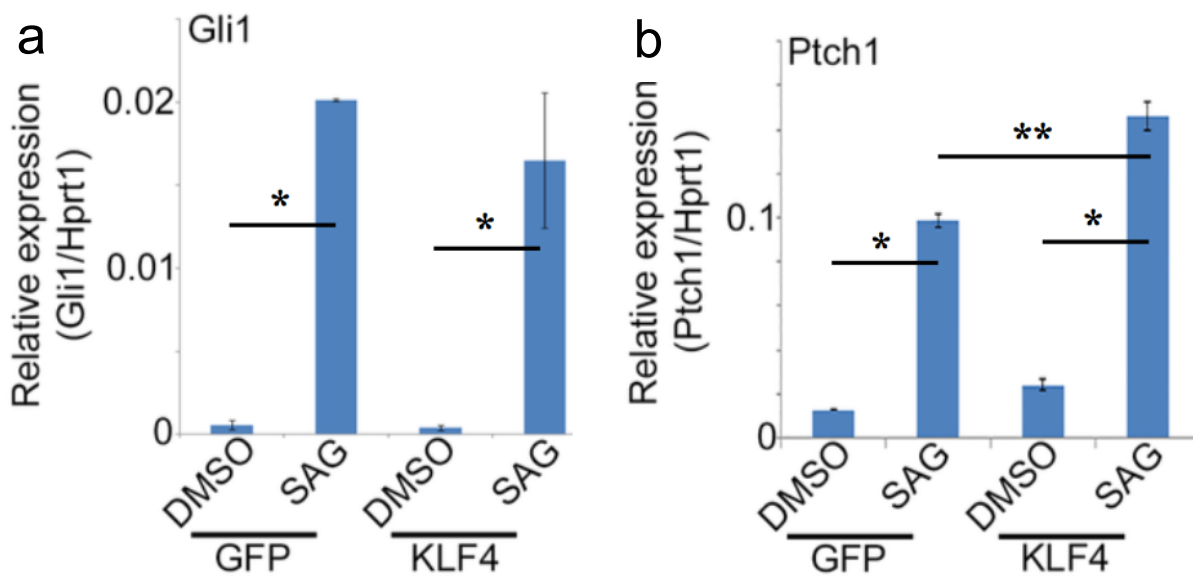


Fig. 7; KLF4 による骨芽細胞における SMO アゴニスト (SAG) の *Gli1* および *Ptch1* の遺伝子発現に対する作用

GFP もしくは KLF4 を発現させた培養骨芽細胞にコントロールとしてジメチルスルホキシド (DMSO) もしくは SAG を添加した後に, *Gli1* (a) および *Ptch1* (b) の相対的遺伝子発現をリアルタイム PCR にて測定した. GFP および KLF4 を発現させた骨芽細胞ともに, SAG による *Gli1*, *Ptch1* の発現誘導が見られる.

\*P<0.05.

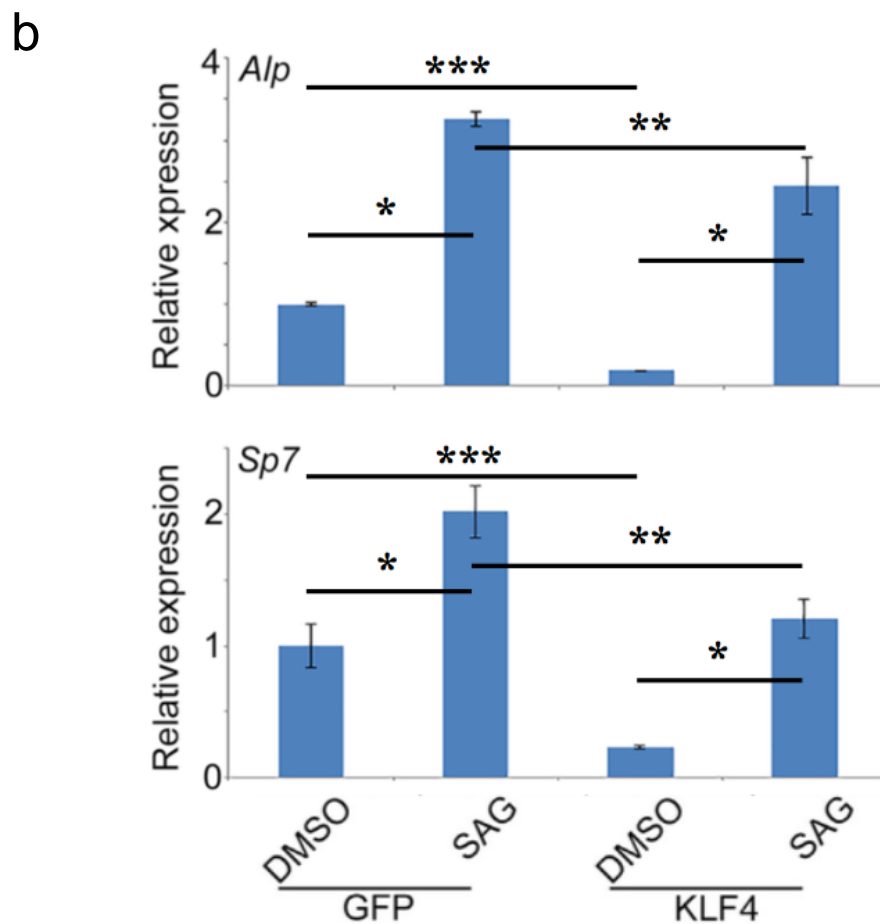
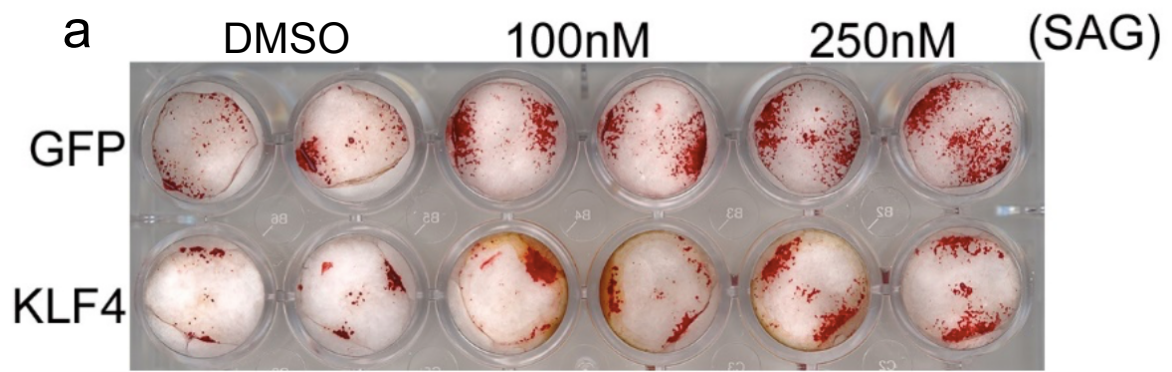
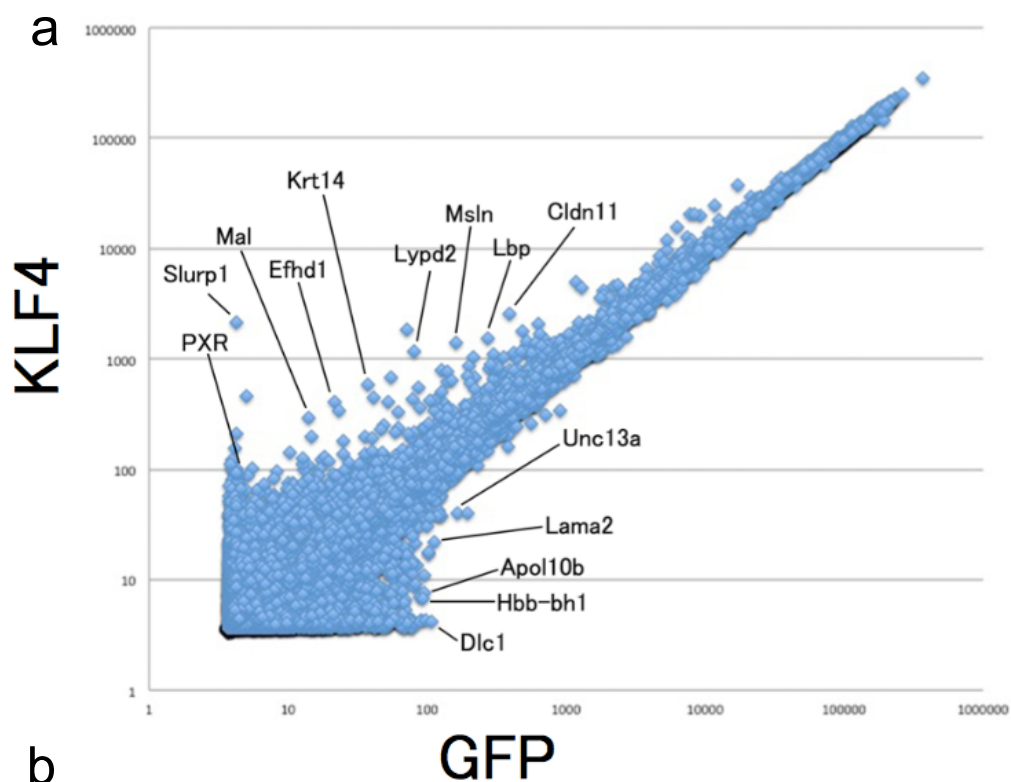


Fig. 8; KLF4 を発現させた骨芽細胞に対する SAG の作用

骨芽細胞に GFP もしくは KLF4 を発現させた後に、DMSO もしくは 100nM, 250nM SAG を培地交換の時に同時に添加した. (a) 各骨芽細胞のコンフルエント後 9 日目のアリザリンレッド染色像. (b) 同様に培養した骨芽細胞 (SAG は 250nM となるように添加) から RNA を抽出、逆転写後、アルカリホスファターゼ (*Alp*) および *Sp7* の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて測定した. KLF4 の発現による骨芽細胞の石灰化の抑制は SAG 添加により回復している. 骨芽細胞遺伝子発現に対しても、KLF4 によって抑制されていた遺伝子発現が SAG 添加により増加している. \* $P < 0.05$ .



**b**

Top10 enriched GO terms for differentially expressed genes

| Category | GO ID      | GO name                                        | Gene number | P-value                |
|----------|------------|------------------------------------------------|-------------|------------------------|
| CC       | GO:0005576 | extracellular region                           | 104         | $9.07 \times 10^{-06}$ |
| CC       | GO:0005886 | plasma membrane                                | 236         | $4.26 \times 10^{-05}$ |
| BP       | GO:0007155 | cell adhesion                                  | 38          | $4.39 \times 10^{-05}$ |
| MF       | GO:0005509 | calcium ion binding                            | 50          | $4.54 \times 10^{-05}$ |
| BP       | GO:0007268 | chemical synaptic transmission                 | 19          | $9.43 \times 10^{-05}$ |
| CC       | GO:0043204 | perikaryon                                     | 16          | $6.90 \times 10^{-04}$ |
| MF       | GO:0071558 | histone demethylase activity (H3-K27 specific) | 4           | $1.06 \times 10^{-03}$ |
| CC       | GO:0031225 | anchored component of membrane                 | 15          | $1.10 \times 10^{-03}$ |
| BP       | GO:0071557 | histone H3-K27 demethylation                   | 4           | $1.68 \times 10^{-03}$ |
| BP       | GO:0007186 | G-protein coupled receptor signaling pathway   | 87          | $3.45 \times 10^{-03}$ |

GO, Gene Ontology; CC, cellular component; MF, molecular function; BP, biological process.

Fig. 9; KLF4 を発現させた骨芽細胞における遺伝子発現変化の解析

GFP もしくは KLF4 を発現させた骨芽細胞からコンフルエント 2 日後に RNA を抽出, 蛍光標識された cRNA を合成後, マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った. (a) GFP を発現させた骨芽細胞に対して, KLF4 を発現させた骨芽細胞の発現変動を示したスキャタープロット. (b) 発現変動を示す遺伝子群の KEGG を用いたパスウェイ解析結果.

*PXR*; Pregnane X receptor, *Slurp1*; Secreted Ly-6/uPAR-related protein1, *Mal*; Myelin and lymphocyte protein, *Efh1*; EF-hand domain-containing protein D1, *Krt14*; Keratin14, *Lypd2*; LY6/PLAUR domain containing 2, *Msln*; Mesothelin, *Lbp*; Lipopolysaccharide binding protein, *Cldn11*; Claudin 11, *Unc13a*; Unc-13 homolog A, *Lama2*; Laminin subunit alpha 2, *Apol10b*; Apolipoprotein L 10B, *Hbb-bh1*; Hemoglobin Z, beta-like embryonic chain, *Dlc1*; Deleted in liver cancer 1

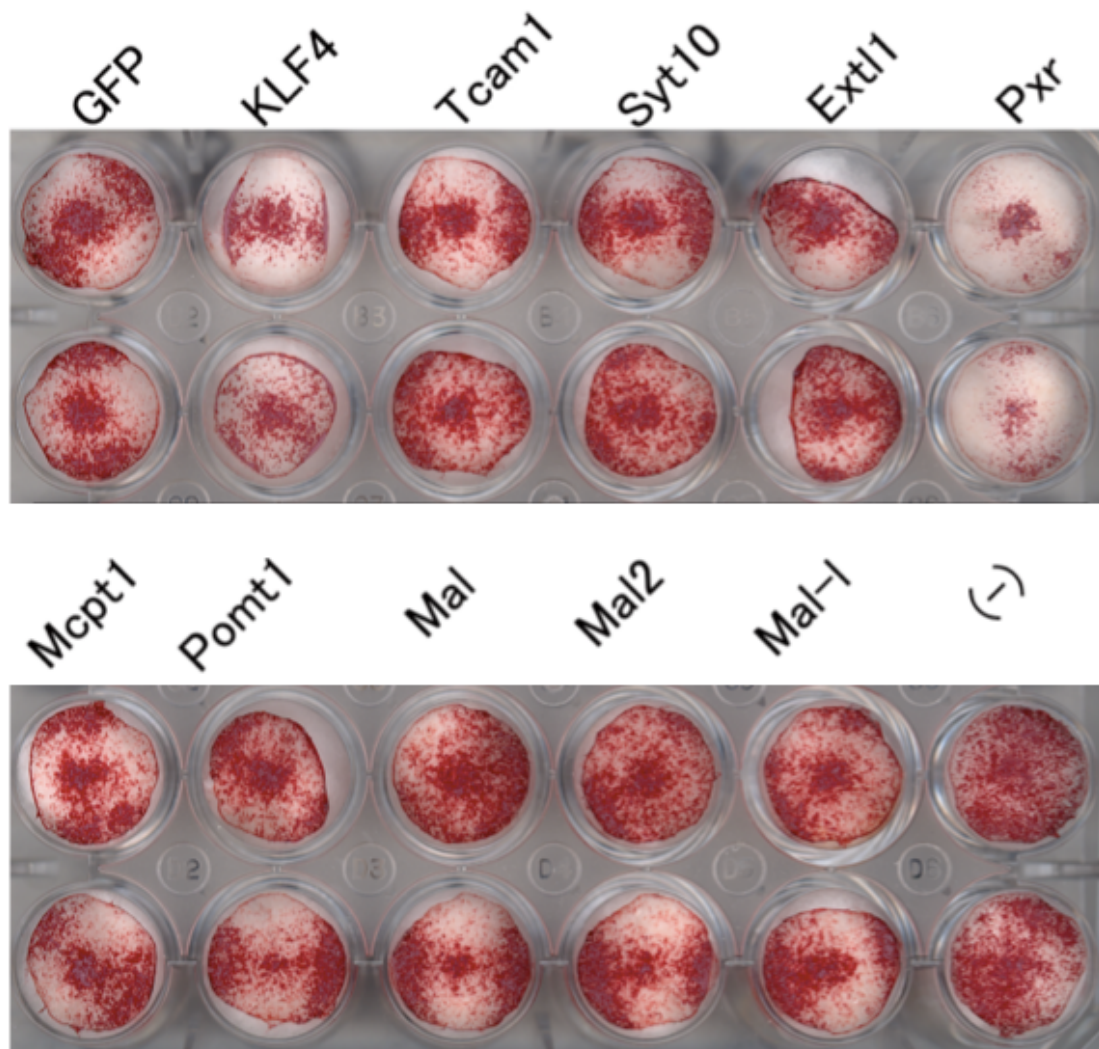


Fig. 10; マイクロアレイにより見出された因子の骨芽細胞の石灰化への作用

マイクロアレイによって見出された因子を発現させた各骨芽細胞のコンフルエント後 9 日目のアリザリンレッド染色像. 上下に示した因子は全て同様の手法にて培養を行った. KLF4 の発現による作用と同様に, Pxr の発現により骨芽細胞の石灰化が顕著に抑制されている. Tcam1; testicular cell adhesion molecule1, Syt10; Synaptotagmin 10, Extl1; Exostosin Like Glycosyltransferase 1, Pxr; Pregnane X receptor, Mcpt1; Mast cell protease 1, Pomt1; Protein O-mannosyltransferase 1, Mal; Myelin and lymphocyte protein

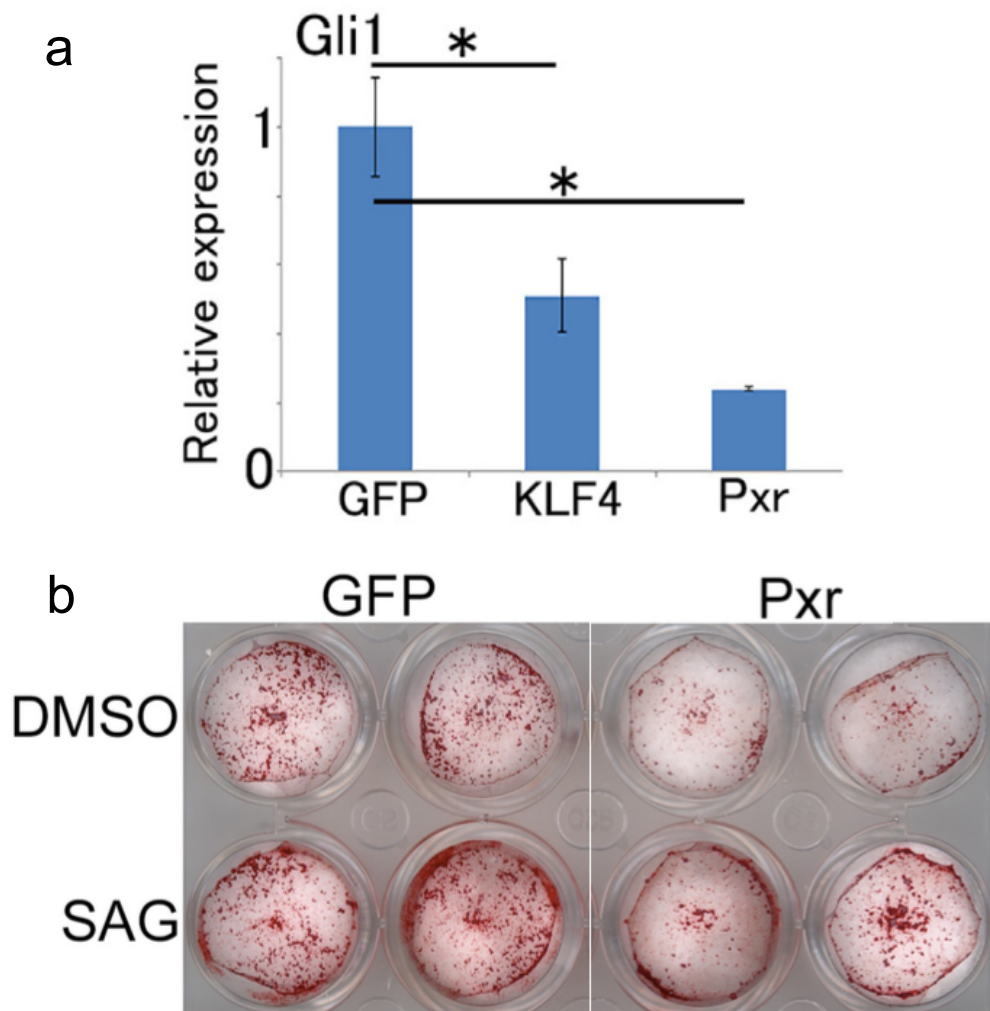


Fig. 11; Pxr を発現させた骨芽細胞に対する SAG の作用

(a) GFP, KLF4 もしくは Pxr を発現させた骨芽細胞を用いて, *Gli1* の遺伝子発現をリアルタイム PCR にて測定した. \* $P < 0.05$ . (b) GFP もしくは Pxr を発現させた骨芽細胞のコンフルエント後 9 日目のアリザリンレッド染色像. SAG 添加に伴い, Pxr による骨芽細胞石灰化の抑制が回復している.

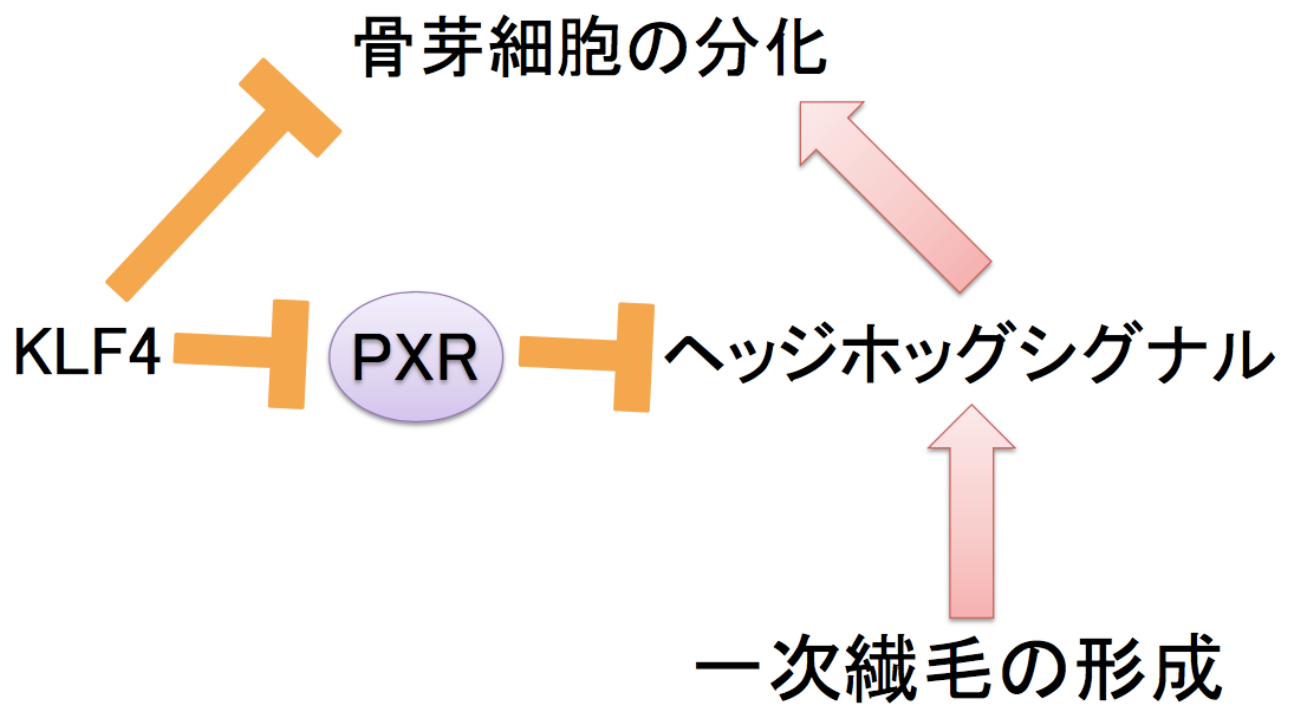


Fig. 12; KLF4 による骨芽細胞分化への作用

KLF4 は一部の一次繊毛を介在するヘッジホッグシグナルを抑制することで、骨芽細胞の分化を抑制している。また, Pxr は, KLF4 の下流でヘッジホッグシグナルを抑制している可能性がある。