

令和元年6月20日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07369

研究課題名(和文) 標的遺伝子の同定から探る位置固有な四肢骨形態形成を制御するHox機構の解析

研究課題名(英文) Studies on the Hox gene function on position specific cartilage morphogenesis of the limb by identification of the target genes

研究代表者

黒岩 厚 (Kuroiwa, Atsushi)

名古屋大学・理学研究科・招へい教員

研究者番号：20134611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Hoxa11とHoxa13は、それぞれ軀脚と自脚の固有な骨形態形成を制御する最上位遺伝子である。転写因子として機能するこれらHoxの標的遺伝子を、ChIP-Seqとマイクロアレイを組み合わせる網羅的に同定した。その結果、Hoxa11とHoxa13に共通する軟骨分化の制御に関わる標的遺伝子が同定された。これらの標的遺伝子は、四肢骨形成に関わる他のホメオドメイン転写因子の標的でもあることが判明し、四肢骨形態形成の転写調節ネットワークの実態が明らかになった。またHoxa13は、これらに加えて肢芽間充織の増殖に関わる遺伝子の発現制御を通じて四肢類の自脚に共通した形態形成を制御することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達を含む四肢動物の腕には、体に近い方から遠い方に向かって(遠近軸)上腕部、前腕部そして掌と位置に固有な形態を持つ組織がある。Hox遺伝子は、四肢の源である肢芽から四肢の遠近軸に沿った位置に固有な形態形成を制御するリーダー的な遺伝子であることは知られていたが、Hox遺伝子の配下や組織構成そして指令の方式については未解明であった。本研究ではこれらの実態を明らかにする事に成功し、発生生物学の重要な課題に解答を与えることができた。また、この四肢形成をモデルとした形作りの遺伝子ネットワークの解明により、進化における形態の多様化解明や、人為的組織再生の基盤となる知見を提供する事になった。

研究成果の概要(英文)：Hoxa11 and Hoxa13 are master genes that control the bone morphogenesis of the zeugopod and autopod, respectively. The target genes of Hox transcription factors in the limb bud were comprehensively identified by combining ChIP-Seq analysis with a microarray analysis. As a result, target genes involved in regulating cartilage differentiation that are common to Hoxa11 and Hoxa13, were identified. These genes were found to be also the targets for other homeodomain transcription factors, PITX1 and SHOX2, that also control limb bone formation. These finding revealed the transcriptional regulatory network of position specific limb bone morphogenesis. In addition, Hoxa13 was found to control the morphogenesis common to the tetrapod autopodal architecture through the regulation of expression of the genes involved in proliferation of the limb bud mesenchyme and differentiation of the cartilage in unique manner.

研究分野：発生生物学

キーワード：形態形成 四肢形成 Hox 標的遺伝子 遺伝子発現調節 軟骨分化 肢芽 形態多様化

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

### 1. 研究開始当初の背景

四肢類の自由肢は、近位遠位軸に沿って柱脚、軛脚そして自脚の3つの解剖学的に区画化される。これらの区画には固有の形態を持つ固有な数の骨があり、骨パターンも固有である。四肢発生では、肢芽の間充細胞が軟骨様凝集体を形成し、次いでそれらは成長して四肢軟骨へと分化する。このプロセスは、肢芽の成長と共に、近位から遠位方向へと順次起きてゆく。*Hox9-13*の発現は四肢骨の解剖学的区画と一致し(1)、四肢軟骨の形態形成およびパターン形成の制御を解明する鍵となることが指摘された。その後肢芽における発現様式の解析や標的遺伝子破壊実験により、*Hox11(Hoxa11, Hoxd11)*は軛脚の、そして*Hox13(Hoxa13, Hoxd13)*は自脚軟骨形態形成のマスター遺伝子として機能していることが示された(2, 3)。*Hox*に由来する転写因子は標的遺伝子の発現制御を通じて、位置に固有な様式で肢芽間充細胞からの前軟骨凝集体形成や軟骨細胞への分化を制御していると推測されるが、軟骨形態形成の現場で機能するこれら*Hox*標的遺伝子の知見は乏しい。また各区画で発現する*Hox*は共通して軟骨分化過程を制御しているが、各*Hox*は標的遺伝子を共有するのか、そうであるならば作用する調節領域も共通しているのか、どのような機構によりどのようにして各*Hox*の個性が発揮されるのかという発生学上の大きな課題が未解明である。四肢骨形成過程にはHOX以外の転写因子も関与するが(4-6)、これらは*Hox*が参画する転写調節ネットワークとどのような関わり合いを持つのであろうか。四肢類の自脚は、柱脚及び軛脚と比較して顕著な特徴を持つ。細胞増殖プログラムと軟骨分化プログラムを自脚に固有な様式で統合する機構の存在が予測され、*Hoxa13*が関与している可能性が高い。また、*Hoxa13*が制御する四肢類の自脚形態形成プログラムの解明により、進化過程での遺伝子の新機能獲得と形態進化との関連性を明らかにできると期待されている。

### 2. 研究の目的

位置に固有な四肢骨形成過程における*Hox*の機能の解明と、四肢骨形成プログラムの根幹となる転写ネットワークへのHOX転写因子の関わり方を解明するために、肢芽における*Hox*標的遺伝子をChIP-Seq(Chromatin immunoprecipitation and high-throughput sequencing)とマイクロアレイ法により網羅的に同定する。これらのうち特に軟骨分化過程に関わる*Hox*標的遺伝子に着目して、軛脚と自脚の軟骨分化様式の特性と、それぞれの領域の軟骨形成を制御する*Hoxa11*と*Hoxa13*の特性の共通点と特異性を明らかにする。ChIP-Seqで得られたHOX結合転写調節配列情報と、四肢骨形成過程で機能する既知の転写因子の結合情報とを統合して、四肢骨形成転写ネットワークにおける*Hox*の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究室で作成した抗HOXA11抗体及び抗HOXA13抗体と、E11.5野生型マウス胚肢芽より調製した間充細胞を用いて、クロマチン免疫沈降法を行い各HOX転写因子が結合しているDNA断片を回収した。これらに含まれる核DNA断片の塩基配列を次世代シーケンサーで解読し、肢芽におけるHOXA11及びHOXA13結合領域を網羅的に同定した(7)。E11.25野生型もしくは*Hox13dKO*胚より、*Hoxd13*発現領域に相当する自脚先端部を採取し、probeの鋳型となるRNAを抽出した。Affymetrix社のGeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて二者の発現量を比較し、*Hox*下流遺伝子を網羅的に同定した(7)。MBP(Maltose binding protein)とHOXA11もしくはHOXA13のホメオドメインとの融合タンパク質と、蛍光標識したHOX結合DNA断片を用いてEMSA(Electrophoresis mobility shift assay)を行い、標的配列への直接結合を解析した(7)。

### 4. 研究成果

#### (1) 肢芽におけるHOXA11およびHOXA13 DNA結合領域は重複している

*HoxA*クラスターでは、HOXA13結合領域は*Hoxa7*のintron、*Hoxa9*の3'UTRおよび*Hoxa11*のintronに存在していた。*Hoxa11*intron結合部位は、自脚原基における*Hoxa11*のHOXA13依存性抑制に極めて重要である(8)。*Hoxa7*および*Hoxa9*領域にはHOXA11およびHOXA13の両方が結合していることは対照的に、*Hoxa11*intronではHOXA13結合のみが観察された。これは、*Hoxa11*発現の制御に対するHOXA11およびHOXA13寄与が異なる可能性を示している。

他の代表的な遺伝子座についても複数のHOXA11とHOXA13結合部位が存在するが、多くの場合HOXA11とHOXA13の結合部位は互いに重複していた。HOXA11およびHOXA13の両方が*in vitro*で同じ標的配列に結合するという結果(9)を考慮すると、HOXA11とHOXA13が同じ標的配列に結合していることが最も考えやすい。これらの重複するピークは全HOXA11ピークの72%であり、HOXA11結合領域の大部分がHOXA13結合領域に共通していることが示された。この共通領域をCHBRL(Common *Hox* binding region of the limb bud: 肢芽の共通Hox結合領域)と命名した。

#### (2) 四肢骨形成過程でHOXと他の転写因子はCHBRLを介して協調的に機能する

CHBRLは肢芽のSHOX2、PBX、GLI3またはPITX1結合領域と重複する

ペアード型ホメオドメイン転写因子SHOX2およびTALEホメオドメイン転写因子PBXは、四肢軟骨形成において重要な役割を有することが知られている(5, 10)。本解析で同定された多くの

HOX11/13 結合領域が既報の肢芽における SHOX2 や PBX 結合領域(11)と重複する事が明らかになった。たいへん興味深いことに、それぞれの共通結合領域間で、HOX, SHOX2, PBX 結合の組み合わせはバラエティーに富んでいた。

ペアード型ホメオドメイン転写因子 PITX1 は様々な機能を持つが、後肢軟骨形成にも関与している(4)。今回 CHBRL の 59% が PITX1 結合領域(13)と重複することが明らかになった。これらの結果は各ホメオドメイン転写因子の CHBRL への結合様式が多様であることを示している。

転写因子 GLI3 は、SHH シグナル伝達経路の標的であるが、四肢骨の形態形成においては *Hox* と協調的に機能する(12)。CHBRL の 24% (504/2139) が GLI3 結合領域と重複し、機能的協調が共通標的遺伝子の調節配列における HOX と GLI3 の同時結合に依存する可能性が示唆された。

HOX11/13 と SHOX2 や PITX1 は CHBRL を介して協調的に軟骨形成を制御する

CHBRL に隣接する遺伝子群には軟骨分化に関与する遺伝子群が濃縮されていることが示された。手/足根領域を除いて、*Hoxa11* および *Hoxa13* は、それぞれ靴脚および自脚で発現しているため、HOX11 及び HOX13 はそれらの固有な発現領域において共通の配列に結合し、発現領域特異的に標的遺伝子発現を制御すると予想される。さらに、非 HOX ホメオドメイン転写因子は、肢芽の共通の HOX11/13 結合ドメイン内の同じ領域に結合することが示された。

*Pitx1* は後肢芽で特異的に発現し、前肢型の形態形成を後肢型の形態形成に変換するように機能する(14)。前肢と後肢では骨のトポロジーはほぼ同じであり、相同位置の骨形態の違いは骨形成遺伝子発現の質的な違いというより量的な違い、もしくは時間的な違いにより生じると推測される。後肢芽の間充織における *Hox* および *Pitx1* の発現部位は大きく重複している(15)。特定の CHBRL に PITX1 も結合し、これらの遺伝子の多くが軟骨分化に関与していることが明らかになった。前肢芽および後肢芽における *Hox* 発現パターンは酷似しており、HOX と PITX1 は同じ配列を認識することが知られている。このようなことから、CHBRL への後肢芽特異的な PITX1 の結合は、複数の HBS への HOX の結合状態を後肢特異的な様相へと変化させ、その結果標的遺伝子の転写量やタイミングが後肢仕様へと微調整されるようになるものと推測される。

*Hox* との協調に関するもう一つの例は、SHOX2 である。*Shox2* 機能を喪失したマウスは、後肢の靴脚骨の形成不全に加えて、前肢および後肢の柱脚骨の重度の短縮を示す(5, 16)。*Shox2* は、柱脚および靴脚の間充織において、次いで軟骨膜および増殖軟骨細胞の外層において、*Hoxa9-11* と重複した発現するが、自脚においては発現しない(17, 18)。遺伝学的解析では、*Shox2* が *Hox11* の下流遺伝子であることが明らかになっている(19)。HOXA11 及び HOXA13 が *Shox2* の肢芽エンハンサー活性を持つ CHBRL に結合し、*Shox2* は *Hox13dk0* において異所性の発現を示すことから、*Hoxa11* と *Hoxa13* が *Shox2* の直接上位にあることが明らかになった。SHOX2 自身もこの CHBRL に結合し、これは SHOX2 が HOX11 と協調して自己調節に関与することを示している。興味深いことに、遺伝学的解析により *Hox* と *Shox2* が柱脚軟骨および靴脚軟骨の発生過程で協調的に機能していることも示唆されている(18)。これを支持する事実として、SHOX2 と HOXA11 が、特定の *Hox* 標的遺伝子群に存在する結合領域を共有することが示された。そしてこれらの共通遺伝子群には後述するように *Aff3* や *Bmp2* などの骨形成に関与する遺伝子が含まれている。このようなことから、PITX1 および HOXA11 と同様の機序により、SHOX2 および HOXA11 が、靴脚において CHBRL を介してこれらの遺伝子発現を協調的に調節する可能性を示している。したがって、HOX は、SHOX2 機能カスケードにおいて複数の段階を調節していることが示された。

### (3) CHBRL に存在する複数の進化的に保存された HBS の特性と意義

複数の HBS が HOX11/13 ChIP 断片に存在する

ABD-B 型 HOX は、*in vitro* で TTAT/C および TAAT/C モチーフ (HOX 結合配列: HBS) の両方に結合する(20)。HOXA11/13 ChIP 断片中には TTAT または TAAT を含む配列が、高度に濃縮されており、HOXA11/13 タンパク質が生体内で ChIP 断片に直接結合していることが示唆された。大多数の CHBRL の塩基配列は進化的保存性を示したが、特に HBS は、高レベルの保存性を示した。

HOX11/13 は ChIP DNA 中の進化的に保存された HBS に直接結合する

次に、EMSA により *in vitro* で典型的な CHBRL への HOX11/13 タンパク質の直接結合を解析した。*Rsrc1* intron 中の CHBRL の一つは、隣接する *Shox2* 遺伝子の四肢間充織特異的なエンハンサー機能を有する m741 (VISTA) と同一である(21)。EMSA の結果、HOXA11/13 が m741 の複数の HBS に直接結合しうることが示された。*Aff3* CHBRL のうちの一つに加えて、*Bmp2*, *Jag1* および *Tshz2* の CHBRL もまた複数の HBS を含むが、これらにも HOXA11/13 が直接結合しうることが示された。

CHBRL における複数の HBS の役割

ショウジョウバエにおいては、クラスター化している低親和性 HBS は HOX 結合の特異性および頑健性を保証することが示されているため(22)、脊椎動物 CHBRL における複数の HOXA11 および HOXA13 結合部位も同じ機能を有するものと考えられる。この可能性はまた、*Abd-B Hox* が四肢軟骨のパターン形成に対して量的効果を示すという報告によっても支持されている(23)。

(4) CHBRL に隣接する遺伝子は *Hox13* 変異肢芽において発現量の違いを示す

CHBRL に隣接する 1556 個の遺伝子を同定したが、これらには骨形成に関連する遺伝子が濃縮されていた。SHOX2、PBX1、PITX1 および GLI3 結合領域と重複する CHBRL に隣接する遺伝子群においても、骨形成に関連する遺伝子が濃縮されていた。CHBRL に隣接する遺伝子の大部分は、CHBRL と同じ topologically associating domain に属すること(1232/1556 遺伝子、79%)から、多くの CHBRL は隣接遺伝子の発現制御に関わる可能性が示唆された。これらについて *Hox* 標的遺伝子としての可能性を検証するために、*Hox13* 欠失肢芽における発現変化を定量解析した。

*Hox13*dKO 自脚において発現上昇を示す 781 座の遺伝子のうち、102 座が CHBRL 遺伝子に含まれた。転写調節因子に分類される遺伝子がこの分画に濃縮されていた。*Hox13*dKO 自脚で発現低下する 805 座の遺伝子のうち、79 座の遺伝子が CHBRL 遺伝子と重複したが、それらの遺伝子の機能は多様であった。これらの解析に基づいて、*Hox13*dKO で発現量変化を示す CHBRL 近傍遺伝子を直接 *Hox* 標的遺伝子とした。*Hox13*dKO 自脚で発現量変化を示す遺伝子の多くが CHBRL 遺伝子に含まれなかったことは興味深い。多数の転写因子コード遺伝子が HOXA13 標的であることを考えると、CHBRL 遺伝子群に含まれない遺伝子は、*Hox* 標的転写因子の下流にある可能性が高い。

(5) *Hox13* 突然変異体肢芽における HOXA11/13 標的遺伝子の空間的発現パターンの変化

機能喪失 *Hox13* 変異肢芽における、代表的な HOXA11/13 標的遺伝子の空間的発現パターンを WISH によって解析した。*Bmp2*、*Sulf1* および *Stmn2* は、野生型胚において自脚間充織で発現しているが、*Hox13*dKO 胚において発現は激減もしくは消失した。*Aff3*、*Bnc2*、*Nfib*、*Runx1t1*、*Shox2*、および *Tshz2* の発現は、E11.5 野生型胚では軀脚間充織に限定されるが、*Hox13*dKO 胚の自脚間充織において異所的発現を示した。*Aff3*、*Bnc2* および *Nfib* の発現は、軟骨分化におけるそれらの既知の役割(24-26)と一致して、肢芽軟骨分化の過程で起きる。これらの遺伝子の発現は E11.5 自脚では起きないが、興味深いことに E12.5 になると自脚軟骨または軟骨膜で発現するようになり、時には *Hoxa13* と部分的に重複した発現さえ示す。したがって、自脚間充織における HOXA13 によるこれらの遺伝子の発現抑制は、自脚領域で一過的に起きていると言える。E11.5 から E12.5 にかけて中手/足骨および指骨の軟骨形成は遠位方向に進行し、この間で間充織 *Hoxa13* の発現は徐々に減少し軟骨で消失する。この過程では HOXA13 量の減少に加えて、HOXA13 の活性の変化が、HOXA13 自体の修飾または転写活性を調節する機能を持つ補助因子の誘導や消失によって起こると推測される。あるいは、四肢間充織における HOXA13 依存性調節領域から HOXA13 非依存性調節領域への使用の切替えが軟骨分化過程で起こることも考えられる。

自脚における発現とは対照的に、これらの *Hox* 標的遺伝子は軀脚間充織においては軟骨での発現以前から発現し、これらの発現は *Hoxa11* 発現とほぼ完全に重複する。これは、HOXA11 には軀脚間充織においては HOXA13 と同じエンハンサー配列に結合するものの、HOXA13 と異なりこれらの遺伝子発現の抑制は行っていない可能性を示している。このような事実は、HOXA11 依存性と HOXA13 依存性の遺伝子発現調節の機序が異なっていることを示唆している。

(6) HOXA13 は二つの方式で軟骨分化を調節する

*Bcl11a* は E11.5 で、自脚間充織および軀脚後部充織で発現し、*Hox13*dKO では自脚発現が著しく減少する。BCL11A はジンクフィンガー型転写因子であり、血球の分化を抑制するが(27)、軟骨分化における機能は未解明であった。肢間充織細胞高密度培養系で *Bcl11a* 過剰発現させたところ、軟骨分化が有意に抑制されたことから、BCL11A は肢芽間充織系細胞の軟骨分化に対して抑制活性を有することが明らかになった。*Hox13*dKO 自脚では、ほとんどすべての自脚間充織が軟骨分化経路に入る。これは、HOXA13 によって抑制された軟骨分化プログラムが *Hox13*dKO 自脚で抑制解除されていることを示している。これらの事実から、E11.5 自脚では HOXA13 が *Bcl11a* 発現を介して軟骨分化を抑制していることが示唆される。これと同時に、その発現が軟骨分化の間に誘導される *Aff3* のような *Hox* 標的転写因子が、*Hox13*dKO 自脚原基の間充織では異所的に発現する。これらの結果は、正常発生過程では E11.5 の自脚において HOXA13 が、一方で軟骨形成に必要な転写因子群の発現を直接抑制して軟骨形成を抑制し、他方で抑制性転写因子 BCL11A の発現を活性化して軟骨形成を抑制していることを示している。このように、正常自脚発生における軟骨形成過程では、*Hoxa13* は正・負二つの方式で軟骨分化を制御していると考えられる。上述したが、自脚原基とは対照的に、*Aff3*、*Bnc2*、*Nfib*、*Shox2* および *Runx1t1* などの軟骨形成に関わる *Hox* 標的遺伝子は、軀脚間充織において *Hoxa11* と重複して発現している。これは、HOXA13 とは異なり、HOXA11 がこれらの標的遺伝子の発現を抑制しないことを意味する。したがって、HOXA13 による軟骨分化の二つの方式による制御機構は自脚特有であるといえる。

(7) *Hox13* は四肢類に特異的な自脚構造形成を制御する

*Hoxa13* は、なぜ、軀脚や柱脚で発現する他の *Hox* 遺伝子と比較して、このような特徴的な機能を持っているのであろうか？これはおそらく四肢類特異的な自脚構造形成と関連していると

考えられる。柱脚と軛脚にはそれぞれ 1 本と 2 本の長骨が存在し、予定領域の形状は楕円柱状である。自脚骨は一般的に 5 セットの長骨、すなわち中手/足骨と指趾骨から成り立つ。自脚原基は、この五指性軟骨を生成するために必要な数の間充織系細胞を供給するように、独特の扇形の構造を有している。肢芽後部の間充織で発現するシグナル因子 SHH は、自脚原基の扇形の構造形成に必須であり(28)、*Hox13*は肢芽エンハンサーを介して *Shh*発現を直接活性化する(29)。肢芽先端部で発現するシグナル因子、FGF10 は肢芽の誘導および成長に必要とされる(30)。*Hox* は、肢芽における *Fgf10* 発現の活性化にも関与し(31)、我々は HOXA11 および HOXA13 が *Fgf10* の肢芽エンハンサーの 1 つに結合することを見出している。このように、*Hox13* は、自脚充織系細胞の増殖を積極的に制御して、十分な数の間充織系細胞を供給する事によって五指性の自脚軟骨パターン形成に寄与する。上記のように、HOXA13 は二つの制御様式で、自脚原基における軟骨分化プログラムを一時的に抑制する。このように、*Hox13* は一方では十分な間充織を供給するために自脚特異的成長プログラムを制御し、他方では間充織供給が五指性構造を形成するのに十分なレベルに達するまで一時的に軟骨形成プログラムを抑制すると考えられる。五指性の自脚構造は四肢類に固有のものであり、この基本的な構造形成はニッチの多様化に対応するための四肢類の進化の鍵となった。魚類において *Hox13* 遺伝子は、ヒレ原基間充織の細胞分化プログラムを軟骨形成から鱗条形成へ切り替える際に機能している可能性が示された(32)。五指性四肢類の場合、*Hox13* の機能は、軟骨分化のための二方式制御の獲得を通じて、魚類プログラムから四肢類特異的自脚形成プログラムに対応するように切り替えられたと考えられる。

#### <引用文献>

1. Y. Yokouchi, H. Sasaki, A. Kuroiwa, Homeobox gene expression correlated with the bifurcation process of limb cartilage development. *Nature* **353**, 443-445 (1991).
2. K. M. Small, S. S. Potter, Homeotic transformations and limb defects in Hox A11 mutant mice. *Genes Dev* **7**, 2318-2328 (1993).
3. C. Fromental-Ramain *et al.*, Hoxa-13 and Hoxd-13 play a crucial role in the patterning of the limb autopod. *Development* **122**, 2997-3011 (1996).
4. D. P. Szeto *et al.*, Role of the Bicoid-related homeodomain factor Pitx1 in specifying hindlimb morphogenesis and pituitary development. *Genes Dev* **13**, 484-494 (1999).
5. J. Cobb *et al.*, A mouse model for human short-stature syndromes identifies Shox2 as an upstream regulator of Runx2 during long-bone development. *PNAS.USA* **103**, 4511-4515 (2006).
6. Y. Chen *et al.*, Direct interaction with Hoxd proteins reverses Gli3-repressor function to promote digit formation downstream of Shh. *Development* **131**, 2339-2347 (2004).
7. S. Yamamoto *et al.*, Hoxa13 regulates expression of common Hox target genes involved in cartilage development to coordinate the expansion of the autopodal anlagen. *Develop. Growth & Differ.*, (2019).
8. Y. Kherdjemil *et al.*, Evolution of Hoxa11 regulation in vertebrates is linked to the pentadactyl state. *Nature* **539**, 89-92 (2016).
9. W. F. Shen *et al.*, AbdB-like Hox proteins stabilize DNA binding by the Meis1 homeodomain proteins. *Mol cell Biol* **17**, 6448-6458 (1997).
10. L. Sellaeri *et al.*, Requirement for Pbx1 in skeletal patterning and programming chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **128**, 3543-3557 (2001).
11. W. Ye *et al.*, A unique stylopod patterning mechanism by Shox2-controlled osteogenesis. *Development* **143**, 2548-2560 (2016).
12. D. Buscher *et al.*, Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mech dev* **62**, 175-182 (1997).
13. S. Nemeč *et al.*, Pitx1 directly modulates the core limb development program to implement hindlimb identity. *Development* **144**, 3325-3335 (2017).
14. C. Lanctot *et al.*, Hindlimb patterning and mandible development require the Ptx1 gene. *Development* **126**, 1805-1810 (1999).
15. J. Shang *et al.*, Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb. *Dev dyn* **209**, 242-253 (1997).
16. B. E. Bobick, J. Cobb, Shox2 regulates progression through chondrogenesis in the mouse proximal limb. *J Cell Sci* **125**, 6071-6083 (2012).
17. I. T. Swinehart *et al.*, Hox11 genes are required for regional patterning and integration of muscle, tendon and bone. *Development* **140**, 4574-4582 (2013).
18. S. J. Neufeld *et al.*, Genetic interactions between Shox2 and Hox genes during the regional growth and development of the mouse limb. *Genetics* **198**, 1117-1126 (2014).

- 19.S. Gross *et al.*, Hoxa11 and Hoxd11 regulate chondrocyte differentiation upstream of Runx2 and Shox2 in mice. *PLoS One* **7**, e43553 (2012).
- 20.W. F. Shen *et al.*, The Abd-B-like Hox homeodomain proteins can be subdivided by the ability to form complexes with Pbx1a on a novel DNA target. *J Biol Chem* **272**, 8198-8206 (1997).
- 21.J. M. Rosin *et al.*, Comparative transgenic analysis of enhancers from the human SHOX and mouse Shox2 genomic regions. *Hum mol gen* **22**, 3063-3076 (2013).
- 22.J. Crocker *et al.*, Low affinity binding site clusters confer hox specificity and regulatory robustness. *Cell* **160**, 191-203 (2015).
- 23.J. Zakany *et al.*, Interactions between HOXD and Gli3 genes control the limb apical ectodermal ridge via Fgf10. *Dev Biol* **306**, 883-893 (2007).
- 24.T. Uchihashi *et al.*, Involvement of nuclear factor I transcription/replication factor in the early stage of chondrocytic differentiation. *Bone* **41**, 1025-1035 (2007).
- 25.E. Steichen-Gersdorf *et al.*, Triangular tibia with fibular aplasia associated with a microdeletion on 2q11.2 encompassing LAF4. *Clin Genet* **74**, 560-565 (2008).
- 26.A. Vanhoutteghem *et al.*, Basonuclin 2 has a function in the multiplication of embryonic craniofacial mesenchymal cells and is orthologous to disco proteins. *PNAS.USA* **106**, 14432-14437 (2009).
- 27.P. Liu *et al.*, Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immun* **4**, 525-532 (2003).
- 28.C. Chiang *et al.*, Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413 (1996).
- 29.F. Leal, M. J. Cohn, Loss and Re-emergence of Legs in Snakes by Modular Evolution of Sonic hedgehog and HOXD Enhancers. *Current biology : CB* **26**, 2966-2973 (2016).
- 30.K. Sekine *et al.*, Fgf10 is essential for limb and lung formation. *Nat Genet* **21**, 138-141 (1999).
- 31.R. Sheth *et al.*, Decoupling the function of Hox and Shh in developing limb reveals multiple inputs of Hox genes on limb growth. *Development* **140**, 2130-2138 (2013).
- 32.T. Nakamura *et al.*, Digits and fin rays share common developmental histories. *Nature* **537**, 225-228 (2016).

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Yamamoto, S. (10人省略) Kuroiwa, A. 2019. *Hoxa13* regulates expression of common Hox target genes involved in cartilage development to coordinate the expansion of the autopodal anlage. *Dev Growth Differ* **61**, 228-251. 査読有DOI: 10.1111/dgd.12601

Matsubara, Y. (8人省略) Kuroiwa, A. and Suzuki, T. 2017. Anatomical integration of the sacral-hindlimb unit coordinated by GDF11 underlies variation in hindlimb positioning in tetrapods. *Nat Eco Evol* **1**, 1392-1399. 査読有DOI: 10.1038/s41559-017-0247-y

Matsubara, Y. (6人省略) Kuroiwa, A. and Suzuki, T. 2016. Inactivation of Sonic Hedgehog Signaling and Polydactyly in Limbs of Hereditary Multiple Malformation, a Novel Type of Talpid Mutant. *Front Cell Dev Biol* **4**, 149. 査読有DOI: 10.3389/fcell.2016.00149

Beccari, L. (7人省略) Kuroiwa, A. and Duboule, D. 2016. A role for HOX13 proteins in the regulatory switch between TADs at the HoxD locus. *Genes Dev* **30**, 1172-1186. 査読有DOI: 10.1101/gad.281055.116

〔学会発表〕(計4件)

Takenaka, T., Andoh, C., Shiraishi, Y., Yamamoto, S., Takemoto, T., Hayashi, S., Ajima, R., Saga, Y., Kuroiwa, A. Unique and cooperative limb specific enhancers regulate *Fgf10* expression. Joint Annual Meeting of JSDB 51<sup>st</sup> and JSCB 70<sup>th</sup>, 2018.

Yamamoto, S., Uchida, Y., Ohtani, T., Shiraishi, Y., Yakushiji-Kaminatsui, N., Nozaki, E., Kuroiwa, A. Identification of Hox target genes involved in regulating the region-specific patterning and growth of cartilage. Joint Annual Meeting of JSDB 51<sup>st</sup> and JSCB 70<sup>th</sup>, 2018.

山本詩織、白石洋一、薬師寺那由他、内田侑史、黒岩 厚. Hox 及びその標的遺伝子による位置固有な四肢骨分化機構の解明. 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017.

Yamamoto, S., Yakushiji-Kaminatsui, N., Shiraishi, Y., Kuroiwa, A. Identification of Hox target genes involved in regulating the autopod-specific patterning and growth of cartilage. Annual Meeting of JSDB 50<sup>th</sup>, 2017.