

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16953

研究課題名(和文) Foxc1を介した唾液腺初期発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) A comprehensive analysis of ChIP-seq-based Foxc1 target genes in mouse embryonic submandibular gland

研究代表者

行森 茜 (Yukimori, Akane)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60813748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題はFoxc1 ChIP-seqを用いて唾液腺発生段階におけるFoxc1の標的遺伝子を明らかにすることを目的とした。Foxc1 ChIP-seqでは60906個のピーク(推定標的遺伝子14950種)が認められ、推定標的遺伝子は唾液腺の形態形成との関連が示唆された。次に、ChIP-seqデータをRNA-seqデータや過去の文献と比較し、唾液腺発生に関連する標的遺伝子の候補を絞り込んだ。今後は候補となる標的遺伝子の発現変動解析を通じて、Foxc1の標的遺伝子の同定を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題を通じて、唾液腺の初期発生におけるFoxc1の標的遺伝子を推定することが出来た。唾液腺発生に重要な役割を果たす転写因子とされるFoxc1の標的遺伝子が明らかになることによって、唾液腺の初期発生シグナル経路の解明に繋がることが期待される。唾液腺発生メカニズムの解明により、ダイレクトリプログラミングや生体内遺伝子導入など唾液腺再生医療技術開発の基盤的知見を提供することができるものと思われる。また転写因子の相互作用により、胎生期口腔粘膜から唾液腺原基への運命決定が制御されていることを証明できれば、胎生期口腔粘膜を由来とする下垂体や歯の発生研究分野にも重要な知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：To identify putative target genes regulated by Foxc1 in salivary gland development, we performed Foxc1 ChIP-seq in submandibular gland from E16 mice. We found 60906 Foxc1 peaks and 14950 putative target genes. Foxc1 peaks were associated with genes related to salivary gland morphology within Mouse Phenotype. Through the integration of ChIP-seq data, RNA-seq data, and previous reviews, multiple candidates of Foxc1 target genes were predicted. We will try to identify Foxc1 target gene related to the salivary gland development.

研究分野：口腔病理学

キーワード：Foxc1 唾液腺発生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) マウス唾液腺発生研究

マウス唾液腺の発生は、胎生 11.5 日に口腔粘膜上皮の肥厚と間葉側への陥入により開始する。その後、陥入した上皮は伸長と分枝を繰り返し(分枝形態形成)複雑な唾液腺構造が形成される。唾液腺の発生過程では分枝形態形成に関連する因子として、EGF (Nogawa H., et al., Development, 1991) や FGF7 (Patel VN., et al., Development, 2007) などが報告されている。一方、唾液腺発生初期の口腔粘膜上皮の肥厚に関わる因子については未だ十分な解析がなされていない。唾液腺発生メカニズムの解析において胎生期口腔粘膜上皮の肥厚は、唾液腺運命決定への重要なステージであることが予想されるが、これまでほとんど解析されてこなかった。

我々の研究グループではマウス唾液腺発生初期に、Sox9 と Foxc1 が唾液腺原基特異的に高い発現を示すことを見出し、マウス ES 細胞由来の口腔粘膜に Sox9 と Foxc1 を過剰発現させることで、胎生期唾液腺に類似した唾液腺オルガノイドを誘導可能であることを報告した(Tanaka J., et al., Nat commun, 2018)。これらの結果から、唾液腺発生初期に起きる口腔粘膜の肥厚に Sox9 と Foxc1 が重要である可能性は極めて高い。唾液腺発生における Sox9 の機能については、既に Sox9 コンディショナル KO マウスの解析がなされ、唾液腺および涙腺が形成されないことが報告されている(Chatzeli L., et al., Development, 2017)。しかしながら、Foxc1 の唾液腺発生における機能の詳細については報告がなされていない。

(2) Foxc1

Foxc1 の機能としては、各種コンディショナル KO マウスの解析により眼や骨格 (Kume T., et al., Cell, 1998)、心臓 (Kume T., et al., Genes Dev, 2001) の発生において機能的な転写因子のひとつであることが示されている。加えて、乳癌では *in silico* の解析より Sox9 と Foxc1 が複合体を形成して下流遺伝子を活性化するという報告がなされた (Tang L., et al., Oncogenesis, 2020)。これらの報告から、唾液腺発生過程においても Foxc1 は臓器発生に機能的な転写因子であることが予想され、Sox9 と Foxc1 の相互作用が存在している可能性も想定される。

2. 研究の目的

本研究では、唾液腺発生初期に重要な役割を果たすと考えられる転写因子である Foxc1 に着目し、当該転写因子を介した胎生期口腔粘膜から唾液腺原基への運命決定メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Foxc1 ChIP-seq の施行

C57BL/6J マウスの胎生 16 日顎下腺を採取し、ホルマリン固定後に -80 で凍結保存した(細胞数:約 2×10^7 個)。唾液腺細胞の DNA を超音波で断片化し、断片化された DNA を抗 Foxc1 抗体で濃縮した。濃縮した DNA を次世代シーケンサーで網羅的に解析した。解析内容としては、Foxc1 の DNA 結合部位や、DNA 結合部位近傍遺伝子の GO 解析、Foxc1 結合モチーフを解析した。

(2) 唾液腺発生に関連する Foxc1 推定標的遺伝子の抽出

胎生 16 日顎下腺における Foxc1 ChIP-seq の結果を、RNA-seq により得られた胎生 16 日顎下腺の遺伝子発現プロファイル、および唾液腺発生に関連する報告(Suzuki et al., Cellular molecular life science, 2021)と比較し、唾液腺発生における Foxc1 推定標的遺伝子を絞り込んだ。絞り込み条件としては 既出論文に記載がある遺伝子であること、ChIP-seq のピークの高さが上位 10%以内であること、RNA-seq で遺伝子発現があること、とした。

4. 研究成果

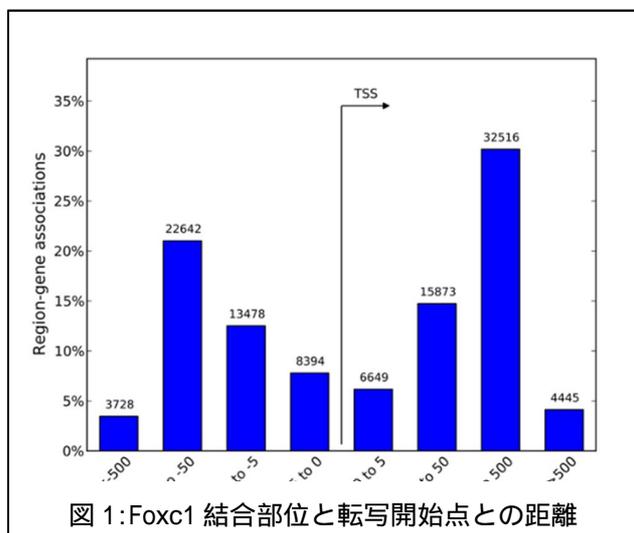
(1) Foxc1 の DNA 結合部位

検出された Foxc1 ピークは 60906 個で、推定標的遺伝子は 14950 種だった。Foxc1 の結合部位は転写開始点から $\pm 50\text{kb}$ - 500kb の領域に多く認められ、典型的な転写因子のパターンを示した。(図 1)

(2) 推定標的遺伝子の GO 解析

Foxc1 ChIP-seq ピークの GO 解析を行った。GO Biological Process では「labyrinthine layer development」や「embryonic placental morphogenesis」が上位に位置していた。

Mouse Phenotype Single KO では「abnormal major salivary gland morphology」や「abnormal submandibular morphology」が上位に位置し、Foxc1 が唾液腺の形態形成に関与している可能性



が示唆された。(図2)

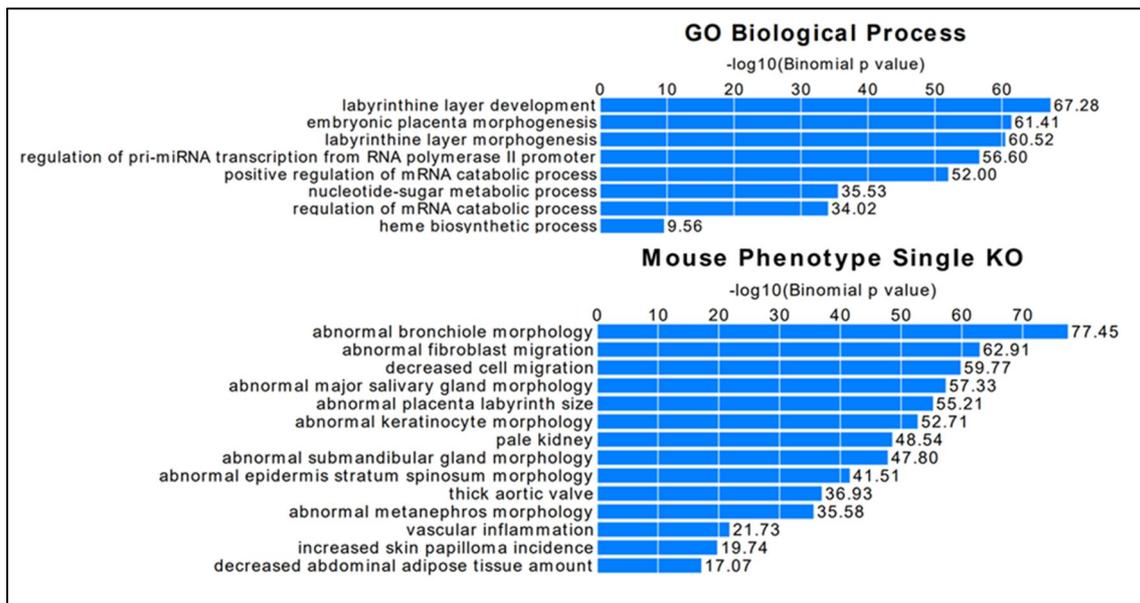


図2:Foxc1 推定標的遺伝子のGO解析

(3)Foxc1 結合モチーフ解析

Top1000 ピークでエンリッチされた Foxc1 モチーフは「TGTTTATTTGGC」の一種のみだった。自験例と Cis-BP database にデポジットされた Foxc1 モチーフとの比較を行った。データベースにデポジットされた Foxc1 モチーフは全部で4種類であり、モチーフ前半部の配列(TGTTTA)は4種全てと共通していた。一方で、モチーフ後半部の配列(TTTTGGC)は自験例とデポジットされたデータは一致せず、デポジットされたデータ間でも異なった配列を示していた。このことより、Foxc1 は他のタンパクとの複合体を形成した状態で DNA に結合しており、結合相手となるタンパクは時期や臓器によって異なっている可能性が示唆された。(図3)

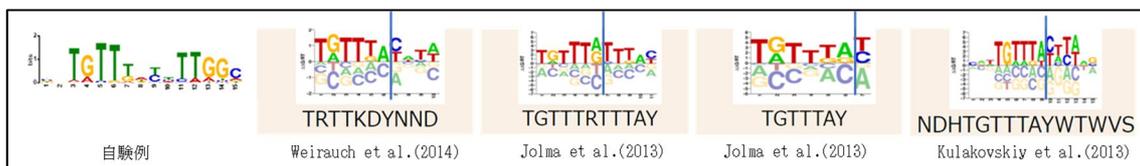


図3:Foxc1 モチーフ

(4)唾液腺発生に関連する Foxc1 推定標的遺伝子

絞り込みの結果、22種の推定標的遺伝子が抽出された。抽出された遺伝子には、FGF・TGF等のシグナルに関連する分子が含まれていた。(図4)

今後は Foxc1 の過剰発現ないし発現抑制による推定標的遺伝子の発現変動解析を通じて、Foxc1 が直接制御する遺伝子を同定することを目指す。また胎生16日唾液腺では Foxc1 が他のタンパクとの複合体を形成している可能性が示唆されたため、その結合対象となるタンパクについても解析を進める予定である。

Gene name	Peak rank	Peak location
myc	119	A1bg (-601776), Myc (-462345)
prom1	142	Prom1 (-3644)
tgfbr2	360	Tgfbr2 (-56832)
aqp5	370	Aqp5 (-1428)
kit	531	Kit (-115345), Pdgfra (+307319)
epcam	832	Epcam (-152911), Calm2 (-36133)
fgfr1	1045	Tacc1 (-236982), Fgfr1 (-80361)
smad3	1056	Smad3 (+35959), Aagab (+119380)
foxa1	1059	Foxa1 (+69053), Mipol1 (+246622)
dlk1	1485	Begain (-379299), Dlk1 (-20171)
itga6	1554	Pdk1 (-67238), Itga6 (+19008)
spry1	2024	Spry1 (-83017), Spata5 (+137045)
bmpr1a	2344	Bmpr1a (-11724), 9230112D13Rik (+8390)
polr1d	2894	Gsx1 (-79564), Polr1d (+32082)
erbb2	3156	ErbB2 (+946)
lrp5	3524	Ppp6r3 (-93617), Lrp5 (+17190)
fzd7	4452	Fzd7 (-130)
bmp7	4742	Bmp7 (+155142), Tfap2c (+235587)
smad4	5267	Mex3c (+61615), Smad4 (+69121)
krt14	5413	Krt14 (-2406)
sox9	5718	Sox9 (-737620), Kcnj2 (+978440)
jag2	5913	Gpr132 (-8574), Jag2 (+60005)

図4:唾液腺発生における Foxc1 推定標的遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 行森茜、田中準一、北條宏徳、安原理佳、鯨岡聡子、石田尚子、美島健二
2. 発表標題 A comprehensive analysis of ChIP-seq-based Foxc1 target genes in mouse embryonic submandibular gland
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 行森茜、田中準一、大沼慎太郎、安原理佳、大庭伸介、美島健二
2. 発表標題 ChIP-seqを用いた胎生期マウス顎下腺組織におけるFoxc1による発現制御遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 行森茜、田中準一、北條宏徳、大庭伸介、安原理佳、鯨岡聡子、石田尚子、大沼慎太郎、美島健二
2. 発表標題 ChIP-seqを用いた胎生期マウス顎下腺組織におけるFoxc1による発現制御遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第66回日本唾液腺学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 行森茜、田中準一、北條宏徳、安原理佳、鯨岡聡子、石田尚子、大庭伸介、美島健二
2. 発表標題 ChIP-seqを用いた胎生期マウス顎下腺組織におけるFoxc1による発現制御遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------