

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09901

研究課題名（和文）DiGeorge症候群疾患遺伝子産物TBX1の新たな転写標的とその分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel transcriptional targets of the DiGeorge syndrome disease gene product TBX1 and its molecular mechanisms.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：申請者らは、頭蓋底軟骨結合の発生におけるTBX1の役割等について発表し（J Dent Res, 2020；Front Cell Dev Biol, 2020；Int J Mol Sci, 2022）、DiGeorge症候群について総論を発表した（J Dev Biol, 2022）。さらに、ネアンデルタール人から変化した一塩基多型がTBX1の発現およびホモ・サピエンスに特徴的な頭蓋底形態に寄与に關与する可能性を見出した（Am J Hum Genet, 2024）。一方、上皮においてTBX1によるmicroRNAの発現および転写制御ネットワークを解析した（Sci Rep, 2022）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、TBX1の頭蓋底軟骨結合の発生における役割や口蓋の上皮分化について明らかになった。さらに、染色体22q11.2の非コード領域にある一塩基多型rs41298798が、どのようなメカニズムでネアンデルタール人から現生人類への頭蓋底や脊椎の構造変化に関わった可能性があるかを見出した。一方、Tbx1遺伝子改変マウスに認められた頭蓋底や脊椎の変化は、TBX1を原因遺伝子とするディジョージ症候群にも認められる。そのため本研究は、ヒトの進化に加え、ヒトの疾患、頭蓋底や脊椎の発生、非コード領域に存在する一塩基多型の研究アプローチ方法、と複数の研究分野の発展に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We summarized our research on the role of TBX1 in the development of the skull base cartilage junction and published original articles and a review article (J Dent Res, 2020; Front Cell Dev Biol, 2020). We published a comprehensive review article summarizing the DiGeorge syndrome/22q11.2 deletion syndrome (J Dev Biol, 2022). We have also contributed to two books. In addition, we found that a single nucleotide polymorphism in the 22q11.2 region, which evolved from Neanderthals, may contribute to the expression of TBX1 and the characteristic cranial base morphology observed in Homo sapiens (Am J Hum Genet, 2024).

We investigated the microRNAs targeted by TBX1. We found that TBX1 targets the miR-200-ZEB2 axis in palatal formation. We then analyzed the novel function of TBX1 in epithelial-mesenchymal transition and investigated the expression and transcriptional control network of microRNAs by TBX1 both in vitro and in the palate of Tbx1 knockout mice (Funato N et al., Sci Rep, 2022).

研究分野：頭蓋顎顔面に關わる発生および疾患の分子病態

キーワード：頭蓋底 軟骨結合 microRNA 口蓋裂 DiGeorge 症候群 ネアンデルタール人 ホモ・サピエンス 脊椎

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

頭蓋顎顔面に骨格的な問題がある場合、咬合獲得のためには時間をかけた治療が必要である。頭蓋底軟骨結合の発生異常は、頭蓋顎顔面の形態にも影響を与える可能性があるが、その重要性にも関わらず、どのような分子メカニズムで発生が制御されているのか未解決のまま残されている。*Tbx1* ノックアウトマウスの蝶形後頭軟骨結合での表現型は特徴的かつ顕著であることから、TBX1 の軟骨結合での重要性は明らかであるが、その分子メカニズムは解明されていない。そこで申請者らは、TBX1 とタンパク質間相互作用する分子を探索し、転写因子 Z を新規に同定した。転写因子 Z が軟骨細胞の分化に関わることから、TBX1 も転写因子 Z の転写活性およびその標的遺伝子の転写制御を通じて、軟骨結合の軟骨細胞分化を制御するのではないかと考えた。

一方、口蓋においては、*Tbx1* の発現パターンと *Tbx1* 遺伝子改変マウス口蓋組織の観察から、TBX1 が口蓋突起粘膜上皮の増殖や極性に関与することを報告している (Funato et al., Hum Mol Genet, 2021)。発生過程の口蓋上皮において TBX1 の分子機能を明らかにするため、TBX1 が口蓋突起で転写制御する microRNA (miRNA) 群を探索し、miRNA クラスターを 2 つ新たに同定した。同定された miRNA の標的遺伝子産物の機能から、TBX1 が miRNA を通じて上皮間葉転換等を制御すると確信し、本研究を着想した。miRNA クラスターのプロモーターには種間で保存された TBX1 結合配列があり、直接の標的である可能性が高い。驚いたことに TBX1 は扁平上皮癌の形質にも影響を与えた。本研究で、TBX1 と他の転写因子とのクロストークや標的 miRNA を解明できれば、新しい視点からの治療法に結びつく可能性があり、研究の発展性も高い。

2. 研究の目的

頭蓋顎顔面に骨格的な問題がある場合、咬合獲得のためには時間をかけた治療が必要である。頭蓋顎顔面の形態形成には、頭蓋底軟骨結合の発生も影響を与えるが、その重要性にも関わらず、どのような分子メカニズムで頭蓋底軟骨結合の発生が制御されているのか未解決のまま残されていた。

頭蓋底軟骨結合の発生や口蓋裂の発症に関わる TBX1 転写因子の役割を、標的転写因子や miRNA クラスターを含む転写制御ネットワークを通じて明らかにし、DiGeorge 症候群、口蓋裂の発症、さらには扁平上皮癌の形質に与える TBX1 の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

頭蓋底軟骨結合の発生と口蓋裂の発症に関わる TBX1 の転写制御ネットワークを解明するため、各々の研究計画で *in silico*, *in vitro* および *in vivo* の手法を用いて統合的な解析を行った。

■ 研究 A. 頭蓋底軟骨結合の発生における TBX1 標的転写制御ネットワークの解析

(1). *Tbx1* 遺伝子改変マウスの頭蓋底軟骨結合の解析

頭蓋底軟骨結合は神経堤由来間葉組織と中胚葉組織に由来する。*Tbx1* ノックアウトマウスや組織特異的 *Tbx1* 遺伝子改変マウスにより、軟骨結合の解析を行った。さらに、*Tbx1-Cre; R26* リポーターマウスにより、早期骨化の原因組織を中胚葉と特定し、軟骨細胞分化と骨化の亢進を組織学的に確認した。

(2). 頭蓋底軟骨結合の発生における TBX1 分子メカニズムの解析

TBX1 とタンパク質間相互作用する分子を探索し、それらの中から軟骨細胞分化に関わる転写因子 RUNX2 を新規に同定し、TBX1 転写因子と RUNX2 のタンパク質間相互作用について確認した。

RUNX2 の標的遺伝子のプロモーター各種を用いて、プロモーター解析を行った。

TBX1 が RUNX2 を制御することで軟骨細胞分化を抑制するという仮説のもと、*Tbx1* ノックアウトマウスの頭蓋底軟骨結合で RUNX2 の標的遺伝子の発現を確認した。

■ 研究 B. ホモ・サピエンスに特徴的な頭蓋底形態に寄与するゲノム変化の解析

ホモ・サピエンスと絶滅したヒト属との間で異なる可能性がある遺伝子をスクリーニングした結果、TBX1 遺伝子が含まれていた。そこで、TBX1 遺伝子が存在する染色体 22q11.2 のバリエーション群をコンピューターにより解析し、その結果、非コード領域の一塩基多型 rs41298798 に着目した。

細胞のゲノム編集により、rs41298798 を含む 41 塩基の領域が、染色体 22q11.21 に存在する遺伝子群の発現量に関与していることがわかった。さらに、rs41298798 の現生人類の塩基配列について、プロモーター解析を行った。*Tbx1* 遺伝子改変マウスでは、ディジョージ症候群と類似する頭蓋底や脊椎の形態が観察された。さらに、TBX1 の発現程度に相関する頭蓋底や脊椎の形態の違いが、ホモ・サピエンスとネアンデルタール人との間でも認められた。

■ 研究 C. 口蓋裂発症に関わる TBX1 標的転写制御ネットワークの解析

(1). 口蓋の発生における TBX1 の標的遺伝子および microRNA クラスターの同定

野生型、*Tbx1* 遺伝子改変マウス胎仔より口蓋粘膜上皮癒合直前の口蓋突起を採取し、mRNA および miRNA の発現をマイクロアレイにて解析した。その結果、TBX1 の標的として粘膜上皮

の運命決定を担う2種類のmiRNAクラスターを同定した。口蓋突起のマイクロアレイの結果は、miRNA一次転写産物、成熟型miRNA、miRNAの標的mRNA、それぞれについてリアルタイムPCRにて確認した。

TBX1標的miRNAとその標的遺伝子群やmiRNAの宿主遺伝子の発現について、野生型マウスと*Tbx1*遺伝子改変マウスの胎仔口蓋にて比較解析した。

(2). TBX1が標的にするmicroRNAクラスターのプロモーター解析

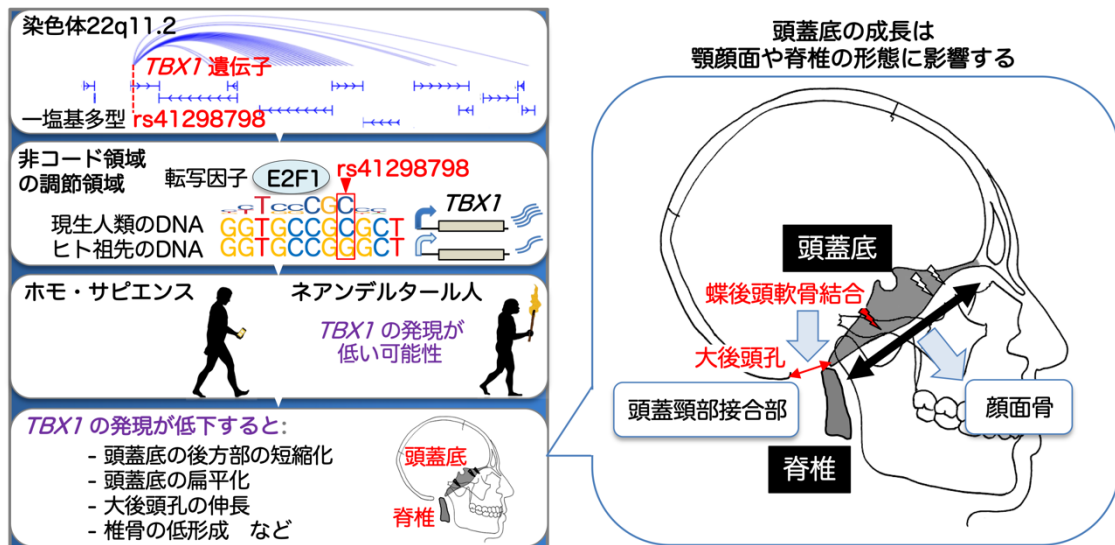
miRNAクラスターのプロモーター領域におけるTBX1の結合領域を新規に同定するため、同定されたmiRNAクラスターをクローニングし、プロモーター解析を行った。

(3). 扁平上皮癌由来細胞株におけるTBX1標的microRNAクラスターの同定と解析

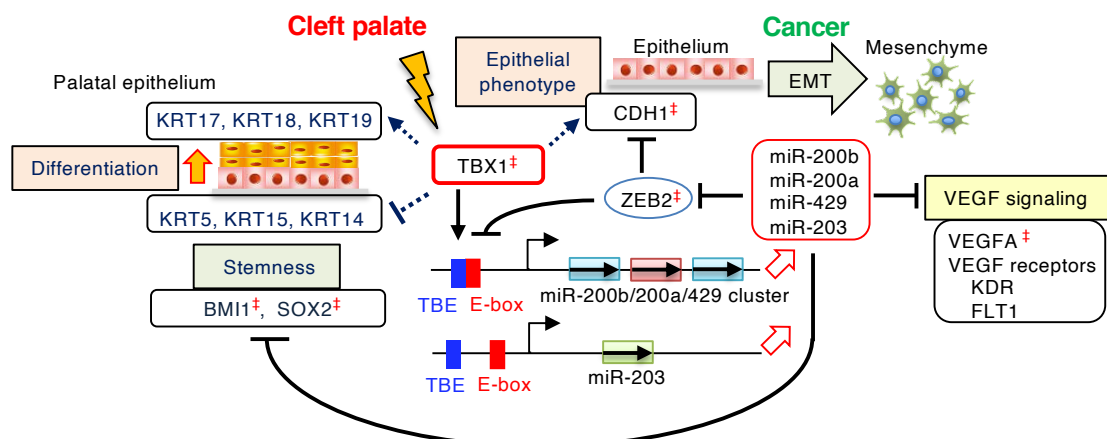
TBX1を安定発現させた扁平上皮癌由来細胞株を確立し、TBX1が細胞移動・浸潤などの形質を転換させることを確認した。そのため、同細胞株でフローサイトメーター等を用いた特性解析等を行い、扁平上皮癌の形質転換に対するTBX1の機能を解析した。

4. 研究成果

申請者らは、昨年度までに、頭蓋底軟骨結合の発生におけるTBX1の役割について研究結果をまとめ、原著論文(査読あり国際誌、オープンアクセス含む)および総説(査読あり国際誌、オープンアクセス)を発表している(船戸ら, *J Dent Res*, 2020; 船戸ら, *Front Cell Dev Biol*, 2020; 船戸ら, *Int J Mol Sci*, 2022)。さらに、本研究課題であるDiGeorge症候群/22q11.2欠失症候群について、遺伝的および顎顔面形態の臨床的側面からまとめた総論(査読あり国際誌、オープンアクセス)を発表した(船戸, *J Dev Biol*, 2022)。また、書籍2冊に寄稿し、出版された。さらに、ネアンデルタール人から変化した一塩基多型がTBX1の発現およびホモ・サピエンスに特徴的な頭蓋底形態に寄与に関与する可能性を見出した(*Am J Hum Genet*, 2024; 査読あり国際誌、オープンアクセス)。



TBX1は口蓋突起粘膜上皮の増殖や極性に関与する(船戸ら, *Hum Mol Genet*, 2012)。そこで、TBX1がmiRNA群の発現に関与するのではないかという仮説のもと、TBX1の標的となるmiRNAを探索したところ、TBX1は口蓋形成においてmiR-200—ZEB2軸を標的にすることが明らかとなった。そこで、上皮間葉転換におけるTBX1の新たな機能を解析するとともに、TBX1によるmiRNAの発現および転写制御ネットワークを*in vitro*および*Tbx1*ノックアウトマウスの口蓋板を用いた*in vivo*にて解析した(船戸ら, *Sci Rep*, 2022)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Funato Noriko, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 12
2. 論文標題 TBX1 targets the miR-200-ZEB2 axis to induce epithelial differentiation and inhibit stem cell properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24604-9	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 Taga Yuki, Iwasaki Yu, Tometsuka Chisa, Funato Noriko, Shigemura Yasutaka, Kusubata Masashi, Mizuno Kazunori	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of a highly stable bioactive 3-hydroxyproline-containing tripeptide in human blood after collagen hydrolysate ingestion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Science of Food	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41538-022-00144-4	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 Funato Noriko	4. 巻 10
2. 論文標題 Craniofacial Phenotypes and Genetics of DiGeorge Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 18 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jdb10020018	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 Funato Noriko	4. 巻 10
2. 論文標題 Craniofacial Phenotypes and Genetics of DiGeorge Syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 18 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jdb10020018	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 Yuki Taga, Yu Iwasaki, Chisa Tometsuka, Noriko Funato, Yasutaka Shigemura, Masashi Kusubata, and Kazunori Mizuno	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of a highly stable bioactive 3-hydroxyproline-containing tripeptide in human blood after collagen hydrolysate ingestion.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj Science of Food.	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) なし	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 Funato N., Srivastava D., Shibata S., Yanagisawa H.	4. 巻 99
2. 論文標題 TBX1 Regulates Chondrocyte Maturation in the Spheno-occipital Synchondrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1182 ~ 1191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520925080	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 Funato Noriko	4. 巻 8
2. 論文標題 New Insights Into Cranial Synchondrosis Development: A Mini Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00706	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 Funato Noriko, Taga Yuki, Laurie Lindsay E., Tometsuka Chisa, Kusubata Masashi, Ogawa-Goto Kiyoko	4. 巻 21
2. 論文標題 The Transcription Factor HAND1 Is Involved in Cortical Bone Mass through the Regulation of Collagen Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8638 ~ 8638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228638	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 Tometsuka Chisa、Funato Noriko、Mizuno Kazunori、Taga Yuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Long-term intake of ginger protease-degraded collagen hydrolysate reduces blood lipid levels and adipocyte size in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Research in Food Science	6. 最初と最後の頁 175 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crfs.2021.03.003	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 -

1. 著者名 Funato Noriko、Heli?vaara Arja、Boeckx Cedric	4. 巻 111
2. 論文標題 A regulatory variant impacting TBX1 expression contributes to basicranial morphology in Homo sapiens	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 939 ~ 953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2024.03.012	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 該当する

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 多賀 祐喜、岩崎 優、遠目塚 千紗、船戸 紀子、重村 泰毅、楠畑 雅、水野 一乗
2. 発表標題 新規コラーゲン由来ペプチドGly-3Hyp-4Hypの血中濃度は摂取するコラーゲン加水分解物の由来組織によって大きく異なる
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 遠目塚 千紗、船戸 紀子、水野 一乗、多賀 祐喜
2. 発表標題 生姜酵素分解コラーゲンペプチドの長期摂取がもたらす脂質代謝への有益な作用
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Noriko Funato, Yuki Taga, Lindsay E. Laurie, Chisa Tometsuka, Masashi Kusubata, Kiyoko Ogawa-Goto.
2. 発表標題	The bHLH transcription factor HAND1 is involved in cortical bone volume through the regulation of collagen expression.
3. 学会等名	the 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research 2020.11.07 Online (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	船戸紀子、Deepak Srivastava、柴田俊一、柳沢裕美
2. 発表標題	転写因子TBX1は頭蓋底軟骨結合発生においてRUNX2下流シグナルを調節する
3. 学会等名	第62回歯科基礎医学会学術大会 WEB開催 2020.9.20
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Funato N, Srivastava D, Shibata S, Yanagisawa H.
2. 発表標題	TBX1 suppresses transcriptional activity of RUNX2 and regulates chondrocyte maturation.
3. 学会等名	Cell Bio Virtual 2020-An Online ASCB EMBO Meeting, Dec. 2020 (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	多賀祐喜、岩崎優、船戸紀子、重村泰毅、水野一乗
2. 発表標題	コラーゲン加水分解物経口摂取後のヒト血中における3-hydroxyproline含有トリペプチドの同定
3. 学会等名	栄養食糧学会 2020.9.20 Web開催
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 船戸 紀子
2. 発表標題 DiGeorge症候群疾患遺伝子TBX1は口蓋形成においてmiR-200-ZEB2軸を標的にする.
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noriko Funato, Hiromi Yanagisawa.
2. 発表標題 TBX1 associated with DiGeorge syndrome targets the miR-200-ZEB2 axis.
3. 学会等名 Gordon Research Conference (Human Genetics and Genomics) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 新井 克彦、服部 俊治	4. 発行年 2021年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 454
3. 書名 細胞外マトリックス実験法	

1. 著者名 Kevin V. Urbano (Editor)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Nova Science Publishers, Inc.	5. 総ページ数 159
3. 書名 Advances in Genetics Research. Vol 21	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ScienceDaily, 2024年04月
 Genetic variant identified that shaped the human skull base
<https://www.sciencedaily.com/releases/2024/04/240417131055.htm>

EurekAlert! (日本語), 2024年04月
 「ホモ・サピエンスに特徴的な頭蓋底形態に寄与するゲノム変化を解析」 ネアンデルタール人から変化したヒト染色体22q11.2領域の一塩基多型
<https://www.eurekalert.org/news-releases/1041357?language=japanese>

TMDU Press Release, 2024年04月
 Genetic variant identified that shaped the human skull base
<https://www.tmd.ac.jp/english/press-release/20240412-1/>

EurekAlert!, 2024年04月
 Genetic variant identified that shaped the human skull base
<https://www.eurekalert.org/news-releases/1041357/>

日本の研究.com プレスリリース, 2024年04月
 「ホモ・サピエンスに特徴的な頭蓋底形態に寄与するゲノム変化を解析」 ネアンデルタール人から変化したヒト染色体22q11.2領域の一塩基多型
<https://research-er.jp/articles/view/132663>

東京医科歯科大学 プレスリリース, 2024年04月
 「ホモ・サピエンスに特徴的な頭蓋底形態に寄与するゲノム変化を解析」【船戸紀子 准教授】
<https://www.tmd.ac.jp/english/press-release/20240412-1/>

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	柴田 俊一 (Shibata Shunichi) (80187400)	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		
フィンランド	Helsinki University		
スペイン	University of Barcelona		