

博士論文（要約）

軟骨細胞特異的な Indian hedgehog のエンハンサーの同定と
活性化機構に関する検討

山川 晃

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨細胞特異的な Indian hedgehog のエンハンサーの同定と

活性化機構に関する検討

山川 晃

骨の形成過程は、軟骨内骨化と膜性骨化に分けられる。膜性骨化は、胎生期に未分化間葉系細胞が骨芽細胞へと分化することで骨組織を形成する過程で、頭蓋骨と顎顔面骨の一部、および鎖骨の形成に関与している。一方、軟骨内骨化では間葉系細胞凝集に続いて軟骨分化と軟骨原基の形成が起こり、その後、軟骨細胞の増殖と分化の過程を経て骨組織へと置換される過程で、体幹や四肢の長管骨の形成に関与している。組織学的にみると、長管骨の骨端から骨幹端にかけて、軟骨細胞は、増殖軟骨細胞、前肥大軟骨細胞、肥大軟骨細胞とそれぞれの分化段階にある細胞群を形成して層状に配列している。これらの軟骨内骨化においてみられる軟骨細胞の増殖と分化や細胞外基質の産生は、様々なシグナル・転写因子の協調的な作用によって制御されていることが明らかになってきた。

軟骨内骨化に必須なシグナルの一つとしてはヘッジホッグシグナルが挙げられる。ヘッジホッグシグナル経路は種を越えて高度に保存され、細胞の運命決定や器官形成などさまざまな機能を担っていることが明らかにされてきた。脊椎動物では *Desert hedgehog (Dhh)*、*Sonic hedgehog (Shh)*、*Indian hedgehog (Ihh)* の 3 つの遺伝子が同定されており、これら 3 つのヘッジホッグリガンドが生体内において異なる発現領域と生理作用を有していることが確認されている。*Ihh* は胎生期の腎臓、消化管の他に、軟骨内骨化において前肥大軟骨細胞および肥大軟骨細胞に強く発現が認められる。*Ihh* が発生段階において四肢と骨殻の形成に重要な役割を果たしていることや *Ihh*-PTHrP 経路が軟骨内骨化に対してネガティブフィードバックループを形成して長管骨の伸長を制御していることが、マウスを用いた解析により明らかとなった。さらに、Hh シグナルの標的遺伝子である *Ptch1* と *Gli1* が、増殖軟骨細胞、軟骨膜細胞、一次海綿骨中の細胞において活性化していることから、前肥大軟骨細胞および肥大軟骨細胞から分泌される *Ihh* が軟骨内骨化において、軟骨細胞の増殖と分化、軟骨膜や一次骨化中心における骨

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と考えられている。

また *Ihh* は、骨系統疾患の原因遺伝子であることが知られている。*IHH* の遺伝子異常により発症する A1 型短指症や先端大腿骨頭異形成は、*Ihh* のアミノ酸変異に伴うタンパク質の機能異常により発症することから、ヒトにおいても骨格形成に *Ihh* が重要な役割を果たしていると考えられている。さらに、ゲノム上の *IHH* 遺伝子上流の Copy Number Variation (CNV) により頭蓋形成異常や合指症が発症することも報告されている。これらの疾患において重複が起きているゲノム領域は、種間で保存されたノンコーディング DNA 領域であることが確認されている。さらに、レポーターマウスを用いた解析から、CNV により *Ihh* 遺伝子の発現制御機構に異常をきたしたことが疾患の原因であることが示唆されている。

以上のように、骨発生および骨系統疾患における *Ihh* の寄与は広く知られているものの、その発現制御機構は十分に明らかになっていない。*Ihh* の発現制御機構の解明は、骨発生の分子メカニズムの解明と *Ihh* と関連する骨系統疾患の発生機序の理解に重要であると考えられる。

現在までに、軟骨細胞における *Ihh* の発現制御機構に関しては、*Ihh* 遺伝子近傍のプロモーター領域に着目した *in vitro* 解析に関する報告があるものの、遠位エンハンサーを含むゲノムワイドな解析については報告がない。そこで、本研究では、ゲノムワイドな解析により得られたデータに基づき、分子生物学・マウス遺伝学解析を通じて、軟骨細胞における *Ihh* 発現制御領域を遠位エンハンサーを含めて探索・同定し、その活性化機構を解明することを目標とした。

まず、マウス新生仔肋軟骨細胞における H3K4me2 と H3K36me3 の ChIP シークエンスデータの解析を行い、ゲノム上の *Ihh* 遺伝子周辺におけるこれら 2 種類のヒストン修飾状態を検証した。今回の研究では、*Ihh* 遺伝子上流 100 kb に関して検討を行い、*Ihh* 遺伝子の発現制御に関与する可能性がある候補エンハンサー領域を網羅的に抽出した。その結果、*Ihh* 遺伝子領域に転写領域を示唆する H3K36me3 のピークを認めたことから、解析に用いたマウス新生仔肋軟骨細胞では、実際に *Ihh* 遺伝子の転写が行われていることが示唆された。また *Ihh* 遺伝子上流 100 kb に渡って、エンハンサーの指標となる H3K4me2 のピークを伴う 5 つの領域 (遠位から順に A、B、C、D、E とする) を同定した。これらの 5 か所の候補エンハンサー領域のエンハンサー活性を、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により評価すると、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唆された。

次に、候補エンハンサーAの活性の *in vivo* における組織特異性を検証する目的で、LacZ レポータートランスジェニックマウスを作出し、解析を行った。まず胎生 (E)16.5 において whole mount X-gal 染色を用いた G0 LacZ レポータートランスジェニックマウス解析を行い、全身における候補エンハンサーAの活性化領域とトランスジェニックマウスの個体間での発現パターンの再現性を検証した。その結果、9匹のトランスジェニックマウスの whole mount X-gal 染色において、9匹中6匹で全身の長管骨における限局した活性を認めた。さらに、ライン化に成功した LacZ レポータートランスジェニックマウスを用いて、候補エンハンサーAの骨組織での活性化領域の組織学的検討と、*Ihh* の発現が報告されている他臓器における活性の評価を行った。その結果、候補エンハンサーAが長管骨の前肥大軟骨細胞を中心に *Ihh* 発現領域とほぼ一致した活性を示すことを確認した。さらに、E16.5で *Ihh* の発現が報告されている腸管、肝臓、腎臓、胃における LacZ 活性を組織所見で確認すると、すべての臓器で活性を認めなかった。以上の結果より、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として働くことが示唆されたため、次にエンハンサーAの活性化機構に関して検討を行った。

Sox9は軟骨凝集や軟骨分化の早期の過程において重要な転写因子であるばかりでなく、肥大軟骨細胞の形成に促進的に関与していることも明らかになってきた。また、Ohbaらは、ゲノムワイドな手法を用いて軟骨細胞における Sox9の作動様式を検討した結果、Sox9は遠位エンハンサーにおいて Sox ダイマーモチーフを介して DNA に結合し軟骨関連遺伝子の転写制御に関与することを示している。Ohbaらの報告した Sox9の ChIP シークエンスデータを解析すると、エンハンサーAに Sox9結合を示すピークを認めるとともに、中央部に Sox ダイマーモチーフが存在することも確認された。これらの結果から、Sox9がエンハンサーAの活性化を介して、前肥大軟骨細胞および肥大軟骨細胞において発現する *Ihh* の転写制御に関与している可能性に着目した。軟骨細胞において Sox9は Sox5/6と協調して標的遺伝子の転写制御を行うことが報告されていることから、*in vitro* のレポーターアッセイと EMSA により、Sox trio (Sox5/6/9)によるエンハンサーAの活性化機構を検証した。その結果、①エンハンサーAの活性化には Sox trioが関与すること、②Sox9はエンハンサーAの中央部に位置する Sox ダイマーモチーフに直接結合することが示唆された。さらに、マウス新生仔肋軟骨細

胞を用いて新たに取得した Sox6 の ChIP シークエンスデータの解析を行った結果、エンハンサーA において Sox6 のピークも認められたことから、Sox6 と Sox9 は共にエンハンサーA に作用することが示唆された。以上の一連のゲノムワイド解析により得られた結果は、エンハンサーA の活性制御に Sox trio が関与している可能性を支持するものであった。最後に、Sox6 の ChIP シークエンスデータにおけるモチーフ解析で得られた Sox モノマーモチーフをゲノムにマッピングした結果、エンハンサーA には Sox モノマーモチーフは存在しなかった。Sox6 の作動様式に関して、Sox モノマーモチーフに作用し Sox9 と協調して転写制御を行うことが報告されている。したがって、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作用様式とは異なる様式で作用する可能性が示唆された。

今回同定したエンハンサーA の胎生期における *Ihh* 遺伝子発現への寄与をマウスモデルにおいて検証するため、CRISPR/Cas9 を用いてエンハンサーA を欠失したマウスを作出し、組織学的解析と *Ihh* の mRNA 発現の評価を行った。その結果、胎生期におけるエンハンサー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。

以上の一連の研究結果より、エンハンサーA が、*Ihh* 遺伝子の発現に関わる軟骨細胞特異的エンハンサーであることが示唆された。さらに、Sox9 はダイマーモチーフを介した DNA への直接的な結合により、Sox6 は従来提唱されている作動様式とは異なる機序により、エンハンサーA を活性化すると考えられた。また、エンハンサーA の関与に加えて、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 *Ihh* の発現を制御することも示唆された。