

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390340

研究課題名（和文） 骨軟骨幹細胞の初期分化に関わる転写制御ネットワークの解明

研究課題名（英文） Molecular analysis of transcriptional pathways in osteochondro-progenitors

研究代表者

船戸 紀子（FUNATO NORIKO）

東京医科歯科大学・医歯学研究支援センター・講師

研究者番号：10376767

研究成果の概要（和文）：

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）の疾患遺伝子である。同症候群では、胸腺形成不全による細胞性免疫異常、心血管奇形の他に、両眼隔離、低耳介、耳介変形、小顎症、口蓋裂などの頭蓋顎顔面骨形態異常を認める。*Tbx1* コンディショナルノックアウトマウスの表現型を解析したところ、*RUNX2* が疾患遺伝子である鎖骨頭蓋異骨症の表現型と酷似することが分かった。また、*Tbx1* が骨の発生に関与することが明らかとなった。骨軟骨幹細胞の初期分化の分子機構の解明に向けて、他の転写因子群と併せて現在機能解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：

T-box transcription factor, *Tbx1*, is the major candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge/ Velo-cardio-facial syndrome) characterized by facial defects, thymus hypoplasia, cardiovascular anomalies, and cleft palates. In this project, we found that loss of *Tbx1* in mouse results in skeletal abnormalities strikingly similar to those of cleidocranial dysplasia (CCD) in humans, which is an autosomal-dominant skeletal disease caused by mutations in *RUNX2*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：bHLH 型転写因子、T-box 型転写因子、頭蓋顎顔面骨

1. 研究開始当初の背景  
軟骨幹細胞の初期分化の機序についての研究は、従来、転写因子を中心に行われてき

ており、Runt ファミリーの転写因子 *Runx2/Cbfa1* や *Sox9* などのマスター転写因子の発見をもたらした。*Runx2* は、骨芽細

胞分化と骨形成、および軟骨細胞の成熟過程に関わるマスターコントロール分子であり、ヒト *RUNX2* は、鎖骨頭蓋異骨症の疾患遺伝子である (OMIM #119600)。

申請者らは、bHLH 型転写因子群とクロストークする分子、標的遺伝子を同定し、bHLH 型転写因子 *Hand2*、*Twist1* (Saethre-Chotzen 症候群疾患遺伝子、OMIM#101400) の骨芽細胞分化過程での機能や、患者に認められた変異多型性について明らかにしてきた。*Hand2* は下顎骨発生前に、下顎骨原基および下顎メッケル軟骨に一過性に発現する。興味深いことに、*Hand2* は、*Runx2* とのタンパク質相互作用により骨芽細胞分化に対して負に制御する一方で、下顎の軟骨細胞分化には必須であり、正に制御している。しかし、軟骨細胞における *Hand2* の標的遺伝子および役割を含め、*Hand2* が骨軟骨幹細胞から軟骨細胞への分化決定にどのように関わるのかは不明である。

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) の疾患遺伝子である (OMIM #188400)。同症候群では、胸腺形成不全による細胞性免疫異常、心血管奇形、両眼隔離、小顎症、低耳介、耳介変形の他に、口蓋裂を認める。また、*Tbx1* 遺伝子欠損マウスおよび *Tbx1* コンディショナルマウスでは、部位特異的に骨芽細胞分化マーカーの発現が減少し、頭蓋顎顔面骨の膜性骨化が阻害される (船戸ら、研究開始当初未発表データ)。

## 2. 研究の目的

骨芽細胞や軟骨細胞は、共通の骨軟骨幹細胞からそれぞれの前駆細胞を経て分化する。本研究では、骨軟骨幹細胞の初期分化の分子機構の解明に向けて、頭蓋顎顔面骨の骨軟骨幹細胞の分化決定に関わる転写因子群 (bHLH 型転写因子 *Hand2*, *Hand1*, T-box 型転写因子 *Tbx1*) と転写制御ネットワークを形成する分子を、Physical interaction (タンパク質相互作用) および Genetic interaction (転写調節制御作用) の二つの側面から網羅的に解析し、同定された interaction について分子生物学的な手法を用いて機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変マウス

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。

- ① *Tbx1-Cre* リコンビナーゼトランスジェニックマウス
- ② *Tbx1* コンディショナルノックアウトマウス
- ③ *R26-LacZ* レポーターマウス
- ④ *R26-EYFP* レポーターマウス
- ⑤ *Twist2-Cre* リコンビナーゼマウス
- ⑥ *Mox2-Cre* リコンビナーゼマウス
- ⑦ *Wnt1-Cre* リコンビナーゼマウス
- ⑧ *K14-Cre* リコンビナーゼマウス
- ⑨ *Hand1* トランスジェニックマウス

### (2) 形態学的観察

形態学的観察のために、上記遺伝子改変マウスを用いて、

- ① 骨軟骨染色
- ② Section in situ hybridization
- ③ Whole-mount in situ hybridization
- ④ ベータガラクトシダーゼ染色
- ⑤ 一般組織染色
- ⑥ 免疫組織染色を行った。

### (3) 分子生物学的解析

#### ① 酵母ツーハイブリッド法

bHLH 型転写因子 *Hand2*, *Hand1*, T-box 型転写因子 *Tbx1*) とタンパク質相互作用する分子を網羅的に解析した。

#### ② ルシフェラーゼアッセイ

骨芽細胞分化に関わる遺伝子のプロモーターに与える影響を調べた。

#### ③ ウェイスタンプロッキング

#### ④ アルカリフォスタターゼ染色

*Tbx1*, *Runx2* およびコントロールである *EGFP* (Enhanced Green Fluorescent Protein) 遺伝子を発現するアデノウイルスを作成した。細胞にそれぞれの遺伝子を有するアデノウイルスを感染させ、アルカリフォスタターゼ染色を行った。

#### ⑤ CFU アッセイ

*Cre* リコンビナーゼを発現するアデノウイルスを作成した。*Tbx1* コンディショナルマウス骨髄細胞に感染させ、分化の解析を行った。

## 4. 研究成果

- (1) *Tbx1* 遺伝子欠損マウスの骨の解析  
*Tbx1* 遺伝子欠損マウスの表現型を解析

したところ、*RUNX2* が疾患遺伝子である鎖骨頭蓋異骨症の表現型と酷似することが分かった。

#### (2) *Tbx1* コンディショナルノックアウトマウスの解析

発生の過程で一部の骨に *Tbx1* の発現を認める。そこで、*Tbx1* を組織特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作成して骨形態について観察し、一部の骨に *Tbx1* 遺伝子欠損マウスと同等の表現型を認めた。

#### (3) *Tbx1* 遺伝子欠損マウス骨芽細胞の分化の解析

骨芽細胞の分化に関わる遺伝子の発現から、発生過程で、*Tbx1* 遺伝子欠損マウスの骨芽細胞の分化が抑制されていることが分かった。

上記のうち、骨形成における *Tbx1* の機能解析について、研究成果を論文投稿中である。

一方、*Tbx1* 遺伝子欠損マウスにおいて軟骨結合の早期癒合が認められることから、*Tbx1* が軟骨細胞の分化を負に制御していることが示唆された。*Tbx1* の標的遺伝子についても解析を行った（投稿準備中）。

また、bHLH 型転写因子 *Hand2*, *Hand1* 遺伝子改変マウスの解析から、第一鰓弓および四肢の発生における役割を解析し、標的遺伝子の解析を行った（投稿準備中）。

頭蓋顎顔面骨の骨軟骨幹細胞の分化決定に関わる転写因子群とクロストークする他のシグナル伝達系分子を検索するために、酵母 two-hybrid 法を用いて遺伝子を同定し、細胞レベルで機能解析を行った（未発表）。現在、引き続き、個体レベルの解析を行っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Funato N, Nakamura M, Richardson JA, Srivastava D, Yanagisawa H. *Tbx1* regulates oral epithelial adhesion and palatal development. *Hum Mol Genet.* 2012 Jun 1;21(11):2524-2437. 査読有

doi: 10.1093/hmg/dds071.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Funato N, Nakamura M. Protein inhibitors of activated STAT (PIAS) proteins are new negative regulators of Runx2, 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology in San Francisco, USA. December 15-19, 2012.
- ② Morita J, Funato N, Kobayashi Y, Nakamura M, and Moriyama K. Soluble FGFR2 with S252W prevent craniosynostosis of Apert model mouse. Japanese Association of Dental Research, Niigata, Japan, December 14-15. 2012.
- ③ Funato N, Nakamura M. Protein Inhibitors of Activated STAT (PIAS) Proteins Regulate Runx2 Transactivation Activity. San Diego, USA. Sep 19, 2011.
- ④ Funato N, Chapman SL, McKee MD, Funato H, Morris JA, Shelton JM, Richardson JA, Yanagisawa H. Hand2 controls osteoblast differentiation in the branchial arch. Gordon Research Conferences, Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration. April 11, 2010, Lucca, Italy.

[図書] (計 1 件)

- ① Funato N, in *Atlas of Orthodontic Treatment for Patients with Birth Defects*. Kuroda T, Ohshima K, Motohashi N, Moriyama K Eds. Needham Press, 2012, pp. 123-126, 156-166.

[その他]

ホームページ等

東京医科歯科大学 医歯学研究支援センター  
疾患遺伝子部門  
<http://www.tmd.ac.jp/cmn/gene/index.htm>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

船戸 紀子 (NORIKO FUNATO)

東京医科歯科大学・医歯学研究支援センター・講師

研究者番号：10376767

(2)研究分担者

中村 正孝 (MASATAKA NAKAMURA)

東京医科歯科大学・医歯学研究支援センター・教授

研究者番号：30180392