

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06386

研究課題名(和文)顎顔面骨格形成過程における新規転写因子の役割の解明

研究課題名(英文)The novel transcription factor Zfhx4 is critical to craniofacial development

研究代表者

中村 恵理子 (NAKAMURA, ERIKO)

大阪大学・歯学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号：00755069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：顎顔面の骨格形成は、様々なサイトカインや転写因子により制御されており、この制御機構が破綻すると顎顔面骨格形成異常が引き起こされる。本研究では、顎顔面骨格形成異常を呈する新たな遺伝子疾患として報告された8q21.11 Microdeletion Syndromeの遺伝子座に含まれる新規転写因子Zfhx4に着目し、研究代表者らが作製したZfhx4 KOマウスを活用し、Zfhx4の顎顔面骨格形成に対する役割を検討した。Zfhx4 KOマウスは、ドーム状の頭蓋、小顎症、口蓋裂の顎顔面骨格形成異常を呈した。本研究により転写因子Zfhx4が顎顔面骨格形成に重要な転写因子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Craniofacial development is regulated by several growth factors and cytokines, which regulate their down-stream transcription factors. Malfunction of these factors cause abnormal craniofacial disorders. A novel transcription factor Zfhx4 is putatively proposed to be responsible for the 8q21.11 Microdeletion Syndrome, characterized by a round face with full cheeks, ptosis, an underdeveloped alae, a short philtrum, micrognathia, low-set ears. To examine the role of Zfhx4 in craniofacial development, we first generated the Zfhx4^{-/-} mice. Zfhx4^{-/-} mice died of respiratory failure within a day after birth. Zfhx4^{-/-} mice exhibited domed and short skull, micrognathia, malformation of coronoid process and cleft palate. Histological analyses indicated that tongue and tooth germ were normally formed in the E16.5 Zfhx4^{-/-} mice. In situ hybridization analysis confirmed that Zfhx4 was expressed in Palatal shelf in vivo. Collectively, Zfhx4 plays a critical role in craniofacial development.

研究分野：口腔生化学

キーワード：転写因子 顎顔面骨格形成 口蓋裂 内軟骨性骨形成 口蓋

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域の骨格形成は、ホルモン、サイトカイン、増殖因子およびその下流で機能する転写因子など様々な分子によって制御されている。顎顔面骨格形成に関与するこれらの分子のネットワークは、巧妙かつ緻密にコントロールされており、その結果、顎顔面の形態は時空間的に的確に制御されている。しかし、これらの分子が構成する分子ネットワークシステムの調和が破綻すると、様々な顎顔面骨格形成異常が引き起こされる。近年、顎顔面骨格形成異常を呈する新たな遺伝子疾患として 8q21.11 Microdeletion Syndrome が報告された (Palomares M, Am J Hum Genet 89: 295-301, 2011)。研究代表者は、8q21.11 遺伝子座にある新規転写因子 *Zfhx4* が顎顔面領域の骨格形成に関与している可能性を想定し、*Zfhx4* KO マウスの作製を試みた。まず *Zfhx4* flox マウスを作製し、CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配し、*Zfhx4* 遺伝子欠損ヘテロマウスを作製した。さらに *Zfhx4* 遺伝子欠損ヘテロマウスどうしを交配し、*Zfhx4* KO マウスを作製し、その表現型を解析し、*Zfhx4* の機能的な役割を検討した。*Zfhx4* KO マウスは、出生時より喘ぎ呼吸を呈し、生後 1 日以内に死亡した。*Zfhx4* KO マウスは、小顎症等の顎顔面骨格異常を呈し、100% の発症率で裂隙の非常に大きい口蓋裂を示した。口蓋裂の発症するマウスモデルはこれまでも数多く報告されている。しかし、これらの遺伝子疾患マウスモデルでは、多様な表現型異常の一つとして口蓋裂や他の顎顔面形成異常が示されているが、口蓋や顎顔面の発生メカニズムについては解析されていない場合が多い。そのため、口蓋ならびに顎顔面の形成の制御機構に関しては、未だ不明な点が多々残されている。転写因子 *Zfhx4* は、器官発生の調節に関わる Homeobox ドメインを有しており、文献的にも Homeobox ドメインを有する遺伝子が口蓋を含む顎顔面の

発生段階で重要な役割を果たしていると報告されている (Satokata I, Nat Genet 6: 348-56, 1994; Martin JF, Genes Dev 9: 1237-49, 1995)。

したがって、転写因子 *Zfhx4* を軸とし、時空間的な制御機構を明らかにすることにより、口蓋および顎顔面の形態形成を包括的に理解できると考え、本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

顎顔面形成の制御機構の解析を行うのに相応しい動物モデルである *Zfhx4* KO マウスを活用することによって、口蓋ならびに顎顔面形成過程における *Zfhx4* の役割を解析し、顎顔面骨格形成の時空間的制御機構の理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Zfhx4* KO マウスおよび同腹の野生型マウスの骨格標本および病理組織切片を作製し、*Zfhx4* KO マウスの顎顔面領域における骨格形成異常を個体レベルで検索する。

(2) 口蓋突起の伸長、挙上ならびに癒合の各段階における *Zfhx4* の関与を明らかにするために、E13.5、E14.0、E14.5 日齢の *Zfhx4* KO マウスおよび同腹の野生型マウスの前頭断組織切片を作製し、口蓋突起形成のどのステップが障害されているかを病理組織学的に比較検討する。

(3) 転写因子 *Zfhx4* の顎顔面領域における発現部位を検索するために、E13.5 日齢 C57BL マウスの前頭断組織切片を作製し、*in situ* hybridization を行う。

4. 研究成果

(1) 生後 0 日齢の *Zfhx4* KO マウスおよび同腹の野生型マウスをアリザリンレッド・アルシアンブルー二重染色し、骨格標本を作製した。*Zfhx4* KO マウスの顎顔面領域における骨格形成異常を個体レベルで検索したと

ころ、Zfhx4 K0 マウスは、ドーム状の頭蓋、頭蓋の前後径の短縮、小顎症、筋突起の形成不全、口蓋裂の顎顔面形成異常ならびに軟骨形成異常を呈した。

さらに Zfhx4 K0 マウスの顎顔面領域における表現型の詳細な解析を進めるために、胎生 16.5 日齢の Zfhx4 K0 マウスおよび同腹の野生型マウスの前頭断組織切片を作製し、病理組織学的検討を行なった。Zfhx4 K0 マウスは口蓋前方中央後方にかけて裂隙の大きい口蓋裂を認めた。しかし、舌や歯胚には明らかな形態異常を認めないことが明らかとなった。

(2) 口蓋の発生過程である E13.5、E14.5 および E15.5 日齢の Zfhx4 K0 マウスおよび同腹の野生型マウスの前頭断組織切片を作製し、病理組織学的に比較検討したところ、Zfhx4 K0 マウスの口蓋裂は口蓋突起の形成不全によるところではないことが明らかとなった。

(3) E13.5 日齢 C57BL マウスの前頭断組織切片を用いて、*in situ* hybridization を行ない、転写因子 Zfhx4 の発現部位を検索したところ、Zfhx4 は口蓋突起に強く発現しており、舌および歯胚には発現を認めないことが明らかとなった。

本研究の遂行により転写因子 Zfhx4 が顎顔面骨格形成に重要な役割を果たす転写因子であることが明らかとなった。

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)

[学会発表](計 4 件)

(1) Nakamura E, Hata K, Yoshida M, Murakami T, Takahata Y, Abe M, Wakisaka S, Yoneda T, Nishimura R. A novel transcription factor Zfhx4 is critical for chondrogenesis and craniofacial development. International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and

Diseases. December 10, 2015. Osaka, Japan. (Poster)

(2) Nakamura E, Hata K, Yoshida M, Murakami T, Takahata Y, Abe M, Wakisaka S, Yoneda T, Nishimura R. A transcription factor Zfhx4 functions as a transcriptional platform for Osterix during endochondral ossification. 37th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. October 9, 2015. Seattle, USA. (Oral Poster)

(3) 中村恵理子. 内軟骨性骨形成過程における新規転写因子 Zfhx4 の転写プラットフォームとしての機能的役割. 第 16 回運動器科学研究会. 2015 年 9 月 11 日. 鹿児島. (口演)

(4) 中村恵理子, 波多賢二, 吉田倫子, 村上智彦, 高畑佳史, 阿部真土, 米田俊之, 西村理行. 転写因子 Zfhx4 は Osterix と結合して内軟骨性骨形成の後期過程を制御する. 第 33 回日本骨代謝学会. 2015 年 7 月 23 日. 東京 (口演)

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

http://www.dent.osaka-u.ac.jp/admission/admission_000294.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村恵理子 (NAKAMURA ERIKO)
大阪大学歯学部附属病院・特任助教
研究者番号：00755069

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし