

審査の結果の要旨

氏名 山川 晃

本研究は、軟骨内骨化において骨芽細胞前駆細胞の運命決定に重要な役割を果たしている Indian hedgehog (Ihh) の発現制御機構を明らかにするため、ゲノムワイド解析、分子生物学的解析、マウス遺伝学的解析を通じて、軟骨細胞における *Ihh* 発現制御に関する遠位エンハンサーを探索・同定し、その活性化機構の解明を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウス新生仔肋軟骨細胞における *Ihh* 遺伝子周辺のヒストン修飾状態をクロマチン免疫沈降 (ChIP) シークエンスにより解析し、*Ihh* 遺伝子上流 100 kb に渡り 5 か所の候補エンハンサー領域を同定した。
2. マウス新生仔肋軟骨細胞を用いた *in vitro* のレポーターアッセイの結果、5 か所の候補エンハンサー領域のうちで候補エンハンサーA が最も強いエンハンサー活性を有することが示された。
3. LacZ レポータートランスジェニックマウスを用いた *in vivo* でのエンハンサー活性の検討により、候補エンハンサーA は胎生期において軟骨細胞特異的な *Ihh* 遺伝子のエンハンサーである可能性が示された。
4. Sox9 がエンハンサーA の Sox ダイマーモチーフを介して DNA に直接結合することが、マウス新生仔肋軟骨細胞を用いた Sox9 の ChIP シークエンスデータの解析と EMSA により示された。
5. ATDC5 細胞を用いた *in vitro* のレポーターアッセイの結果、エンハンサーA が Sox trio (Sox5/6/9) 反応性に活性化することが示された。
6. マウス新生仔肋軟骨細胞を用いて取得した Sox6 の ChIP シークエンスデータの解析から、Sox6 がエンハンサーA に作用することが示されたが、エンハンサーA には既知の Sox モノマーモチーフは確認されなかった。このことから、エンハンサーA においては、Sox6 は従来考えられていた Sox モノマーモチーフを介する様式とは異なる様式で作用することが示唆された。
7. CRISPR/Cas9 システムを用いてエンハンサーA 欠失マウスを作出し、胎生 18.5 日において組織学的解析と肋軟骨細胞における *Ihh* の mRNA 発現の評価を行った結果、エンハンサーA 単独の欠失が *Ihh* 遺伝子発現へ与える影響はわずかであった。このことから、*Ihh* の発現制御においては、複数のエンハンサーによって各々の機能を

補完しあうエンハンサーネットワークが存在することが示唆された。

以上、本論文は *Ihh* の発現制御に関与する軟骨細胞特異的な遠位エンハンサーを同定し、その活性化機構に関しては、軟骨形成のマスター転写因子である Sox9 が Sox6 と協調してエンハンサーの活性化を行っていることを明らかにした。本研究は、軟骨細胞における *Ihh* の発現制御機構の解明に重要な貢献をなすばかりでなく、Sox9 と Sox6 の作動様式の解明につながると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。