

審査の結果の要旨

氏名 北條 宏徳

本研究は骨格形成において重要な役割を演じていると考えられるヘッジホッグ (Hh) /Gli シグナルのシグナルネットワークおよびメカニズムを明らかとするため、新規器官培養系、*in vitro* 解析および *in vivo* 解析により、軟骨膜における骨・軟骨分化決定制御機構における Hh の作用点および分化決定メカニズムの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 生理的な骨殻形成を *in vitro* で再現できる新規器官培養系を確立した。
2. 1.の系を用いることで、軟骨膜における骨・軟骨前駆細胞の分化決定における Hh, BMP, Wnt シグナルの役割およびシグナルネットワークが明らかになった。
 - ┆ Hh シグナルによる骨殻形成促進効果には初期の一過的な刺激が必要であった。
 - ┆ 骨芽細胞への分化決定機構において、Wnt シグナルは、Hh シグナルにより分化の方向が規定された細胞群の細胞運命を、変更することができなかった。
 - ┆ BMP シグナルは Hh シグナルと協調的にはたらくことで、はじめて、軟骨内骨化機構における骨形成を促進した。
 - ┆ 軟骨細胞への分化決定機構においても、Wnt シグナルは、Hh シグナルにより分化の方向が規定された細胞群の細胞運命を、変更することができなかった。
 - ┆ BMP シグナルは、Hh シグナルの阻害により現れる異所性軟骨細胞の分化・増殖を促進した。
3. Gli1 および Gli3 は Hh シグナル反応性であるのに対して、Gli2 は Hh シグナルには反応しなかった。
4. Gli1 は骨・軟骨前駆細胞の分化決定を制御した。
 - ┆ *in vitro* 解析において、Gli1 は骨芽細胞の分化を促進し、軟骨細胞の分化を抑制した。
 - ┆ *Gli1*^{-/-} マウス胎児において骨殻の形成不全および軟骨膜における異所性軟骨細胞を確認した。
5. 骨芽細胞および軟骨細胞分化マーカーの転写制御領域において Gli 結合領域 (GBR) を同定した。
 - ┆ Gli1 は Alp および Bsp プロモーター上の特定の配列に結合し、Alp および Bsp 発現を促進した。
 - ┆ Gli1 は Col2a1 エンハンサー上の特定の領域に結合することで、Sox9 の DNA 結合阻害を介して、Sox9 による Col2a1 発現を抑制した。
6. 軟骨膜における骨・軟骨分化決定において Gli1 と Gli2 には遺伝学的重複が存在するも

の、異なる機能を持つことが示唆された。Gli1 は Hh シグナルに応答し、Hh シグナルによる骨・軟骨分化決定制御における主要因子としてはたらくことが考えられた。一方、Gli2 は Hh シグナル非応答性であり、Gli2 の定常的な発現が Hh シグナルによる Gli1 発現誘導および Gli1 による骨・軟骨分化決定機構の両方に必要であることが考えられた。

以上、本論文では、Hh シグナルは軟骨膜における骨・軟骨前駆細胞の分化決定シグナルであり、Hh シグナル入力に反応して、Gli1 が骨芽細胞の分化誘導および軟骨細胞の分化抑制を制御している事が明らかになった。本研究で得られた知見は、器官形成における Hh シグナルの分子制御機構の解明につながるだけでなく、骨欠損や骨折などの骨疾患における新たな治療戦略の分子的基盤となるものと期待される。以上より本論文は学位の授与に値するものと考えられる。