

ディジョージ症候群疾患遺伝子による顎顔面発生制御

東京医科歯科大学 シグナル遺伝子制御学分野

船戸 紀子

緒言

新生児の3~5%に先天異常を認め、その内の約70%に頭蓋顎顔面の異常があるといわれています。頭蓋底軟骨結合は、骨化成長点として頭蓋の前後軸方向への伸張の成長に重要な役割を担っています(図1)。さらに、頭蓋底は顔面中央部とも連続しているため、その発生異常は頭蓋顔面骨全体の成長にも大きな影響を与えます(図1)。特に蝶形後頭軟骨結合は、ヒトでは16歳まで骨化することなく頭蓋の成長に関与します。しかし、その重要性にも関わらず、どのような分子メカニズムで転写調節を受けているのか未解決のまま残されており、新しい視点からのアプローチが必要な状況です。

一方、口蓋裂は600人にひとりの頻度で出現する先天異常であり、口腔の機能や中顔面の成長にも多大な影響を与えます

(図1)。多因子性疾患とされ、ゲノム情報を用いたセントラルドグマやエピジェネティックな遺伝子発現制御について解析されてきています。また、より短期間での環境応答システムであるマイクロRNA(miRNA)も口蓋裂の発症に重要な働きをしていると考えられていますが、口蓋発生におけるmiRNAの発現および機能の解析は始まったばかりです。

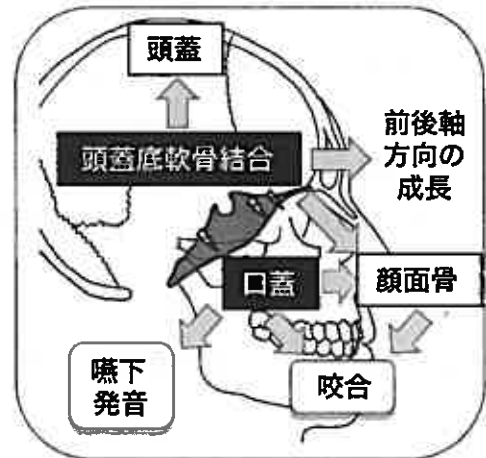
T-box型転写因子をコードする*TBX1*は、ディジョージ症候群(22q11.2欠失症候群、velo-cardio-facial症候群)の疾患遺伝子であり、同症候群の顎顔面所見では、小頭症、眼間開離、低耳介、口蓋裂を認めます(図2、図3)。私達のこれまでの研究から、*Tbx1*は頭蓋底軟骨原基や(本研究、未発表)、口蓋発生時の口蓋粘膜上皮に(文献8)発現することが分かっています。さらに、*Tbx1*の欠失により、①マウス頭蓋底では蝶形後頭軟骨結合が早期に骨化して基後頭骨と蝶形骨底部の癒合が認められること、②口蓋裂の所見が100%の浸透率で認められることを報告しています(Funato et al., Hum Mol Genet, 2012; Funato et al., Hum Mol Genet, 2015; 図2; 図3)。しかし、軟骨や口蓋上皮における*TBX1*の分子メカニズムは明らかにされていませんでした。本研究では、軟骨と口蓋上皮において*TBX1*転写因子が標的とする転写因子、miRNA-標的mRNAの転写ダイナミクスを明らかにし、疾患の病態を解明することを目的とし、研究を行いました。

研究方法

頭蓋底軟骨と口蓋粘膜上皮において、*TBX1*転写因子の機能解析を行いました。

本研究の研究手法として、*Tbx1*遺伝子改変マウスや組織特異的遺伝子改変マウスの表現型解析、イメージング(免疫染色、whole mount *in situ* hybridization、proximal ligation assay等)、データベース解析、分子生物学(リアルタイム定量PCR<qPCR>、マイクロアレイ、Western blotting等)、細胞生物学(フローサイトメトリー、細胞遊走アッセイ、軟寒天コロニー形成アッセイ等)を用いました。

図1. 頭蓋底軟骨結合や口蓋の成長は、顎顔面頭蓋の形態や機能に影響を与える



結果

※ 第49回研究報告会では、「秘密保持に関する誓約書」の提出があったため、同定した分子名等を明確にして発表致しましたが、本報告書では一部の内容を伏せて仮称で記載致します。以下、全て未発表です。

図2. 頭蓋底軟骨結合の早期癒合の研究

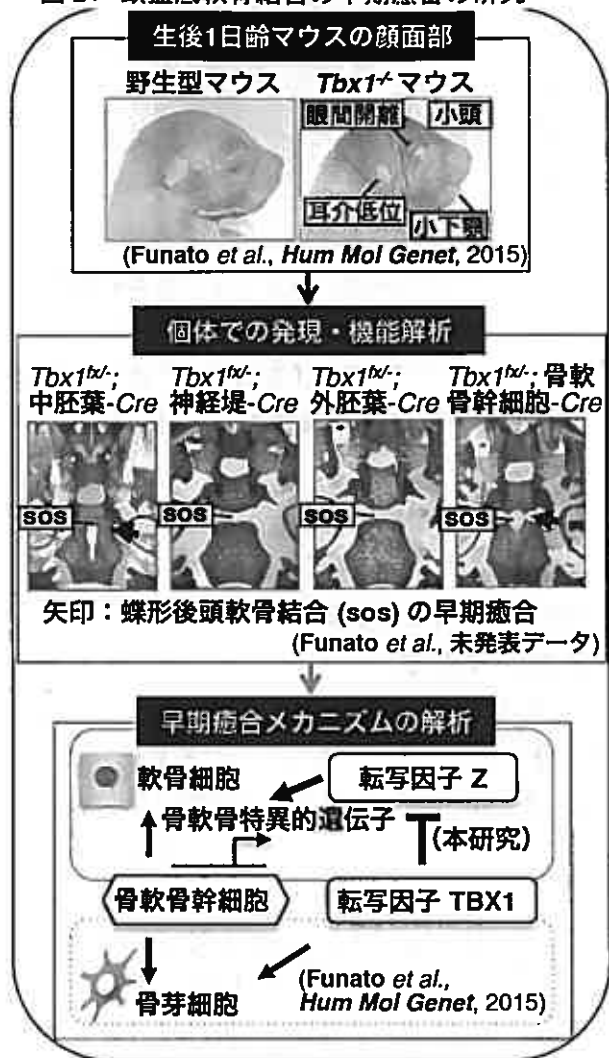
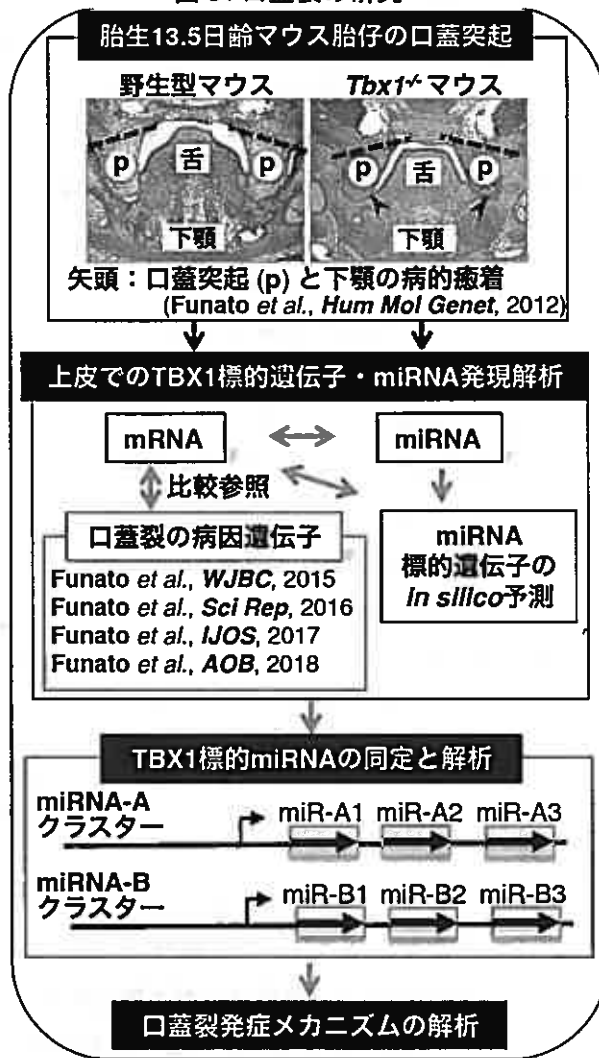


図3. 口蓋裂の研究



■ 研究計画 A. 頭蓋底軟骨結合を制御する TBX1 標的転写制御ネットワーク機構の解析 (図2)

1. *Tbx1* 遺伝子改変マウス胎仔の頭蓋底軟骨結合の観察

Tbx1 ノックアウトマウスにおいて頭蓋底軟骨結合の早期骨化を認める時期を観察したところ、胎生 14.5 日という早期に認められました。

2. *Tbx1* の頭蓋底軟骨結合での発現解析

Tbx1 が発生中の頭蓋底軟骨原基に発現していることを、*Tbx1-Cre*; *R26* リポーターマウスおよび *in situ* hybridization を用いて確認しました。

3. *Tbx1* 遺伝子改変マウス頭蓋底軟骨結合において早期骨化の原因となる組織の特定

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します。そこで、*Tbx1* ノックアウトマウス頭蓋底軟骨結合において早期骨化の原因となる組織を特定するために、組織特異的 *Cre* ドライバーマウスを交配させた *Tbx1* コンディショナルノックアウトマウスの頭蓋底表現型を解析しました。その結果、*Tbx1* ノックアウトマウス頭蓋底軟骨結合において早期骨化を誘導する原因組織を中胚葉および骨軟骨幹細胞と特定しました (図2)。

4. *Tbx1* コンディショナルノックアウトマウスの軟骨組織の解析

Tbx1 ノックアウトマウスおよび *Tbx1* コンディショナルノックアウトマウスにおいて、頭蓋底軟骨細胞の分化、骨化を組織学的に解析したところ、軟骨組織の分化および骨化が促進していることが分

かりました。

5. TBX1 と軟骨細胞でタンパク質間相互作用する分子の機能解析

軟骨細胞における TBX1 の機能を解析するために、タンパク質間相互作用する分子を探索したところ、軟骨細胞分化に関わる転写因子 Z (仮称) を新規に同定しました (図 2)。

- (1) 転写因子 Z が頭蓋底軟骨原基に発現しているのを確認しました。
- (2) TBX1 転写因子と転写因子 Z のタンパク質間相互作用について、免疫沈降法、proximal ligation assay、分子間の相互作用によるプロモーター活性により確認しました。
- (3) TBX1 転写因子と転写因子 Z の相互作用に関わるドメインを確認しました。

6. 頭蓋底軟骨において TBX1 が発現調節する遺伝子群の解析

- (1) 直接の標的遺伝子のプロモーターをクローニングし、プロモーターアッセイを行いました。
- (2) TBX1 標的遺伝子について個体組織でも同様の結果が得られるかどうか、野生型マウスと *Tbx1* ノックアウトマウス頭蓋底軟骨組織で発現を比較しています。

今後、TBX1 を過剰発現させた骨軟骨細胞について、遺伝子発現プロファイルを得るためのトランスクリプトーム解析を行う予定です。また、TBX1、転写因子 Z、各種ヒストン修飾に対して ChIP-seq を行い、転写因子群のゲノム上の結合領域を新規に同定したいと考えています。

■研究計画 B. 口蓋粘膜上皮の運命決定を担う TBX1 標的分子の同定および機能解析 (図 3)

発生中の口蓋粘膜上皮に発現し、TBX1 の標的となる miRNA および遺伝子を同定しました (図 3)。そのうちの一つの miRNA クラスターについて第 49 回研究報告会で報告致しました。

1. 口蓋粘膜上皮の運命決定を担う TBX1 標的 miRNA クラスターの同定

胎生 13.5 日齢の野生型、*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、遺伝子および miRNA の発現プロファイルをマイクロアレイにて解析しました。口蓋突起のマイクロアレイの結果を、一部の遺伝子、マイクロ RNA 一次転写産物 (pri-miRNA)、成熟型 miRNA それぞれ qPCR にて確認しました。

2. 上皮細胞での TBX1 の機能解析

TBX1 を過剰発現させた上皮細胞で、その形質が変化することをフローサイトメトリー、細胞遊走アッセイ、軟寒天コロニー形成アッセイ等で確認しました。

今後、発現について個体レベルで比較解析するために、野生型および *Tbx1* 遺伝子改変マウス胎仔口蓋を用いて TBX1 標的 miRNA とその宿主遺伝子のイメージングを行う予定です。

結論

ディジョージ症候群の疾患も出るマウスである *Tbx1* ノックアウトマウスでは頭蓋底軟骨結合の早期完全骨化が認められますが、なぜ軟骨に異常が起こるのか、その分子メカニズムは一切明らかにされていませんでした。今回の研究で、TBX1 とタンパク質間相互作用する転写因子 Z (仮称) を新規に同定し、軟骨細胞の分化において TBX1 が転写因子 Z の転写活性およびその標的遺伝子を制御していることが分かりました。

一方、口蓋裂に関わると考えられる口蓋突起粘膜上皮での TBX1 の機能も明らかになっていきましたが、本研究により、マウス口蓋において TBX1 の下流で上皮細胞の形質を制御する miRNA クラスターおよび遺伝子を複数同定しました。頭蓋底軟骨と口蓋において転写因子・miRNA のクロストークやゲノム標的を解明することで、同組織に異常を認める遺伝性疾患の病態や原因遺伝子の機能を理解し、ペプチド、miRNA を用いた新しい治療法の可能性へ結びつくと考えています。今後、研究を引き続き行い、*in vitro* および *in vivo* の統合的な機能解析を目指しています。

最後に、本研究にご支援をいただきました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝いたします。