様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　６ 月　７ 日現在

機関番号：８２４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０９７８４

研究課題名（和文）CtBPが司る遺伝子制御ネットワークの解明：合指症治療標的の同定を目指して

研究課題名（英文）Elucidation of gene network organized by CtBP1/2 in mouse limb development

研究代表者
薬師寺　那由他（Yakushiji-Kaminatsui, Nayuta）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：７０５６５３１６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：共役抑制因子として知られるCtBP1/2を肢芽特異的に欠損したマウスは合指症に非常によく似た表現型を示すが、どのような遺伝子ネットワークの破綻が原因となっているのかは不明のままであった。1細胞多層解析の実施により、Ctbp1/2欠損型の肢芽ではAldh1a2遺伝子の発現が有意に減少していたことから、指間細胞死を制御するレチノイン酸シグナルが不足していることが明らかとなった。そこで母獣を通して胎仔へレチノイン酸を投与したところ、指先での癒合の部分的な緩和が認められた。また、Aldh1a2の発現誘導にはHOX13が必要であるが、CtBP1/2はHOX13の下流で作用することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
合指症は生まれつき隣り合った指が癒合した状態であり、外科手術による治療が一般的である。Hoxd13の変異が発症原因として知られているタイプもあるが、多くのタイプでは原因がよくわかっていないのが現状である。本研究成果から、Aldh1a2遺伝子の発現低下に起因する指間細胞死の誘導不全が合指症の原因の一つとなりうることが示された。これにより、胎仔期のレチノイン酸投与による療法だけでなく、局所的に細胞死を誘導することができれば、新しい治療法の開発に繋がると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Deletion of a known co-repressor, Ctbp1/2, in a limb bud-specific manner resulted in a phenotype that was very similar to that of syndactyly, however, it remained unclear which gene network failure could be responsible. By performing the single cell multiome analysis, we found that Aldh1a2 expression was significantly reduced in Ctbp1/2-dKO limb bud, suggesting that Retinoic acid signaling, which regulates the interdigital cell death, was insufficient under the lack of CtBP1/2. We went onto assess whether administration of Retinoic acid to the fetus via mother could rescue the syndactyly phenotype and found a partial alleviation of digital fusion at distal tip. We also revealed that CtBP1/2 works as a potential co-factor of HOX13 and HOX13-dependent activation of Aldh1a2 requires CtBP1/2. In this research, we newly propose that CtBP1/2 and HOX13 potentially interact to facilitate the appropriate autopod patterning.

研究分野：発生生物学

キーワード：エピジェネティクス　四肢形成　合指症　ポリコム複合体　CtBP1/2

※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

ポリコム複合体はクロマチン修飾や DNA 凝縮を介して標的遺伝子の発現を抑制することで、胚発生過程における細胞の多様な分化運命を制御する。申請者はこれまで、ポリコム複合体がマウスの四肢形成を制御していることを明らかにしてきた。その過程で、ポリコム複合体欠損型マウスとその共役抑制因子である CtBP1/2 欠損型マウスが、それぞれ先天性四肢障害であるアザラシ肢症や合指症によく似た表現型を示すことを見出した。隣り合った指が生まれつき癒合した状態である合指症は、症状の度合いから複数のタイプに分類されている。しかし、そのほとんどにおいて発症原因はわかっていないことから、申請者は CtBP1/2 欠損型マウスを疾患モデル動物として合指症発症機構の解明に取り組んできた。

これまでにコントロールおよび *Ctbp1/2* 欠損型マウス肢芽を用いてバルクレベルでの遺伝子発現解析を実施し、CtBP1/2 によって制御される発現変動遺伝子を同定した。しかし、当初同定された遺伝子群は四肢形成との関連が不明なものが多く、これらが実際にどのような遺伝子カスケードをもたらすことで適切な四肢形成に寄与しているのか、については不明のままであった。この一因として、これまで行ったバルク解析では分化状態の異なる細胞集団で見られる変化を平均化して評価したため、大きな変化を示した遺伝子にだけ注目し、微量な遺伝子変化を見落としていた可能性が挙げられる。*Ctbp1/2* 欠損型マウスの表現型が非常に局所的であることからも、CtBP1/2 が制御する遺伝子発現ネットワークの解明には 1 細胞レベルでの解析が必須であると考えられた。

２．研究の目的

そこで、本研究では 1 細胞解析を実施し、CtBP1/2 が制御する遺伝子発現ネットワークを解明することで、CtBP1/2 を起点とする合指症発症の機序を理解し、その治療標的を同定することを主たる目的とした。また、CtBP1/2 は転写因子との結合を介して特定のゲノム領域に繋留することで、ポリコム複合体を含む複数のクロマチン制御因子と作用することが知られている。しかし、全身性欠損型マウスは胎生致死を示すことから、器官形成においてどのような分子基盤を持っているのか、その生物学的意義については不明のままである。組織特異的欠損型マウスを用いた本研究では、肢芽形成過程における CtBP1/2 の分子・機能アノテーションを行うことが可能である。そのため、細胞分化・器官形成における CtBP1/2 の分子機構の実態についてもクロマチンプロファイリングから明らかにすることを目指す。

３．研究の方法

(1) 合指症の表現型をもたらす原因遺伝子候補の探索

コントロールと *Ctbp1/2* 欠損型マウスの 11.5 日胚の肢芽全体を用いて、遺伝子発現とオープンクロマチン解析を組み合わせた 1 細胞多層解析を実施した（シングルセルマルチオーム ATAC+遺伝子発現, 10x Genomics）。ここから得られる結果と、これまでのバルクレベルでの遺伝子発現解析の結果、および CtBP2 抗体を用いたクロマチンプロファイリング（CUT&Tag)の結果を合わせることで、CtBP1/2 喪失に直接起因し、かつ表現型の原因となりうる候補遺伝子を探索した。

(2) 原因遺伝子候補の下流カスケード正常化による表現型回復の試み

(1)で探索した候補遺伝子群の中で、上位で作用しうる遺伝子があるかどうかを明らかにし、その遺伝子によって制御されるシグナル伝達経路を補完することで、合指症に似た表現型が緩和するかどうかを検証した。具体的には、母獣を通して *Ctbp1/2* 欠損型マウス胚（11.5 日胚)へ原因遺伝子候補の阻害剤、あるいは活性化薬剤を投与することで、合指症の表現型が緩和するかどうかを観察した。

(3) 肢芽形成過程における CtBP1/2 の分子基盤の解明
バルクレベルでの遺伝子発現解析の結果と CtBP2 の CUT&Tag の結果から、CtBP2 が蓄積するゲノム領域におけるモチーフ解析を実施し、CtBP2 が結合しうる転写因子の探索を行なった。また、CtBP2 が相互作用するクロマチン制御因子を同定するため、マウス ES 細胞から胚様体の誘導過程で質量分析を実施した。これらの転写因子とクロマチン制御因子を認識する抗体を用いて、肢芽における CUT&Tag を実施し、CtBP1/2 欠損下でのゲノム上での蓄積にどのような影響が生じているかを解析した。

４．研究成果
(1) 合指症の表現型をもたらす原因遺伝子候補の探索
1 細胞多層解析には 11.5 日胚の肢芽全体を用いたことから、遺伝子発現の状態とオープンクロマチンの情報からどこまで肢芽組織内の位置情報を再構築できるか、についてまず検証を行った。肢芽先端部で発現する *Hoxd13* 遺伝子（図 1A)、肢芽の基部から先端部にかけて 3 ヶ所で発現する *Aldh1a2* 遺伝子（図 1A)、また肢芽の後端部で発現する *Shh* 遺伝子を含む、複数のマーカー遺伝子の発現に着目し、UMAP による解析を実施した。その結果、UMAP 図における各遺伝子の発現は、肢芽における位置情報に対応するような分布を見せていることがわかった（図 1B)。次に、各クラスターで優位に変動している遺伝子群の中でも、遺伝子オントロジーで四肢形成に関与しているもので、かつ CUT&Tag の結果から CtBP2 の標的となっている遺伝子群に着目したところ、多くのクラスターで発現上昇するものとして *Evx2* 遺伝子、*Dab1* 遺伝子を、発現減少するものとして *Aldh1a2* 遺伝子, *Gdf5* 遺伝子をそれぞれ見出した（図 1C)。

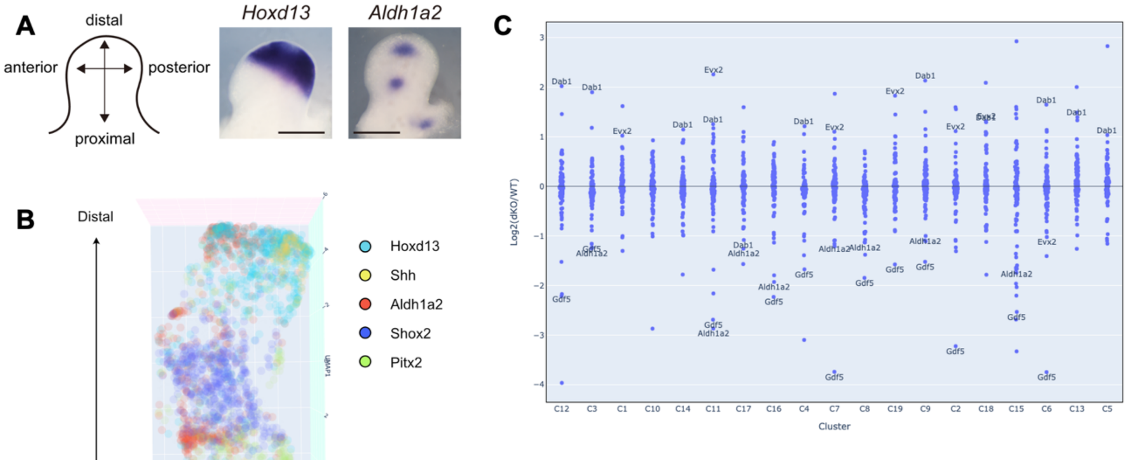

図1：UMAPによる位置情報再構築. (A) 11.5日胚の肢芽におけるHoxd13とAldh1a2の発現パターン. (B)マーカー遺伝子の発現に着目したUMAP図. (C) 多くのクラスターで共通して見られた、四肢形成に関与する発現変動遺伝子.

これらの遺伝子の中でも、特に *Aldh1a2* 遺伝子は指間細胞死を制御するレチノイン酸の産生に必要であることが報告されていることから、*Ctbp1/2* 欠損型の肢芽における *Aldh1a2* 遺伝子の発現低下が合指症に似た表現型をもたらしている可能性が示唆された。また、肢芽先端部での *Aldh1a2* 遺伝子の発現は 11.5 日胚から徐々に発現が強くなることから、当初実施したバルクレベルでの遺伝子発現解析ではサンプル間のばらつきが大きく、有意な変動遺伝子としては検出できていなかった。そのため、1 細胞での解析は原因遺伝子候補の探索に高い有効性を持つことが改めて実証された。これらの結果をもとに、次に *Aldh1a2* 遺伝子の発現パターンと指間細胞死の状態を *in situ* hybridization 法と LysoTracker を用いてそれぞれ調べた。その結果、*Ctbp1/2* 欠損型肢芽において、*Aldh1a2* 遺伝子の発現は肢芽先端部と中央部において有意に減少していること、細胞死を示すシグナルは第 2 指から第 4 指にかけてほとんど検出できないことを、それぞれ確認した。

(2) 原因遺伝子候補の下流カスケード正常化による表現型回復の試み

CtBP1/2 欠損下でのレチノイン酸シグナルの不足が、合指症に似た表現型をもたらしている可能性を検証するため、次に母獣を通して *Ctbp1/2* 欠損型マウス胚にレチノイン酸を投与することで、表現型が緩和するかどうかを調べた。発生過程におけるレチノイン酸の投与は、四肢の基部先端部軸の骨格形成に影響を与えることがわかっている。そのため、本研究では投与するレチノイン酸はコントロール型ではほとんど影響が出ないような低濃度にし、11.5 日胚で 1 回のみの投与とした。17.5 日胚で回収し、骨格標本を作製し、四肢の形態を観察したところ、未処理群の *Ctbp1/2* 欠損型では指骨先端部での癒合が第 1 指から 3 指にかけて見られるのに対して（図 2 上段)、投与群ではその癒合の程度が緩和する傾向にあることが明らかとなった（図 2 下段)。これらの結果は、合指症に似た表現型がレチノイン酸シグナルの不足に起因した指間細胞死の不全によってもたらされている可能性を「部分的」に裏付けるものであった。

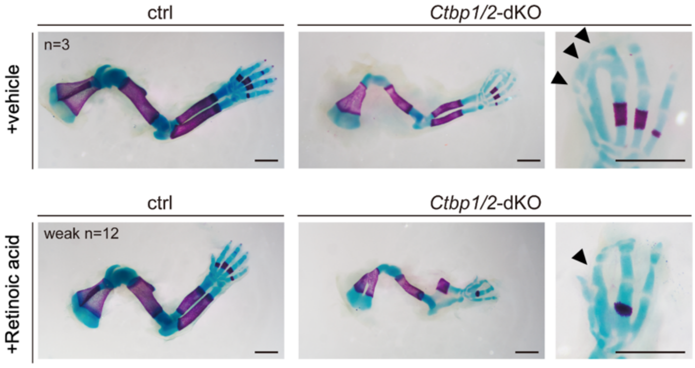

図2：レチノイン酸投与による表現型への影響 (17.5日胚).
未処理群 (上段)では、*Ctbp1/2*欠損型では第1指から第3指先端部での癒合がみられる. 投与群 (下段)では、*Ctbp1/2*欠損型では先端部での癒合は部分的に緩和した.

しかしながら、軛脚部の短縮や指の本数の減少といった、これまでに発生していなかった別の表現型まで誘発されたことから、投与濃度と投与期間といった処理条件の改善が今後の大きな課題となった。

(3) 肢芽形成過程における CtBP1/2 の分子基盤の解明

遺伝子発現解析と CtBP2 のクロマチンプロファイリングの結果から、CtBP2 の直接的な標的遺伝子であり、かつ *Ctbp1/2* 欠損型肢芽で発現が変動する遺伝子にのみに着目してモチーフ解析を実施し、CtBP2 が結合しうる転写因子の探索を行なった。その結果、HOXA13/HOXD13 が候補としてあがってきた。実際に CtBP2 と HOX13 の蓄積領域がどこまで重複しているかを確認するため、HOXA13 を認識する抗体を用いて CUT&Tag を行なったところ、CtBP2 と HOXA13 の蓄積領域の重複は全体の 6 割程度であることを見出した。*Ctbp1/2* 欠損型と、既に報告されている *Hoxa13/d13* 欠損型の肢芽の遺伝子発現データを比較したところ、それぞれの

欠損型では互いの発現量に影響はなかった。これは *Ctbp1/2* 遺伝子、あるいは *Hoxa13/d13* 遺伝子そのものの発現誘導は、相互依存の関係ではないことを示唆するものであった。*Aldh1a2* 遺伝子の誘導は HOXA13/D13 によって制御されることが報告されていたことから、*Aldh1a2* 遺伝子座における HOXA13 の蓄積を確認したところ、コントロール型と *Ctbp1/2* 欠損型の肢芽において HOXA13 の蓄積に大きな変化は見られなかった。同様の傾向は他の遺伝子座でも見られたことから、CtBP1/2 は HOXA13/D13 の下流で作用し、HOXA13/D13 と協働することで標的遺伝子の発現抑制、あるいは活性化に関与している可能性が考えられる。

　また、マウス肢芽を用いた質量分析は細胞数に制約があることから、代わりにマウス ES 細胞から胚様体の分化誘導系を用いて、CtBP2 が相互作用しうるクロマチン制御因子を調べたところ、LSD1-CoREST 複合体が主な候補として同定された。CtBP1/2 欠損下の肢芽において、これらの構成因子のゲノム上での蓄積に影響が生じているかどうかを明らかにするため、CUT&Tag を行なった。その結果、LSD1 や HDAC の蓄積パターンはほとんど影響を受けていなかったことから、LSD1 や HDAC の標的領域へのリクルートメントには CtBP1/2 は関与していないことが示唆された。*Ctbp1/2* 欠損型の肢芽では、H3K27ac のレベルが全体的に上昇する傾向にあったことから、CtBP1/2 は LSD1-CoREST 複合体の酵素活性を微調整するように作用している可能性が考えられる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　3件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Yakushiji-Kaminatsui Nayuta、Kondo Takashi、Ohinata Yasuhide、Takano Junichiro、Koseki Haruhiko	４．巻 -
２．論文標題 Genetic, Genomic, and Imaging Approaches to Dissect the Role of Polycomb Group Epigenetic Regulators in Mice	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Methods in Molecular Biology	６．最初と最後の頁 207～228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-2481-4_10	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 Iwagawa Toshiro、Fukushima Masaya、Takeuchi Shigeru、Kawamura Yuichi、Aihara Yuko、Ozawa Manabu、Yakushiji‐Kaminatsui Nayuta、Aihara Makoto、Koseki Haruhiko、Suzuki Yutaka、Watanabe Sumiko	４．巻 -
２．論文標題 The histone <scp>H3K36</scp> demethylase Fbxl11 plays pivotal roles in the development of retinal late‐born cell types	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Genes to Cells	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） 10.1111/gtc.13028	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 Sugishita Hiroki、Kondo Takashi、Ito Shinsuke、Nakayama Manabu、Yakushiji-Kaminatsui Nayuta、Kawakami Eiryo、Koseki Yoko、Ohinata Yasuhide、Sharif Jafar、Harachi Mio、Blackledge Neil P.、Klose Robert J.、Koseki Haruhiko	４．巻 12
２．論文標題 Variant PCGF1-PRC1 links PRC2 recruitment with differentiation-associated transcriptional inactivation at target genes	５．発行年 2021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/s41467-021-24894-z	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3件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Nayuta Yakushiji-Kaminatsui, Shinsuke Ito, Yoko Koseki, Hiroki Sugishita, Manabu Nakayama, Takashi Kondo, Haruhiko Koseki
２．発表標題 A role for CtBP1/2 proteins during cell differentiation and limb organogenesis
３．学会等名 第56回日本発生生物学会
４．発表年 2023年

１．発表者名 Nayuta Yakushiji-Kaminatsui, Takaho A. Endo, Yoko Koseki, Manabu Nakayama, Haruhiko Koseki
２．発表標題 Potential interaction between CtBP1/2 and HOX13 to facilitate autopod patterning
３．学会等名 EMBO workshop "Limb development: Fundamental mechanisms, evolution, disease and regeneration“（国際学会）
４．発表年 2024年

１．発表者名 藥師寺那由他、遠藤高帆、相下紘貴、古関庸子、中山学、伊藤伸介、近藤隆、古関明彦
２．発表標題 CtBP1/2による合指症発症機構の解明
３．学会等名 日本分子生物学会
４．発表年 2022年

〔図書〕　計0件

〔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

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