

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H04841

研究課題名（和文）転写プラットフォーム因子Zfhxファミリーによる骨格形成の時空間的制御機構の解明

研究課題名（英文）Spatio-temporal regulation of skeletal development by the Zfhx family of transcription platform factors.

研究代表者

西村 理行（Nishimura, Riko）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60294112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 32,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトを始め脊椎動物の骨格は、膜性骨形成と内軟骨性骨形成の異なる2つの様式から形成され、骨格形成に必要な遺伝子発現をダイナミックに変動させ、未分化間葉系幹細胞の骨芽細胞あるいは軟骨細胞への分化、成熟を促す。本研究により転写因子Zfhxファミリーによる脊椎動物における骨格形成の新たな制御機構の一端が明らかになった。Zfhxファミリーが、骨形成および軟骨形成に必須な転写因子Runx2およびOsterixと連動して、これら転写因子のプラットフォームとして機能していることが明らかとなった。またZfhx3およびZfhx4は、代償的に骨形成および軟骨形成を制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜性骨形成および内軟骨性骨形成過程がどのようなメカニズムで細胞あるいは遺伝子レベルで連続的かつダイナミックに制御されているかは不明であったが、本研究により、転写因子ZfhxファミリーがRunx2やOsterixと協調し、これら転写因子のプラットフォームとして機能することが示され、骨格制御過程における新規概念の創出に貢献した。この新規概念は、他の組織の臓器の発生あるいは再生過程の理解にも貢献できると期待される。また本研究は、ヒト骨格形成異常疾患の病因解明とその病態の理解にも寄与し、社会的意義にも寄与すると思われる。

研究成果の概要（英文）：The human and other vertebrate skeletons are formed from two distinct modes of osteogenesis, membranous and endochondral osteogenesis, which dynamically fluctuate gene expression required for skeletal development and the differentiation and maturation of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts or chondrocytes. This study reveals a novel regulatory mechanism of vertebrate skeletogenesis by the Zfhx family of transcription factors, which, in conjunction with the transcription factors Runx2 and Osterix, which are essential for osteogenesis and cartilage formation, function as a platform for these transcription factors. The Zfhx family functions as a platform for these transcription factors in conjunction with Runx2 and Osterix, which are essential for bone and cartilage formation. Zfhx3 and Zfhx4 were also suggested to regulate osteogenesis and cartilage formation in a compensatory manner.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨格形成 軟骨代謝 骨代謝 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトを始め脊椎動物の骨格は、膜性骨形成と内軟骨性骨形成の異なる2つの様式から形成される。膜性骨形成では、未分化間葉系幹細胞が、骨芽細胞に分化、成熟し、骨基質を産生し、骨形成に必要な遺伝子発現をダイナミックに変動させながら、最終的には形態学的にも機能的にも特徴的な骨細胞に変貌し、分化を終結する。一方、内軟骨性骨形成は、未分化間葉系幹細胞の凝集と軟骨細胞への分化、軟骨細胞の増殖・成熟、軟骨組織の石灰化・分解、血管侵入ならびに骨組織への置換と、多くの複雑なステップから構成されており、この間、軟骨形成に必要な遺伝子の発現も大きく変動する。このように時空間的に大きな変革を呈する骨格形成は、非常にユニークで興味深い生命現象であり、その分子メカニズムの解明は、学術的にも臨床的にも重要な課題である。

骨形成および内軟骨性骨形成過程においては、組織特異的な転写因子が中心的役割を果たしている。内軟骨性骨形成過程においては転写因子 Sox9、Runx2 ならびに Osterix が、膜性骨形成過程においては Runx2 および Osterix が必須的役割を担っている (Nishimura et al. *J Oral Bioscience* 2015; Nishimura et al. *Int J Mol Sci* 2020)。骨あるいは軟骨の形成が円滑に誘導されるためには、これら転写因子が、ヒストン修飾因子、クロマチン制御因子およびスプライシング因子などの転写制御因子と密接に連携することが不可欠である。

研究代表者らは、Sox9、Runx2 および Osterix と結合する数々の転写制御因子群を同定し、その機能解析に成功し、骨格形成過程における転写複合体として、転写ファクトリーの概念の創出に貢献してきた。しかし、これまでの転写ファクトリーに関する研究は、特定時期の限定された標的遺伝子の発現制御機構の解析であり、膜性骨形成および内軟骨性骨形成過程の全般にわたる遺伝子発現調節機構のダイナミズムとそれに伴う骨格形成の時空間的な連続性を理解するには不十分である。特に、Sox9、Runx2 ならびに Osterix を連動させるメカニズムも不明確である。

2. 研究の目的

研究代表者らは、軟骨細胞を RNA-Seq 法にて解析し、マウス肢芽組織およびマウス軟骨細胞に高発現する転写因子として、22 個の Zinc Finger ドメインと 4 個の Homeobox ドメインを有する分子量約 400kd の巨大な転写因子 Zfhx4 の同定に成功した。Zfhx4 の遺伝子ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型を解析すると、内軟骨性骨形成の後期過程の障害を呈することを見出していた。

Zinc Finger ドメインや Homeobox ドメインは様々な転写制御因子や標的遺伝子 DNA に結合することから、これらの機能ドメインを多数有する Zfhx4 が、転写ファクトリーの“ハブ”として機能する可能性が示唆された。また研究代表者らは、Zfhx4 が骨組織および軟骨組織に広範に強い発現を示すことを見出している。したがって Zfhx4 は、骨および軟骨形成の初期から後期の全般渡って機能している可能性が推察される。しかし前述したように Zfhx4 KO マウスは、軟骨形成の前期過程および骨組織で明確な表現型を示さない。その理由として、骨・軟骨で、Zfhx4 の機能を代償する分子が存在すると推測される。その候補として、Zfhx ファミリーの中でも Zfhx4 と最も高い相同性を示し、23 個の Zinc Finger ドメインと 4 個の Homeobox を有する Zfhx3 が、骨格形成過程において代償的に機能している可能性が示唆された。

そこで本研究計画では、1) 骨格制御機構における Zfhx3 および Zfhx4 の機能的役割の解明、2) 骨格形成過程における Zfhx ファミリーの分子作用メカニズムを明らかにして、“転写プラットフォーム因子”としての Zfhx3 および Zfhx4 の作用メカニズムを解明し、骨格形成に必要な遺伝子群の時空間的発現制御ネットワークシステムの理解を目指した。

3. 研究の方法

(1) Zfhx4 KO マウスの骨格形成過程における表現型を病理組織学的および in situ hybridization 法によって解析した。

(2) Zfhx4 と Runx2 および Osterix の相互関係を in vivo および in vitro で解析を行った。

(3) Zfhx3 KO マウスを作製して、その骨格形成過程における表現型を解析した。

(4) Zfhx4 が、様々な転写制御因子と結合し、巨大な複合体を形成している可能性を検証する実験モデルとして、Flag タグおよび発光タグ HiBiT タグを翻訳開始直下に導入した、Flag-HiBiT-KI マウスを CRISPR/Cas9 ゲノム編集法にて作製した (図 1)。

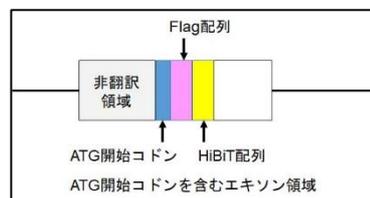


図 1 Flag-HiBiT Zfhx4 KI マウスのデザイン

4. 研究成果

(1) Zfhx4 KO マウスで観察された内軟骨性骨形成の遅延が、Osterix KO マウスの表現型の非常に近似していたことから、Zfhx4 KO マウスのさらに詳細な解析を行った。その結果、Zfhx4

KO マウスは、内軟骨性骨形成過程の石灰化、MMP13 の発現、軟骨基質の分解に障害を有していることが詳細に確認された。また分子生物学的手法により、Zfhx4 が Osterix および Runx2 と転写複合体を形成していることが示された。Zfhx4 と Osterix の相互関係は、in vivo でも明らかとなった。また Zfhx3 も Osterix と結合ならびに核内で共局在することが確認された。以上の実験結果から、Zfhx4 は、Runx2 および Osterix と連動して、内軟骨性骨形成を制御する転写プラットフォームとして機能していると示唆された(図2)。また Zfhx3 も同様な分子機構を有していると示唆された。

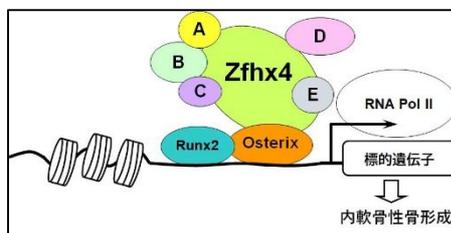


図2 Zfhx4 が構成する転写複合体

(2) Zfhx3 KO マウスを作製するために、まず翻訳開始の開始コドンを含むエキソン部分を欠損する遺伝子変異マウスを CRISPR/Cas9 法で作製した。この Zfhx3 遺伝子ヘテロ欠損マウスは交配可能であり、Zfhx3 ホモ欠損マウスを得た。しかしながら、この Zfhx4 KO マウスは、マウ口的に正常であり、顕著な表現型を示さなかった。この表現型は、既報の Zfhx3 遺伝子ヘテロ欠損マウスの表現型からも想定外であった。したがって、Zfhx3 は複数のアイソフォームを有しており、開始コドンの欠失では、Zfhx3 KO マウスの作製に適していないと考えられた。そこで、Zfhx3 の多くの機能ドメインを欠失する遺伝子欠損マウスのデザインを再設計して、CRISPR/Cas9 法で、新たな Zfhx3 KO マウスを作製した。その結果、この Zfhx3 遺伝子ヘテロ欠損マウスの多くは、胎生期あるいは生後間もなく致死に至ることが多く、成体の Zfhx3 KO マウスを作製することが困難であった。この点を解決するために、Zfhx3 ヘテロ遺伝子欠損マウス同士を交配し、胎生 15.5 日齢で PCR 法による genotyping を確認後、Zfhx3 KO マウスの骨格標本を作製して解析した。Zfhx3 KO マウスは同腹野生型マウスと比較して、dwarf 様表現型を示し、骨格形成が遅延している傾向を示した。したがって、Zfhx3 も骨形成あるいは軟骨形成に重要な転写因子として機能している可能性が示唆された。

Zfhx3 および Zfhx4 のダブル KO マウスを作製するために、Zfhx3 ヘテロマウスと Zfhx4 ヘテロマウスを交配し、Zfhx3;Zfhx4 ダブルヘテロマウスを作製した。しかしながら、Zfhx3;Zfhx4 ダブルヘテロマウスは、得られなかった。Zfhx3 ヘテロマウスと Zfhx4 ヘテロマウスを交配したマウスを胎生 15.5 日齢で解析した結果、Zfhx3;Zfhx4 ダブルヘテロマウスが存在していた。したがって、この実験結果からも Zfhx3 と Zfhx4 が代償的に機能していることが推察された。

(3) 上記の結果より、骨格形成過程における Zfhx3 および Zfhx4 の双方の機能を解析するために、Zfhx3 および Zfhx4 の flox マウスの作出が必要であると考えられる。すでに、Zfhx4 flox マウスは、conventional な相同組換えを用いて作製しているので、CRISPR/Cas9 ゲノム編集法にて Zfhx3 flox マウスの作製を行った。まず、Zfhx3 の多くの機能ドメインを欠失するように、1 つ目の loxP 配列の挿入を行った。PCR 法および DNA シークエンス解析により、その挿入を確認後、第一 step のマウス同士を交配し、第一 step の遺伝子改変マウスのホモマウスを作出し、そのマウスの受精卵を用いて、第二 step の loxP 配列の挿入を CRISPR/Cas9 ゲノム編集法にて行った(図3)。作製した Zfhx3 flox マウスは、骨および軟骨組織に加えて、他の組織や臓器における Zfhx3 の機能解析を行う優れたマウスモデルであると考えられる。

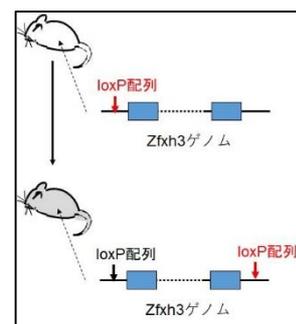


図3 Zfhx3 flox マウスの作製

(4) CRISPR/Cas9 ゲノム編集法で作製した、Flag-HiBiT Zfhx4 KI マウスの導入を確認するために、PCR 法および PCR 産物を用いた DNA シークエンスにて、genotyping を行った。その結果、DNA レベルでは、目的どおりに Flag タグおよび HiBiT タグが導入されていることを確認できた。次に、Flag-HiBiT Zfhx4 タンパク質が発現しているかを確認するために、Flag-HiBiT Zfhx4 KI マウスから組織を採取し、そのタンパク質を可溶化させ、HiBiT 活性を測定した。Flag-HiBiT Zfhx4 KI マウスから採取した組織では、極めて高い HiBiT 活性を確認できた。したがって、このようにタグを挿入し、その確認を行うために HiBiT タグを付与しておくことは、非常に有効であることが示された。特に、大量のサンプルからタグ導入を確認する場合には、非常に有力な手法であると考えられる。次に、Flag-HiBiT Zfhx4 が予想される正しい分子量のタンパク質のサイズを発現するか否かを HiBiT を用いたウエスタンブロッティング発光法にて検索した。その結果、Flag-HiBiT Zfhx4 は、予測されるほぼ同サイズに検出できた。そこで、Zfhx4 が構成する転写複合体あるいは DNA 複合体を解析することが可能か否かを検証するために、抗 Flag 抗体あるいは抗 HiBiT 抗体にて免疫沈降法とウエスタンブロッティング法にて解析した。しかしながら、これら抗体による免疫沈降サンプル中に、Flag-HiBiT Zfhx4 を確認することはできなかった。この理由の一つとして、Flag-HiBiT Zfhx4 KI マウスは、Flag-HiBiT Zfhx4 タンパク質を発現しているものの、native なタンパク質では、N 末端部分が立体構造的に埋もれてしまうために、Flag-HiBiT Zfhx4 タンパク質の抗原部位に、抗体がアクセスできない可能性が想定された。タンパク質立体構造予測 AI 解析にて、Zfhx4 の立体構造を解析したが、明確な立体構造を得ることはできなかった。これらの課題を解決するためには、上記の抗体での免疫沈降後、免疫沈降サンプルを質量分析する必要が考えられた。また、新たに Zfhx4 の C 末端に Flag-HiBiT 配列を挿入した、Zfhx4-Flag-HiBiT マウスの作製も有効で

あると考えられた。

(5) Zfhx4 KO マウスでは、口蓋裂が 100% の浸透度で観察された。この現象は、Palatal shelf の挙上不全によるものであり、Palatal shelf を構成する細胞の増殖やアポトーシスに起因することではないことが、組織学的解析によって確認できた。一方、Zfhx3 KO マウスでは口蓋裂は観察されていない。したがって、Palatal shelf における Zfhx3 および Zfhx4 の機能は、代償的でなく、この現象は組織に依存すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Murakami Tomohiko, Ruengsinpinya Lerdluck, Takahata Yoshifumi, Nakaminami Yuri, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 13
2. 論文標題 HOXA10 promotes Gdf5 expression in articular chondrocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-50318-7	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
1. 著者名 Murakami Tomohiko, Takahata Yoshifumi, Hata Kenji, Ebina Kosuke, Hirose Katsutoshi, Ruengsinpinya Lerdluck, Nakaminami Yuri, Etani Yuki, Kobayashi Sachi, Maruyama Takashi, Nakano Hiroyasu, Kaneko Takehito, Toyosawa Satoru, Asahara Hiroshi, Nishimura Riko	4. 巻 15
2. 論文標題 Semaphorin 4D induces articular cartilage destruction and inflammation in joints by transcriptionally reprogramming chondrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	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） 10.1126/scisignal.abl5304	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 Inubushi Toshihiro, Nakanishi Yuichiro, Abe Makoto, Takahata Yoshifumi, Nishimura Riko, Kurosaka Hiroshi, Irie Fumitoshi, Yamashiro Takashi, Yamaguchi Yu	4. 巻 18
2. 論文標題 The cell surface hyaluronidase TMEM2 plays an essential role in mouse neural crest cell development and survival	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	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） 10.1371/journal.pgen.1009765	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
1. 著者名 Yagi Hiroko, Takahata Yoshifumi, Murakami Tomohiko, Nakaminami Yuri, Hagino Hiromasa, Yamamoto Shiori, Murakami Shinya, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 40
2. 論文標題 Transcriptional regulation of FRZB in chondrocytes by Osterix and Msx2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 723~734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-022-01345-3	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 Omatsu Yoshiaki, Aiba Shota, Maeta Tomonori, Higaki Kei, Aoki Kazunari, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Nishimura Riko, Takeda Shu, Chung Ung-il, Nagasawa Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Runx1 and Runx2 inhibit fibrotic conversion of cellular niches for hematopoietic stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-022-30266-y	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 Takahata Yoshifumi, Hagino Hiromasa, Kimura Ayaka, Urushizaki Mitsuki, Yamamoto Shiori, Wakamori Kanta, Murakami Tomohiko, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 23
2. 論文標題 Regulatory Mechanisms of Prg4 and Gdf5 Expression in Articular Cartilage and Functions in Osteoarthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4672 ~ 4672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23094672	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 Takahata Yoshifumi, Hagino Hiromasa, Kimura Ayaka, Urushizaki Mitsuki, Kobayashi Sachi, Wakamori Kanta, Fujiwara Chika, Nakamura Eriko, Yu Kayon, Kiyonari Hiroshi, Bando Kana, Murakami Tomohiko, Komori Toshihisa, Hata Kenji, Nishimura Riko	4. 巻 4
2. 論文標題 Smoc1 and Smoc2 regulate bone formation as downstream molecules of Runx2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	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) 10.1038/s42003-021-02717-7	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 Nakamura Eriko, Hata Kenji, Takahata Yoshifumi, Kurosaka Hiroshi, Abe Makoto, Abe Takaya, Kihara Miho, Komori Toshihisa, Kobayashi Sachi, Murakami Tomohiko, Inubushi Toshihiro, Yamashiro Takashi, Yamamoto Shiori, Akiyama Haruhiko, Kawaguchi Makoto, Sakata Nobuo, Nishimura Riko	4. 巻 4
2. 論文標題 Zfhx4 regulates endochondral ossification as the transcriptional platform of Osterix in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	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) 10.1038/s42003-021-02793-9	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 Katada Ryogo, Tanaka Junichi, Takamatsu Koki, Hata Kenji, Yasuhara Rika, Ohnuma Shintaro, Takakura Ikuko, Nishimura Riko, Shiota Tatsuo, Mishima Kenji	4. 巻 586
2. 論文標題 Induction of salivary gland-like cells from epithelial tissues transdifferentiated from mouse embryonic fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.064	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 西村 理行
2. 発表標題 軟骨の形成および疾患における転写制御機構の役割
3. 学会等名 日本軟骨代謝学会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西村 理行
2. 発表標題 歯学からの「未来の学術振興構想」
3. 学会等名 日本学術会議シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kobayashi S, Hata K, Takahata Y, Murakami T, Uzawa N, Nishimura R.
2. 発表標題 Identification of Chondrocyte-specific Sox9 Enhancers Important for Skeletal Development
3. 学会等名 ASBMR 2021 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 紗知, 波多 賢二, 高畑 佳史, 村上 智彦, 西村 理行
2. 発表標題 軟骨細胞におけるSox9遺伝子のエンハンサー領域の同定と機能解析
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hata K, Ono K, Nakamura E, Kobayashi S, Takahata Y, Murakami T, Nishimura R
2. 発表標題 Dmrt2 promotes transition of endochondral ossification by linking Sox9 and Runx2
3. 学会等名 48th annual meeting of the European Calcified Tissue Society ((国際学会))
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Riko Nishimura and Hendrik Terheyden	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Quintessence Publishing Deutschland	5. 総ページ数 -
3. 書名 Cell-to-Cell Communication; Cell Atlas; Visual Biology in Oral Medicine	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	村上 智彦 (Murakami Tomohiko) (50510723)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	高畑 佳史 (Takahata Yoshifumi) (60635845)	大阪大学・大学院歯学研究科・助教 (14401)	
研究分担者	波多 賢二 (Hata Kenji) (80444496)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	

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