

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06821

研究課題名(和文) Nager症候群における顎顔面形態異常の発生学的成因の解明

研究課題名(英文) Developmental etiology of craniofacial abnormalities in Nager syndrome

研究代表者

武智 正樹 (Takechi, Masaki)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10455355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR-Cas9システムを用いてSf3b4のノックアウトマウスを作成した。ホモ欠失マウスは胎生致死であったが、ヘテロ欠失マウスは野生型マウスと同様に出生し繁殖も可能であった。ヘテロ欠失マウスの胚発生を調べた結果、Sf3b4が中軸骨格の前後方向の形態パターンニングと前脳の形態形成に関与することを明らかにした。また、Sf3b4の共役因子Sf3b1について特異的阻害剤を用いて人為的に機能低下を作り出し、これらのスプライシング因子の頭部形態形成における役割を推察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋顎顔面の先天性形態異常は心疾患に次いで高頻度で認められるが、その原因については不明な点が多い。Nager症候群は近年新たに報告された先天性疾患であり、原因遺伝子であるSf3b4の分子機能は不明であった。本研究では疾患モデルマウスを作成、解析することでSf3b4の機能の一端を明らかにし、原著論文として報告することができた。これらの結果は、Nager症候群の治療法や予防法の確立に大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Sf3b4 knockout mice were generated using the CRISPR-Cas9 system. Homozygous mice were embryonic lethal, whereas heterozygous mice were born and reproduced as well as wild-type mice. The embryonic development of the heterozygous mice revealed that Sf3b4 is involved in the anteroposterior morphological patterning of the axial skeleton and in the morphogenesis of the forebrain. We also artificially induced loss of function of Sf3b4's coactivator, Sf3b1, using specific inhibitors and inferred a role for these splicing factors in craniofacial morphogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：Nager症候群 スプライシング スプライソソーム Sf3b4 Sf3b1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト顎顔面の先天性奇形は心臓疾患と並んで高頻度で認められ、上下顎や耳小骨の形成不全に伴い、咀嚼や嚥下、難聴などの身体機能に大きな影響が生じる。近年のゲノム解析技術の急速な進歩によるヒト顎顔面の形態異常の原因遺伝子の中にはこれまで胚発生とは関係性が低いとされてきたものも多い。スプライシングを担うスプライソソームは、異なるタンパク質群から成る5つのユニット(U1, U2, U5, U4/U6)と、各ユニット共通のタンパク質(sm, EJCタンパク質)からなる巨大なリボ核酸タンパク質である。この構成要素のうち、5つのタンパク質をコードする遺伝子(SF3B4, EFTUD2, SNRPB, TXNL4A, EIF4A3)の変異により顎顔面の形態異常が生じることが明らかにされ、スプライソソーム症と命名された(Lehalle et al., 2015)。U2 snRNPはSF3aとSF3bを含み、それぞれスプライシング活性部位の形成、イントロン除去の起点の認識に重要である。SF3b複合体を構成するSF3b4はこの起点近傍に結合し、U2 snRNPをこの部位に誘導する。ヒトSF3B4の遺伝子変異による機能低下は、スプライソソーム症の一つであるNager症候群の主要原因とされ、橈骨の低形成と下顎骨・頬骨の低形成を主徴とする(Bernier et al., 2012)。従来、スプライソソームの構成要素はどの細胞にもユビキタスに発現し、細胞の基本的機能を担うとされてきたが、このような近年の研究によりスプライソソームの構成要素にスプライシング以外の新規の分子機能が示唆されるようになった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、スプライソソーム症の一つ、Nager症候群の発生学的成因を明らかにすることである。スプライソソーム症の発見により、これまで全身でユビキタスに発現・機能していると考えられてきた分子が、顎顔面の形態形成に特異的に関与することが示唆された。本研究により、既報とは全く異なる顎顔面の形態形成メカニズムが解明されることが期待されるため、学術的な意義は非常に大きい。

3. 研究の方法

(1) *Sf3b4* の時空間的発現プロファイルの解析

Nager症候群の原因遺伝子である*Sf3b4*について、マウス胎仔における時空間的発現プロファイルを用いたin situ hybridization法と定量PCR法により調べる。

(2) *Sf3b4* 全身ノックアウトマウスの作出と解析

CRISPR/Cas9(クローニングフリー法)によるゲノム編集により、*Sf3b4*ノックアウトを作出する。これらを掛け合わせてホモ欠失個体を得て、初期胚では神経堤細胞の出現、増殖や細胞死、軟骨細胞や骨芽細胞の分化状態をin situ hybridization法や定量PCR法による分子マーカーの発現解析や免疫組織化学染色等により調べる。後期胚では、頭蓋顎顔面の形態の表現型を検討するため、骨軟骨染色を行う。また固定した後期胚を薄切し、組織学的観察や種々の免疫組織化学染色を行う。

(3) *Sf3b4-flox* マウスの作出と解析

CRISPR/Cas9法により、*Sf3b4*のイントロン1と4の部位にloxP配列が挿入されたfloxマウスを作出する。すでに繁殖・維持しているWnt1-CreマウスやOsx-Creマウスと交配し、*Sf3b4*を神経堤細胞特異的あるいは骨芽細胞特異的にノックアウトしたマウス系統を得る。このマウス胚について、上記の全身ノックアウトマウスと同様の組織学的解析を行う。

(4) *Sf3b4* の共役因子である *Sf3b1* の機能抑制実験

*Sf3b4*の共役因子である*Sf3b1*の機能減弱を目的として、*SF3B1*の阻害剤を野生型妊娠マウスや*Sf3b4*ヘテロ欠失妊娠マウスに腹腔内投与し、胎児の頭蓋顎顔面形成への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) *Sf3b4* の時空間的発現プロファイルの解析

*Sf3b4*は胎齢9-10日胚では全身細胞で発現が認められたが、特に鰓弓や肢芽の間葉での発現量が比較的高く、心臓での発現量は低かった。胎齢13-15日胚においても全身での発現が見られ、特に脳や下顎骨での発現が顕著であった。また、マウスを含む複数の哺乳類において*Sf3b4*の偽遺伝子様配列(*Sf3b4-ps*)の存在を見出した。野生型マウス胚において*Sf3b4*は2細胞期以降全身に発現するが、特に頭蓋顔面骨形成部や脳に高発現していた。一方で、*Sf3b4-ps*は少なくとも受精後から胎齢10.5日目までは発現を認めなかった。

(2) *Sf3b4* 全身ノックアウトマウスの作出と解析

IVF(体外受精法)により*Sf3b4*ホモ欠失マウスは早期胎生致死であることを確認した。*Sf3b4*ヘテロ欠失マウスは正常に出生し、正常な繁殖能を示すまでに成長したが、野生型マウスと比較して体長が小さく、体重が有意に低下していた。*Sf3b4*ヘテロ欠失マウスでは*Sf3b4*の発現量が

半減したものの *Sf3b4^{ps}* の発現は誘導されず、偽遺伝子様配列による機能的補償は認められなかった。*Sf3b4^{+/-}* マウスでは頭蓋冠はやや扁平であったが、Nager 症候群を模倣する表現型は認めなかった。

Sf3b4^{+/-} マウス新生仔において、異所性の肋骨が第 7 頸椎に生じ、第 1 胸椎様の形態に変化していた。同様に第 1 胸椎が第 2 胸椎化、第 6 腰椎が第 1 仙骨化しており、全体として椎骨形態の後方化が認められた。椎骨形態の後方化は、*Sf3b1^{+/-}* マウス (Isono et al., 2005) に見られる表現型と酷似していた。SF3b1 や SF3b4 は Hox 遺伝子の抑制に関係するポリコーン群タンパク複合体 (PcG) と直接に相互作用することが示唆されている。したがって、この 2 つのスプライシング因子をふくむ SF3b 複合体が PcG に結合し、体節形成時の前後軸に沿った Hox 遺伝子の発現を制御する転写因子として機能する可能性を見いだした。一方で、ヒト培養細胞系においては *Sf3b4* が I 型コラーゲン等の効率的な翻訳に寄与するとされるものの、*Sf3b4^{+/-}* マウスでは骨形成能自体には影響は無かった。

Sf3b4^{+/-} マウス新生仔では野生型マウスと比較して骨の石灰化における差は見られず、頭頂骨の厚さも野生型と有意差はなかった。

Sf3b4^{+/-} マウス新生仔の前脳は野生型マウスと比較して小さく、頭蓋冠が扁平である要因と考えられた。しかし、ランドマーク法と主成分分析を用いて脳の形態測定を行ったところ、脳形態そのものには大きな影響は無く、*Sf3b4^{+/-}* マウスに行動異常がみられないことと整合的であった。胎齢 13.5 日において前脳脳室帯の細胞増殖の割合は *Sf3b4^{+/-}* マウスで有意に高かったが、細胞死の割合には有意差が無かった。軽度の小頭症は前脳の形成不全が原因であると考えられたが、脳形態自体には異常が無く、繁殖行動等が正常であることと整合的であった。スプライソソーム因子の一つである *Eftud2* のホモ変異を示すゼブラフィッシュでは神経上皮の細胞死により小脳症を示す (Lei et al., 2017)。しかし、本研究では *Sf3b4^{+/-}* マウスの前脳で細胞増殖は低下したが細胞死は有意に増加しなかったため、異なるメカニズムによって引き起こされたと考えられる。急激に成長する大脳半球の形成時は、リボソーム合成やスプライシング等の細胞維持機能が不安定化することに対して高い感受性を示すことが予想され、これが *Sf3b4^{+/-}* マウスが前脳特異的な形態異常を引き起こした要因である可能性がある。

(3) *Sf3b4-flox* マウスの作出と解析

Nager 症候群の原因遺伝子であるスプライシング因子 *Sf3b4* の神経堤細胞特異的ノックアウトのホモ欠失マウス (*Sf3b4^{fl/fl}*) をクローニングフリー-CRISPR/Cas9 システムにより作出したところ、早期胎生致死であることが判明した。この原因を検討したところ、CRISPR/Cas9 システムのオフターゲット効果による弊害の可能性が考えられ、当初の研究計画にあった組織特異的ノックアウトマウス解析は実施できなかった。

(4) *Sf3b4* の共役因子である *Sf3b1* の機能抑制実験

胎齢 8.0-9.5 日胚前後の妊娠マウスに対して *SF3B1* の阻害剤を腹腔投与したところ、胎児の頭部形成に異常を認めた。それ以降の胎齢に対する投与では著明な異常は見られなかった。この形成異常の原因を明らかにするため、頭部間葉細胞の出現、増殖や細胞死、軟骨細胞や骨芽細胞の分化状態を *in situ* hybridization 法や免疫組織化学染色等により調べたところ、阻害剤投与胚では神経上皮や頭部間葉における細胞増殖活性の低下や細胞死割合の増加、神経上皮における神経管形成関連因子の発現低下が認められた。

< 引用文献 >

Bernier, F.P., Caluseriu, O., Ng, S., Schwartzentruber, J., Buckingham, K.J., Innes, A.M., Jabs, E.W., Innis, J.W., Schuette, J.L., Gorski, J.L., Byers, P.H., Andelfinger, G., Siu, V., Lauzon, J., Fernandez, B.A., McMillin, M., Scott, R.H., Racher, H., Consortium, F.C., Majewski, J., Nickerson, D.A., Shendure, J., Bamshad, M.J., Parboosingh, J.S., 2012. Haploinsufficiency of SF3B4, a component of the pre-mRNA spliceosomal complex, causes Nager syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 90, 925-933.

Isono, K., Mizutani-Koseki, Y., Komori, T., Schmidt-Zachmann, M.S., Koseki, H., 2005. Mammalian polycomb-mediated repression of Hox genes requires the essential spliceosomal protein Sf3b1. *Genes Dev.* 19, 536-541.

Lehalle, D., Wieczorek, D., Zechi-Ceide, R.M., Passos-Bueno, M.R., Lyonnet, S., Amiel, J., Gordon, C.T., 2015. A review of craniofacial disorders caused by spliceosomal defects. *Clin. Genet.* 88, 405-415.

Lei, L., Yan, S.Y., Yang, R., Chen, J.Y., Li, Y., Bu, Y., Chang, N., Zhou, Q., Zhu, X., Li, C.Y., Xiong, J.W., 2017. Spliceosomal protein *eftud2* mutation leads to p53-dependent apoptosis in zebrafish neural progenitors. *Nucleic Acids Res.* 45, 3422-3436.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Vu Tri H., Takechi Masaki, Shimizu Miki, Kitazawa Taro, Higashiyama Hiroki, Iwase Akiyasu, Kurihara Hiroki, Iseki Sachiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Dlx5-augmentation in neural crest cells reveals early development and differentiation potential of mouse apical head mesenchyme	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81434-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takenoshita Manami, Takechi Masaki, Vu Hoang Tri, Furutera Toshiko, Akagawa Chisaki, Namangkalakul Worachat, Aoto Kazushi, Kume Tsutomu, Miyashin Michiyo, Iwamoto Tsutomu, Iseki Sachiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Cell lineage and expression based inference of the roles of forkhead box transcription factor Foxc2 in craniofacial development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada Takahiko, Takechi Masaki, Yokoyama Norisuke, Hiraoka Yuichi, Ishikubo Harumi, Usami Takako, Furutera Toshiko, Taga Yuki, Hirate Yoshikazu, Kanai Azuma Masami, Yoda Tetsuya, Ogawa Goto Kiyoko, Iseki Sachiko	4. 巻 249
2. 論文標題 Heterozygous mutation of the splicing factor Sf3b4 affects development of the axial skeleton and forebrain in mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 622 ~ 635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武智正樹, 山田隆彦, 星野裕紀子, 竹内理華, 井関祥子
2. 発表標題 uCTを活用した疾患モデルマウスの頭部形態の解析例
3. 学会等名 日本先天異常学会第60回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田隆彦, 横山紀典, 平岡優一, 石久保春美, 宇佐美貴子, 多賀祐喜, 柳久美子, 後藤希代子, 要匡, 武智正樹, 井関祥子
2. 発表標題 Nager症候群の発生的成因の解明に向けて
3. 学会等名 日本先天異常学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 疾患モデルマウス作出によるNager症候群の原因遺伝子SF3B4の機能解析
2. 発表標題 山田隆彦, 横山紀典, 平岡優一, 石久保春美, 宇佐美貴子, 多賀祐喜, 柳久美子, 後藤希代子, 要匡, 武智正樹, 井関祥子
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	要 匡 (Kaname Tadashi) (40264288)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部・部長 (82612)	
研究 分担者	井関 祥子 (Iseki Sachiko) (80251544)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	ノースウエスタン大学			