

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670774

研究課題名(和文) 口腔上皮幹細胞の機能維持におけるTbx1の関与

研究課題名(英文) The fundamental role of Tbx1 in orofacial development

研究代表者

船戸 紀子 (FUNATO, NORIKO)

東京医科歯科大学・医歯学研究支援センター・准教授

研究者番号：10376767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：T-box型転写因子をコードするTBX1は、新生児4000人に1人に認められる22q11.2欠失症候群(DiGeorge/Velo-cardio-facial症候群)の疾患遺伝子である。同症候群では、胸腺形成不全、心血管奇形の他、顎顔面部において、両眼隔離、小顎症、低耳介、耳介変形、口蓋裂を認める。申請者らは、Tbx1遺伝子欠損マウスに口蓋裂を認め、口蓋粘膜上皮と下顎との病的癒着がおきること、上皮細胞の増殖や分化に異常があることを報告している。加えて、歯の数や表現型にも異常を認めた。また、顎顔面部の骨の表現型解析から、Tbx1が骨軟骨細胞の増殖や分化の調節に必須であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：T-box transcription factor, Tbx1, is the major candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/Velo-cardio-facial syndrome) characterized by facial defects, thymus hypoplasia, cardiovascular anomalies, and cleft palates. Genetic disruption of Tbx1 leads to abnormal epithelial adhesion between the palate and mandible in mouse. Tbx1 is also essential for development of tooth and craniofacial bones. Our current studies reveal that Tbx1 is required for mesoderm- and neural crest-derived osteoblast differentiation and normal craniofacial development.

研究分野：医歯薬学

キーワード：T-box型転写因子 口蓋裂 歯 骨

1. 研究開始当初の背景

(1) T-box 型転写因子をコードする *TBX1* は、新生児 4000 人に 1 人に認められる 22q11.2 欠失症候群 (DiGeorge 症候群、velo-cardio-facial 症候群) の疾患遺伝子である。同症候群では、胸腺形成不全による細胞性免疫異常、心血管奇形、両眼隔離、小顎症、低耳介、耳介変形を認める。また、口腔内所見として認められる歯のエナメル質欠損や口蓋裂と一致して、口腔内の *Tbx1* の発現は、歯胚上皮、口蓋粘膜に認められる。申請者らは、*Tbx1* 遺伝子欠損マウスには、口蓋粘膜上皮と下顎粘膜上皮との病的癒着、上皮細胞の増殖分化異常が認められ、口蓋裂の病因となっていることを報告した。

(2) マウス切歯形成端部の上皮細胞塊では上皮幹細胞が維持されており、エナメル質形成に関与するエナメル芽細胞を供給する。切歯形成端部には、上皮幹細胞を含む上皮細胞塊の他に、上皮に接する間葉組織があり、歯の器官形成は上皮間葉相互作用によって維持される。*Tbx1* が切歯形成端部上皮に発現していることから、*Tbx1* が上皮幹細胞の維持にも関わっていると推察される。しかし、*Tbx1* ノックアウトマウスは出生時致死であり、上皮において *Tbx1* を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (*Tbx1<sup>loxP/-</sup>; KRT14-Cre*) は口蓋裂のため生存不可能であった。そのため、現在のところ *Tbx1* がどのように出生後の歯や口腔粘膜の機能維持に関わるかは不明であった。

2. 研究の目的

T-box 型転写因子 *Tbx1* が口腔上皮幹細胞の機能維持に関わるという仮説のもと、切歯や口蓋粘膜の発生および再生における *Tbx1* の関与を個体レベルで解明する。さらに、口腔周囲組織の発生において *Tbx1* が標的とする新規分子機構を網羅的に探索する。

3. 研究の方法

(1) *Tbx1* の機能を個体レベルで明らかにするために、以下に示す遺伝子改変マウスを交配した上で実験に用いた。

- ① *Tbx1-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス
- ② *Tbx1* コンディショナルノックアウトマウス (*Tbx1<sup>loxP/loxP</sup>*)
- ③ *Tbx1* コンディショナルトランスジェニックマウス
- ④ R26 レポーターマウス

- ⑤ *KRT14-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス
- ⑥ *Wnt1-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス
- ⑦ *Twist2-Cre* リコンビナーゼ ノックインマウス
- ⑧ *Mox2-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス
- ⑨ *Mesp1-Cre* リコンビナーゼ トランスジェニックマウス

(2) 形態学的観察

上記遺伝子改変マウスを用いて、以下の解析を行った。

- ① 骨軟骨染色
- ② 一般組織染色
- ③ Section *in situ* hybridization
- ④ Whole-mount *in situ* hybridization
- ⑤ ベータガラクトシダーゼ染色
- ⑥ 免疫染色

(3) 分子生物学的解析

*Tbx1* 遺伝子を発現するアデノウィルスあるいは、ベクターを用いて培養細胞にて分子生物学的解析を行った。

(4) 口蓋における *Tbx1* の標的遺伝子および microRNA の網羅的探索を行うために、上記の遺伝子改変マウスの組織を用いて、マイクロアレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) まず、上皮幹細胞特異的に *Tbx1* を欠失させた *Tbx1* の Loss-of-function 型遺伝子改変マウスの解析を行った。その結果、*Tbx1* ノックアウトマウスの 30%において、上顎切歯の先天欠如を認めた (表 1)。

表 1 : *Tbx1* 遺伝子改変マウスの上顎前歯

	正常	欠失	低形成
野生型マウス	100%	0%	0%
<i>Tbx1<sup>+/+</sup></i> マウス	100%	0%	0%
<i>Tbx1<sup>-/-</sup></i> マウス	56.4%	30.8%	15.3%

次に歯の組織学的解析を行った。生後 1 日の *Tbx1* の Loss-of-function 型遺伝子改変マウスでは、組織学的にエナメル質の低形成が認められた。生後 4 週、3 ヶ月、10 ヶ月齢マウスのドライスケルを作製し、上下顎の切歯、臼歯の数・大きさ・形態を、実体顕微鏡にて観察したところ、3 ヶ月までは差が見られなかったものの生後 10 ヶ月以降の *Tbx1* の Loss-of-function 型遺伝子改変マウスにおいて、上顎切歯のわずかな短小化が認めら

れた。

一方、組織特異的に *Tbx1* を強制発現させて表現型を観察するため、新規に *Tbx1* の Gain-of-function 型遺伝子改変マウスの作製を行った。同マウスを用いて上皮幹細胞特異的に *Tbx1* を強制発現させ、歯および口腔粘膜の表現型について観察した。生後 24 ヶ月マウスまで野生型と比較したが、顕著な差は認められなかった。

(2) *Tbx1*<sup>-/-</sup> マウスには、低身長、泉門の開存、鎖骨の低形成、頬骨弓・舌骨の低形成、胸骨剣状突起の癒合不全を認める。一方、*Tbx1* 遺伝子欠損マウス (*Tbx1*<sup>-/-</sup> マウス) の骨格形態異常が、*RUNX2* 遺伝子の常染色体優性遺伝疾患であるヒト鎖骨頭蓋異骨症 (CCD) および *Runx2* 遺伝子ヘテロ欠損マウスの骨格と酷似していた (図 1、論文④)。 *Tbx1* の Lineage analysis から、頭蓋骨の骨軟骨原基にも *Tbx1* の発現が確認された。 *in situ* hybridization により、*Tbx1*<sup>-/-</sup> マウスの頭蓋骨において *Runx2* の発現領域が狭小化していることがわかった。さらに *in vitro* において、細胞の種類によっては *Tbx1* の強制発現により *Runx2* の発現が誘導され、マイルドながら *Tbx1* が *Runx2* のプロモーターを活性化することが分かった (論文④)。

組織特異的に *Tbx1* 遺伝子を欠損させたところ、骨軟骨幹細胞特異的に *Tbx1* 遺伝子を欠損したマウス、および、中胚葉特異的に *Tbx1* 遺伝子を欠損したマウスは、部分的に *Tbx1*<sup>-/-</sup> マウスと似た骨格所見を示した。これまで神経堤において *Tbx1* の発現は報告されていなかったが、神経堤特異的に *Tbx1* 遺伝子を欠損したマウスにおいて、舌骨体の形態異常および出生後の死亡が認められた。また、*Tbx1* の発現が神経堤由来舌骨において認められたことから、*Tbx1* が神経堤由来組織の発生においても機能していることが明らかとなった (論文④)。

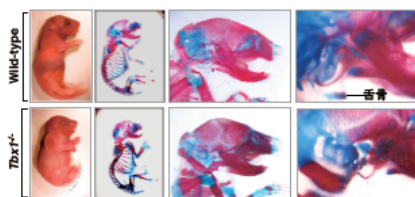


図 1: *Tbx1* 遺伝子改変マウスの骨の表現型

(3) マウス口蓋を採取し、口腔上皮幹細胞における *Tbx1* 標的遺伝子および microRNA の網羅的探索を行ったところ、野生型と異なるプロファイルを示した (一部のデータについて論文投稿中)。

(4) マウスの口蓋の発生および口蓋裂について Invited Review として出版した (論文⑤)。

(5) ヒトとマウスそれぞれにおいて口蓋裂に關与する遺伝子群について多角的にオンロジー解析を行った (論文投稿中)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Funato N, Kokubo H, Nakamura M, Yanagisawa H, Saga Y. Specification of jaw identity by the Hand2 transcription factor. *Sci Rep*. 2016, in press (査読有、Open-access).
- ② Laurie LE, Kokubo H, Nakamura M, Saga Y, Funato N. The transcription factor Hand1 is involved in Runx2-Ihh-Regulated endochondral ossification. *PLoS One*. 2016, 11(2):e0150263. (査読有、Open-access). DOI: 10.1371/journal.pone.0150263.
- ③ Mizuguchi M, Sasaki Y, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Funato N, Tanaka N, Fujii M, Nakamura M. Induction of cell death by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in a cell cycle-dependent manner. *PLoS One*. 2016, 11(2):e0148217. (査読有、Open-access). DOI: 10.1371/journal.pone.0148217.
- ④ Funato N, Nakamura M, Richardson JA, Srivastava D, Yanagisawa H. Loss of *Tbx1* induces bone phenotypes similar to cleidocranial dysplasia. *Hum Mol Genet*. 2015, 24(2): 424-435. (査読有) DOI: 10.1093/hmg/ddu458.
- ⑤ Funato N, Nakamura M, Yanagisawa H. Molecular basis of cleft palates in mice. *World J Biol Chem*. 2015, 6(3): 121-138. (査読有・招待論文、Open-access) DOI: 10.4331/wjbc.v6.i3.121.
- ⑥ orita J, Nakamura M, Kobayashi Y, Deng CX, Funato N, Moriyama K. Soluble form of FGFR2 with S252W partially prevents craniosynostosis of the Apert mouse model. *Dev Dyn*. 2014, 243(4):560-567. (査読有) DOI: 10.1002/dvdy.24099
- ⑦ Mizukoshi T, Komori H, Mizuguchi M, Abdelaziz H, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Ohara Y, Funato N, Fujii M, Nakamura

M. Failure in activation of the canonical NF- $\kappa$ B pathway by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in non-hematopoietic cell lines.

*Virology*. 2013, 443(2):226-235.  
(査読有)

DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.032.

[学会発表] (計5件)

- ① 船戸紀子. 口蓋裂に關与する疾患遺伝子群のオントロジー解析. 第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月11日-13日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)
- ② Funato N, Yanagisawa H, Nakamura M. Gene ontology analysis for cleft palate. 2015 ASCB (The American Society for Cell Biology) Annual Meeting, Dec. 12-16, 2015, San Diego (USA).
- ③ Funato N, Nakamura M, Richardson JA, Srivastava D, Yanagisawa H. Loss of Tbx1 induces bone phenotypes similar to cleidocranial dysplasia. Japanese Division of the International Association for Dental Research (JADR). 2014年12月4-5日、KKRホテル大阪 (大阪府・大阪市)。
- ④ Preston LE, Kokubo H, Nakamura M, Saga Y, Funato N. Hand1 regulates endochondral ossification. IADR (International Association for Dental Research), June 24-28, 2014, Cape Town (South Africa).

同発表にて受賞: Preston L, 2014 IADR (International Association for Dental Research)/Unilever Hatton Divisional Award in the Senior Basic Science Category of Japanese Division of the International Association for Dental Research (JADR).

- ⑤ 船戸紀子. Tbx1は口腔粘膜上皮の病的癒着と口蓋発生に關与する. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会、9月21-22日、2013年、岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市).

[その他]

ホームページ等

歯学研究支援センター 疾患遺伝子部門  
<http://www.tmd.ac.jp/cm/gene/index.htm>

日本骨代謝学会の広報企画「1st Author」  
[http://www.jsbmr.jp/1st\\_author/](http://www.jsbmr.jp/1st_author/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

船戸 紀子 (FUNATO, Noriko)

東京医科歯科大学・歯学研究支援センター・准教授

研究者番号: 10376767

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

柳沢 裕美 (YANAGISAWA, Hiromi)

UT Southwestern Medical Center、筑波大学

James A. Richardson, (RICHARDSON, James)

UT Southwestern Medical Center

Deepak Srivastava (SRIVASTAVA, Deepak)  
University of California

中村 正孝 (NAKAMURA, Masataka)

東京医科歯科大学