

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11004

研究課題名(和文) 口蓋の初期発生に関わる転写制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Identification of transcription networks associated with oral clefts

研究代表者

船戸 紀子 (FUNATO, Noriko)

東京医科歯科大学・統合研究機構・准教授

研究者番号：10376767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：唇顎口蓋裂は、先天異常の中で最も多い確率で起きる異常の一つである。また、唇顎口蓋裂や下顎の形態異常などの顎顔面領域の形態異常は症候群の一症状としても認められる。申請者は、本課題で「口蓋の初期発生に関わる転写制御ネットワーク」の研究をおこなった。

申請者は、本研究計画をもとに、T-box型転写因子Tbx1、bHLH型転写因子Hand2およびHand1などの転写因子の解析を行った結果、口蓋裂の病因、口蓋の発生、顎顔面の形態形成について研究成果を報告した。あわせて、口蓋裂をもつ遺伝子改変マウスについて包括的に総説し、ヒトの口蓋裂の疾患疫学や表現型に疾患遺伝子を融合させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

T-box型転写因子をコードするTBX1は、新生児4000人に1人に認められる22q11.2欠失症候群(DiGeorge症候群、velo-cardio-facial症候群)の疾患遺伝子候補の一つである(OMIM #188400)。本研究により、22q11.2欠失症候群と他の症候群とが口蓋裂の発生において関わりがあることが明らかになった。一方、口蓋および下顎の獲得は脊椎動物の進化において最も重要なステップであるが、bHLH型転写因子Hand2の遺伝子改変マウスを用いた解析により、遺伝子レベルで顎の進化の一端を解明した。これらは、動物形態進化学的にも意義があるといえる。

研究成果の概要(英文)：Oral clefts, the most frequent congenital birth defects in humans, are multifactorial disorders caused by genetic and environmental factors. Although genes related to genetic disorders associated with oral cleft phenotypes are known, a gap between detecting these associations and interpretation of their biological importance has remained. We grouped the candidate genes on the basis of different functional categories to gain insight into the genetic etiology of oral clefts.

In addition, we provided evidence that transcription factor TBX1 maintains normal growth and development of palatal shelves, mediated through the regulation of genes involved in muscle cell differentiation, nervous system development, and biomineral tissue development. We also reported that transcription factor HAND2 is sufficient for upper jaw (maxilla)-to-mandible transformation by regulating the expression of homeobox transcription factors in mice.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：口蓋裂 下顎 Hand2 Tbx1 転写因子 脊椎動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂は、出産 1000 人中 1~3 人の割合で見られると言われ、先天異常の中で最も多い確率で起きる異常の一つである。また、唇顎口蓋裂や下顎の形態異常などの顎顔面領域の形態異常は症候群の一症状としても認められる。

#### 2. 研究の目的

申請者は、頭蓋冠、頭蓋底、顔面骨、顎骨、口蓋の発生機構に関わる転写因子を分子生物学および発生生物学の両面から解明することで、顎頭蓋顔面骨の形態異常や口蓋裂の治療へと研究を展開するのが目標とし、本課題で「口蓋の初期発生に関わる転写制御ネットワーク」の研究をおこなった。

#### 3. 研究の方法

- (1) T-box 型転写因子 Tbx1、bHLH 型転写因子 Hand1、Hand2 の口蓋および上下顎発生における機能を個体レベルで明らかにするために、以下に示す遺伝子改変マウスを交配した上で実験に用いた。

動物実験にあたっては、開始前に、実験動物運営規定に基づき「動物実験計画書」を動物実験委員会に提出し、承認を受けた。また、「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」(平成 17 年法律第 68 号)および、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、平成 18 年 6 月 1 日)、「National Institute of Health and Nutrition Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals」を遵守し、実験動物の適正な管理と倫理面に配慮した実験を行った。

Tbx1-Cre リコンビナーゼ トランスジェニックマウス  
Tbx1 コンディショナルノックアウトマウス ( $Tbx1^{loxP/loxP}$ )  
Hand2 コンディショナルトランスジェニックマウス  
Hand1 コンディショナルトランスジェニックマウス  
R26 レポーターマウス  
KRT14-Cre リコンビナーゼ トランスジェニックマウス  
Wnt1-Cre リコンビナーゼ トランスジェニックマウス  
Twist2-Cre リコンビナーゼ ノックインマウス

- (2) 形態学的観察

上記遺伝子改変マウスを交配した上で、得られたマウスにおいて以下の解析を行った。

骨軟骨染色  
一般組織染色  
Section *in situ* hybridization  
Whole-mount *in situ* hybridization  
ベータガラクトシダーゼ染色  
免疫染色

- (3) 分子生物学的解析

Tbx1、Hand1、Hand2、遺伝子を発現するアデノウィルスあるいは、ベクターを用いて培養細胞にて分子生物学的解析を行った。

- (4) 口蓋における Tbx1 の標的遺伝子および microRNA の網羅的探索を行うために、上記の遺伝子改変マウスの組織を用いて、マイクロアレイ解析を行った。  
(5) (4)より得られた遺伝子について、リアルタイム PCR により発現解析を行った。  
(6) (4)より得られた遺伝子群、あるいは、口蓋裂の疾患遺伝子について、オントロジー解析を適用した。

#### 4. 研究成果

申請者は、本研究計画をもとに、T-box 型転写因子 Tbx1、bHLH 型転写因子 Hand2 および Hand1 などの転写因子の解析を行った結果、口蓋裂の病因、口蓋の発生、口蓋を含む顎骨の形態形成について、以下の研究成果を報告した。

- (1) それぞれの遺伝子改変マウスについて、口蓋裂に関わる遺伝子群、また、口蓋(上顎)および下顎の初期発生に関わる遺伝子群について網羅的解析を行い、遺伝子情報データベース NCBI GEO (Gene Expression Omnibus)を通じて公開した (GEO 登録番号: GSE75805、GSE79514)。  
(2) T-box 型転写因子 Tbx1 が口蓋の発生で制御する遺伝子群について報告した (Funato et al., *Arch Oral Biol*, 2018)。  
(3) 転写因子 Hand2 は、ホメオボックス型転写因子群の発現調節を伴って上顎を下顎へ形質転換することを報告した (Funato et al., *Sci Rep*, 2016; Funato et al., *Genom Data*, 2016)。  
(4) 口蓋裂の病因について広く理解するために、これまで報告されてきた遺伝子改変マウスについて包括的に総説し、発表した (Funato et al., *World J Biol Chem*, 2015)。

- (5) ヒトの口蓋裂の疾患疫学や表現型に疾患遺伝子を融合させるため、口蓋裂の疾患遺伝子群に遺伝子オントロジー解析を適用し、報告した (Funato et al., *Int J Oral Sci*, 2017)。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 7 件)

Noriko Funato, Hiromi Yanagisawa.

Deletion of the T-box transcription factor gene, Tbx1, in mice induces differential expression of genes associated with cleft palate in humans.

*Arch Oral Biol*, 2018, 95:149-155.

doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.08.001

船戸紀子, Srivastava Deepak, Yanagisawa Hiromi.

転写因子Tbx1はヒト口蓋裂の疾患遺伝子の発現調節により口蓋の発生に關与する

Journal of Oral Biosciences Supplement. 2018, 407:201809.

Funato N, Nakamura M.

Identification of shared and unique gene families associated with oral clefts.

*Int J Oral Sci*. 2017, 9 (2): 104-109.

doi: 10.1038/ijos.2016.56.

Funato N, Kokubo H, Saga Y.

Transcriptomic analyses of Hand2 transgenic embryos

*Genom. Data*, 2016, 9: 60-62.

doi:10.1016/j.gdata.2016.06.015

Funato N, Kokubo H, Nakamura M, Yanagisawa H, Saga Y.

Specification of jaw identity by the Hand2 transcription factor.

*Sci Rep*. 2016, 6, 28405.

doi: 10.1038/srep28405

Laurie LE, Kokubo H, Nakamura M, Saga Y, Funato N.

The Transcription Factor Hand1 is Involved In Runx2-Ihh-Regulated Endochondral Ossification.

*PLoS One*. 2016 Feb 26;11(2):e0150263.

doi: 10.1371/journal.pone.0150263.

Funato N, Nakamura M, Yanagisawa H.

Molecular basis of cleft palates in mice.

*World J Biol Chem*. 2015; 6(3): 121-138.

doi: 10.4331/wjbc.v6.i3.121.

### 〔学会発表〕(計 6 件)

#### (邦文)

船戸紀子

転写因子Tbx1はヒト口蓋裂の疾患遺伝子の発現調節により口蓋の発生に關与する

第 60 回歯科基礎医学会学術大会、2018 年 9 月 5 日 - 9 月 7 日、九州大学、福岡

船戸紀子.

転写因子 Hand2 はホメオボックス型転写因子群の発現調節を伴って上顎を下顎へ形質転換

する第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24 日 - 8 月 26 日、札幌コンベンション

センター、北海道

船戸紀子.

口蓋裂に關与する疾患遺伝子群のオントロジー解析

第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月11日 - 9月13日、朱鷺メッセ、新潟

#### (欧文)

Funato N,

Craniofacial Development: Using Computational Data for Generating Experimental Data.

Frontier Meeting, Feb 15, 2019, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Funato N, Srivastava D, Yanagisawa H.

Tbx1 knockout mice exhibit dysregulated expression of genes associated with cleft palate in humans. ASCB/EMBO 2017 Meeting, Dec.2-6, 2017, Philadelphia, USA.

Funato N, Yanagisawa H, Nakamura M.

Gene Ontology Analysis for Cleft Palate

2015 ASCB (The American Society for Cell Biology) Annual Meeting, Dec.12-16. 2015, San Diego, USA.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究情報データベース 船戸紀子

[http://reins.tmd.ac.jp/html/100007340\\_ja.html](http://reins.tmd.ac.jp/html/100007340_ja.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：柳沢 裕美  
ローマ字氏名：YANAGISAWA, Hiromi

研究協力者氏名：James A. Richardson  
ローマ字氏名：RICHARDSON, James

研究協力者氏名：Deepak Srivastava  
ローマ字氏名：SRIVASTAVA, Deepak

研究協力者氏名：中村 正孝  
ローマ字氏名：NAKAMURA, Masataka

研究協力者氏名：相賀 裕美子  
ローマ字氏名：SAGA, Yumiko

研究協力者氏名：小久保 博樹

ローマ字氏名：KOKUBO, Hiroki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。