

| | |
|--------------|---|
| Title | 内軟骨性骨形成過程における新規転写因子Zfhx4の役割の解明 |
| Author(s) | 中村, 恵理子 |
| Citation | 大阪大学, 2015, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/52369 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

学位論文

内軟骨性骨形成過程における新規転写因子 **Zfhx4** の役割の解明

大阪大学大学院歯学研究科

統合機能口腔科学専攻

(顎口腔腫瘍学)

中村 恵理子

緒言

ヒトの骨格は、骨芽細胞が担う膜性骨形成と、軟骨細胞が司る内軟骨性骨形成の二つの様式から構築される¹。膜性骨形成は、未分化間葉系細胞が直接、骨芽細胞に分化し骨を形成する骨化様式であり、頭蓋骨、鎖骨および上下顎骨などの扁平骨の形成を担っている¹。一方、内軟骨性骨形成は、未分化間葉系細胞から分化した軟骨細胞が軟骨組織を形成し、最終的には骨組織に置換される骨化様式で、椎骨、肋骨、四肢の長管骨などのヒトの多くの骨の形成に関与している¹。頭蓋顎顔面領域においては、下顎頭軟骨、鼻中隔軟骨、頭蓋底に存在する蝶形篩骨軟骨、蝶形骨間軟骨、蝶形後頭軟骨および後頭骨間軟骨が内軟骨性骨形成により形成され、鼻上顎複合体を含む頭蓋顎顔面骨の成長・発育に深く関与することが近年明らかになってきた。頭蓋顎顔面領域において内軟骨性骨形成の障害により生じる疾患として、**Kniest** 異形成症^{2,3}、**Stickler** 症候群³⁻⁶、**OSMED**^{7,8}、先天性脊椎骨端異形成症^{9,10} 等が知られており、口蓋裂を来たす場合も報告されている。また内軟骨性骨形成は、ヒトの骨格の形成・発育のみならず、骨折の治癒過程や変形性関節症で見られる骨棘の形成にも関与していると考えられている¹¹。したがって内軟骨性骨形成の分子メカニズムの解明は、ヒトの顎顔面領域を含む多くの骨

格の形成ならびに発育、骨折の治癒過程、および変形性関節症の病態の理解に貢献すると期待されている。

内軟骨性骨形成は、先に述べたように、非常に多くのステップにより構成されている。すなわち、内軟骨性骨形成は、未分化間葉系細胞の凝集に始まり、未分化間葉系細胞が軟骨細胞に分化・増殖し、さらに肥大軟骨細胞への分化の後に、軟骨細胞のアポトーシス、軟骨基質の石灰化と分解を経て、その空いたスペースに血管が侵入し、最終的に、軟骨組織の骨組織への置換にて完結する非常に複雑かつユニークな生命現象である^{12,13}。軟骨細胞ならびに骨芽細胞の起源である未分化間葉系細胞は、多分化能を有し、筋細胞、脂肪細胞ならびに腱細胞など様々な細胞に分化することが知られている。この未分化間葉系細胞の分化の方向を決定づけるメカニズムの一つとして、細胞特異的転写因子の存在が挙げられる。例えば、軟骨細胞への分化には、転写因子 **Sox9** がマスター遺伝子として機能していることが明らかとなっている¹⁴。また骨芽細胞、筋細胞、脂肪細胞への分化には、転写因子 **Runx2**¹⁵、**MyoD**¹⁶ ならびに **PPAR γ** ¹⁷ がそれぞれ重要な役割を果たしている。このように、細胞特異的な転写因子が、分化プログラムを時空間的に制御することによって、未分化間葉系細胞の分化の方向付けがなされている。したがって、細胞特異的転写因子の機能的役割の解明は、細胞分化の系譜の理解に大きな貢献

を果たすと考えられる。

転写因子は未分化間葉系細胞の分化の方向性を運命づけるだけでなく、その後続く細胞の成熟過程においても重要な役割を果たしている。内軟骨性骨形成においては、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化には転写因子 **Sox9**、**Sox5** および **Sox6** が^{14,18,19}、軟骨細胞の肥大化には **Runx2** および **Runx3** が¹⁵、軟骨基質の石灰化と分解には **Osterix** が必須であることが示されている²⁰。

一般的に、転写因子は、単独で標的遺伝子の発現制御を完結するのではなく、他の転写因子や転写共役因子など多数のタンパク質と巨大な転写複合体を形成することにより、各々の転写共役因子を介して標的遺伝子のクロマチンリモデリング、ヒストンのアセチル化やメチル化などの修飾、転写活性、あるいはスプライシングを調節し、その生物学的機能を調節していることが知られている。内軟骨性骨形成においても **Sox9** と協調的に働く転写共役因子の存在が必要であり、**PGC-1 α** ²¹ が **Sox9** 特異的な転写共役因子として機能すること、**CBP/p300**²²、**Znf219**²³、**Arid5a**²⁴ および **Arid5b**²⁵ が軟骨特異的遺伝子のヒストン修飾を制御していること、**Wwp2**^{26,27} が **Gooseoid** のモノユビキチン化を促進すること、**p54^{nrb28}** が軟骨特異的遺伝子の mRNA のスプライシングに必要であることが見出されてきた。しかしながら、非常に多くのステップに渡る内軟骨性骨形成

の複雑なイベントが、時空間的に巧妙かつ連続的に制御されていることを考えると、上述した転写因子や転写共役因子以外の未知の転写制御因子が存在し、内軟骨性骨形成に関与している可能性が推測される。

そこで本研究においては、内軟骨性骨形成を制御する新規転写因子の同定とその役割について検討することにより、内軟骨性骨形成の分子制御メカニズムの解明を試みた。

方法

1. マウス胎児肢芽細胞単離および培養

胎生 12.5 日齢の ICR マウス（日本 SLC、静岡）の肢芽を実体顕微鏡下にて分離し、0.1%コラゲナーゼ type II (Sigma, St. Louis, MO, USA) および 0.1%トリプシン (Sigma) を含む DMEM を用いて消化した。消化後、セルストレーナーで濾過し、濾過液中の細胞を遠心して、肢芽細胞を単離した。細胞濃度が 2×10^7 細胞/ml になるよう 10%FBS を含む DMEM を追加し、5%CO₂ 気相下で 120 分間培養した後、10%FBS を含む DMEM をさらに追加した²³。

2. アデノウイルス

BMP2、Sox9、ならびに Sox6 アデノウイルスは、Takigawa らがアデノウイルス作製キット(Takara、東京)を用いて作製したものを使用した²³。

3. マイクロアレイ解析

The Ambion® WT Expression Kit (Applied Biosystems, Branchburg, NJ, USA) を用

いてマウス胚芽細胞から RNA を精製し、得られた RNA サンプルから ssDNA を作製した。ssDNA の断片化には、GeneChip® WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, US) を用い、断片化された ssDNA を terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) と GeneChip® DNA Labeling Reagent を使用して、ビオチン標識した。断片化・ラベル化された ssDNA をハイブリダイゼーションバッファーに加え、GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix)上で 16 時間ハイブリダイズし、洗浄・染色後、スキャナーで蛍光を読み取り、Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software (Affymetrix) で CEL ファイルの作成を行った。正常なスキャン画像が得られたことを確認し、Affymetrix Expression Console によって CHP ファイルを作成した²⁰。

4. マウス組織の RNA の採取

生後 0 日齢 ICR マウス (日本 SLC、静岡) より、肺、胃、肝、腎、腸、皮膚、肋骨、四肢骨、頭蓋骨、胸骨、上腕骨、脳、心臓を採取し RNA later (Ambion, Austin, TX, US) に浸漬した後、粉砕機専用器を用いて粉砕し、得られた上清から NucleoSpin RNAII (Macherey-Nagel, Duren, Germany) を用いて RNA を精製した。RNA は 65°C で 5 分間変性させた後、Oligo-dT プライマーおよび ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix

with gDNA Remover (TOYOBO、大阪) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した²⁴。

5. Real-time Polymerase Chain Reaction (real time PCR)

遺伝子発現の定量は、Taqman PCR protocol に従い、ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems)を用いて行った²⁴。使用した Taqman プライマーおよびプローブは表 1 に示した。

6. 蛍光免疫染色

マウス胎仔大腿骨を 4% パラホルムアルデヒドに 4°C にて一晩浸漬固定し、5% エチレンジアミン四酢酸にて 3 日間脱灰した。サンプルをパラフィン包埋し、厚さ 4μm の切片を作製した。切片は脱パラフィン処理後 1%ウシ血清アルブミンでブロッキングし、一次抗体として抗マウス 2 型コラーゲン抗体 (Chondrex, Redmond, WA, US)、抗ウサギ I 型コラーゲン抗体 (Chemicon, Germany)、抗ウサギ 10 型コラーゲン抗体 (LSL、東京)、抗ウサギ MMP13 抗体 (abcam, Cambridge, UK)、あるいは抗ウサギ Zfhx4 抗体 (昭和薬科大学 坂田宣夫先生より恵与を受けた²⁹) を用いて、4°C にて一晩静置した。

二次抗体として Alexa Fluor 555(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)と結合した抗マウス IgG 抗体もしくは抗ウサギ IgG 抗体を反応させ、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories , Burlingame, CA,USA)にて核染後、蛍光顕微鏡にて観察した²⁰。

7. CAG-Cre トランスジェニックマウス

CAG-Cre トランスジェニック (TG)マウスは理研実験動物開発室(茨城)より購入した。尚、この CAG-Cre TG マウスは、マウス全身で強く発現することが示されている³⁰。本研究計画で実施した全ての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物委員会の承認を得て、関連法規を遵守して実施した。

8. Zfhx4 flox マウスの作製

Zfhx4 flox マウスを作製するために、ネオマイシン耐性遺伝子を含むターゲティングベクターを作製した (図 1)。エレクトロポレーションにより、TT2 ES 細胞でターゲティングベクターと相同組み替えを行った³¹。相同組み替えされた ES 細胞は、ネオマイシン存在下にて培養後、サザンブロット法にて確認した。以上のようにして得られた

相同組み替え ES 細胞を C57BL/J マウス胚盤胞にマイクロインジェクションし、これらの胚を偽妊娠レシピエントへ移植し、Zfhx4 flox キメラマウスを作製した³¹。Zfhx4 flox キメラマウスと C57BL/J マウスと交配し、変異アレルが生殖系細胞へ組み替えされたヘテロマウスは、サザンブロット法ならびにゲノム PCR にて選別、確認した。使用した PCR プライマーは表 2 に示した。サザンブロットティングのプローブは、表 3 に示した。

9. Zfhx4 遺伝子欠損 (KO) マウスの作製

Zfhx4 KO マウスを作製するために、Zfhx4 flox マウスと CAG-Cre トランスジェニックマウスを交配し、Zfhx4 遺伝子欠損ヘテロマウスを樹立した。flox アレルの欠失はゲノム PCR にて確認した。Zfhx4 遺伝子欠損ヘテロマウスを C57BL/J マウスと交配し、Cre トランスジーンを欠如する Zfhx4 遺伝子欠損ヘテロマウスを作出し、Cre トランスジーン欠失をゲノム PCR にて確認した。さらに、Zfhx4 遺伝子欠損ヘテロマウス同士を交配し、Zfhx4 KO マウスを作製した²⁰。使用した PCR プライマーは表 2 に示した。

10. アルシアンブルー・アリザリンレッド二重染色による骨格標本の作製

マウス新生仔もしくはマウス胎仔を 95%エタノール液中に浸漬固定し、アルシアンブルー溶液 (80%エタノール、5%酢酸、0.015%アルシアンブルー)にて 24 時間浸漬し、軟骨組織を染色した。1%水酸化カリウム溶液にて軟組織を除去した後、0.002%アリザリンレッド S 溶液 (1%水酸化カリウムを含む)を用いて石灰化領域の染色を行った。グリセリン溶液 (1%水酸化カリウムを含む)にて余分に染色されている部分を脱色後、実体顕微鏡下にて観察および撮影を行った³²。

11. *in situ* ハイブリダイゼーション

胎生 15.5 日齢マウスより後肢を採取したのち、4%パラホルムアルデヒドに 4°C 一晚浸漬固定後、通法に従ってパラフィン包埋し、厚さ 4 μ m の切片を作成した。得られた組織切片は、脱パラフィン処理後、プロテアーゼ処理、アセチル化処理を行い、Col2a1、Col10a1、Mmp13、Sox9、Ihh、PTH 受容体 (Ppr)、Runx2 および Osterix に特異的な Dig 標識された RNA プローブを用いてハイブリダイゼーション (65°C、一晚) を行った。サンプルは、洗浄液 1 (50% ホルムアミド/2 \times SSC pH7.0、65°C 30 分 \times 3 回)、洗浄液 2 (2 \times SSC pH7.0、65°C 20 分 \times 1 回)、洗浄液 3 (0.2 \times SSC pH7.0、65°C 20 分 \times 2 回)

で洗浄した後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 標識された抗 Dig 抗体 (Roche) と反応させ、ALP の基質である NBT/BCIP を用いた発色反応により目的遺伝子を検出した²³。Mmp13³³、Sox9¹⁵、Ihh¹⁵、Ppr³⁴ の RNA プロブ作製用に用いたプラスミドは小守壽文先生 (長崎大学生命医化学講座) より、Col2a1³⁵、Col10a1³⁵ の RNA プロブ作製用に用いたプラスミドは妻木範行先生 (京都大学 iPS 細胞研究所) より恵与を受けた。

12. von Kossa 染色

非脱灰パラフィン切片を脱パラフィン処理後、脱イオン水で 2 回洗浄し、5% 硝酸銀水溶液を加え、30 分間日光を照射して発光させた。脱イオン水で 2 回洗浄し、5% チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え室温に 2 分間静置し反応を停止した。対比染色はケルンエヒロート液を用いた²³。

13. 細胞培養

マウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2、ヒト胎児腎臓由来細胞株 293 は、理研細胞バンク (茨城) より購入した。293FT は、Life Technology (Carlsbad, US) より購入した。

それぞれの細胞は、10 % ウシ胎仔血清 (FBS, JRH Bioscience, Lenexa, KA, USA) を含む DMEM 培地 (Sigma) 中で、37 °C、5 % 二酸化炭素気相下で培養した²⁵。

14. Flag-Zfhx4 発現ベクターの作製

Gateway システム (Life Technology 社) を用いて行った。Flag で標識した Zfhx4 は、PCR で増幅し、この PCR 産物を KpnI および XhoI で制限酵素処理し、KpnI および XhoI で制限酵素処理しておいたドナーベクターにライゲーションし、エントリークローンを作製した。このエントリークローンとデスティネーションベクターの組み替えを行い、pcDNA Zeo (Invitrogen) に組み込んだ Flag-Zfhx4 発現ベクターを作製した。Flag-Zfhx4 発現ベクターは、NucleoBond Midi Kit (Takara) により精製し、実験に用いた³⁶。

15. トランスフェクション

培養細胞へのトランスフェクションは、FuGene6 (Roche, Schweiz) もしくは PEI NAX (Polysciences, Inc., Warrington, PA, US)³⁷ を用いて行った。目的遺伝子を組み込んだプラスミド (1µg) と FuGene6 溶液 (6µl) もしくは PEI NAX 溶液 (5ml) をウシ胎

仔血清非含有 DMEM 中で 15 分間室温にて反応させ、DNA-リポソーム複合体の形成後、細胞培養液中に DNA-リポソーム複合体を直接添加することによりトランスフェクションを行った²⁵。

16. 蛍光免疫染色

カバーガラス上に マウス未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 を培養後、Flag で標識した Zfhx4、Venus (理化学研究所 宮脇敦博士より恵与) 標識した Runx2 または Osterix²⁰ をトランスフェクションし、48 時間後、リン酸緩衝生理的食塩水で洗浄し、3.7 %ホルマリン-リン酸緩衝生理的食塩水(和光純薬工業、大阪) に 20 分間浸漬、固定した。0.2%Triton-X/リン酸緩衝生理的食塩水にて 5 分間浸透化し、1%BSA/リン酸緩衝生理的食塩水に 1 時間浸漬後、マウス抗 Flag 抗体 (Sigma) を用いて 2 時間静置した。二次抗体として Alexa Fluor 555 (Invitrogen) と結合した抗マウス IgG 抗体を 30 分間反応させ、0.2%Triton-X/リン酸緩衝生理的食塩水にて洗浄した。0.1µg/ml DAPI (Molecular Probe, Invitrogen, CA, USA) を加え、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica SP8) において観察し、写真撮影を行った²⁸。

17. ウェスタンブロッティング

細胞をリン酸緩衝生理的食塩水で 2 回洗浄後、細胞溶解液 (20 mM HEPES pH 7.4、150mM 塩化ナトリウム (NaCl)、1 mM グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA)、1.5 mM 塩化マグネシウム (MgCl₂)、10 %グリセロール、1 % Triton X-100、10 µg/ml アプロチニン、10 mg/ml ロイペプチン、1 mM ベンゼンスルホニルフルオリド塩酸塩、0.2 mM オルソバナジン酸ナトリウム)にて溶解した。この細胞溶解溶液を遠心し (12,000 rpm/20 min)、上清を 0.5 M メルカプトエタノール含有ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) サンプルバッファーで熱溶解(95 °C、5 分)し、サンプルとした。サンプルを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写後、一次抗体として、マウス抗 Flag 抗体 (Sigma) あるいはヤギ抗 Myc 抗体 (Upstate Biotechnology, New York, NY, USA)と反応させ、二次抗体として西洋わさび過酸化酵素を付与した抗マウス IgG 抗体、抗ウサギ IgG 抗体あるいは抗ヤギ IgG 抗体(Jackson Immuno Research, PA, USA)と反応させた。ImmunoStar LD (和光純薬工業) を用いて発光シグナルを増幅した後、X 線フィルム(Kodak, New York, NY, USA) に現像した²⁰。

18. 免疫沈降法

細胞をリン酸緩衝生理的食塩水にて 2 回洗浄後、細胞溶解溶液 (ウェスタンブロッティングの項に記載) により溶解した後、15,000 g、15 分、遠心分離し、上清を全タンパク質抽出液とした。非特異的結合を除去するために、この上清に Dynabeads Protein G (Invitrogen) を添加し、4°C、1.5 時間、反応後、Dynabeads Protein G を除去し、マウス抗 Flag 抗体 (Sigma) を添加し、4°C、一晩反応させた。Dynabeads Protein G を添加し、4°C、1 時間反応させた後、1ml の冷リン酸緩衝生理的食塩水にて 4 回洗浄後、0.5 M メルカプトエタノール含有の SDS サンプルバッファーで熱溶解 (95 °C、5 分) し、上清をサンプルとした。これらサンプルは、10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、ウェスタンブロッティング法により検出した²⁰。

結果

1. 新規転写因子 Zfhx4 の同定および発現の検討

内軟骨性骨形成の制御に関与する新規転写因子を同定するために、高い軟骨分化能を有するマウス肢芽細胞を用いて **Microarray** 解析を行った。胎生 12.5 日齢よりマウス肢芽細胞を採取し、コントロールウイルス、**BMP2** ウイルスあるいは、**Sox6** および **Sox9** ウイルスを感染させ、遺伝子プロファイルを検索した結果、小顎症、屈指症、合指症等の骨格形成異常を示す **8q21.11 Microdeletion Syndrome** の原因遺伝子の一つと示唆されている³⁸ 転写因子 **Zfhx4** が肢芽細胞に高発現していることを見出した(表 4)。**Zfhx4** の発現は、**BMP2** あるいは **Sox6** および **Sox9** の過剰発現によっても大きな変動を受けず、高い発現を維持していた(表 4)。**Zfhx4** は、4 つの **homeobox** ドメインと 22 の **zinc finger** ドメインを持ち、3599 個のアミノ酸からなる巨大な転写因子であることが知られているが³⁹、現在までのところ、**Zfhx4** の生体内で役割ならびにその作用メカニズムなどについてはほとんど不明である。

まず、組織における **Zfhx4** の発現を検討するために、生後 0 日齢マウスから、肺、胃、肝、腎、腸、皮膚、肋骨、四肢骨、頭蓋骨、胸骨、上腕骨、脳、心臓を採取し、**RT-qPCR**

法により **Zfhx4 mRNA** の発現を検討した。その結果、**Zfhx4** は、長管骨、頭蓋骨、肋骨および上顎骨において強い発現を示した (図 2A)。この点をさらに検討するために、生後 2 日齢マウス脛骨を用いた免疫染色にて **Zfhx4** の発現を検討した。その結果、マウス脛骨成長板の肥大化層に強い発現を認めた (図 2B)。以上の結果より、**Zfhx4** は骨格形成過程に関与している可能性が推察された。

2. **Zfhx4** ノックアウト (KO) マウスの解析

Zfhx4 は巨大な転写因子であるため、*in vitro* を主体としたアプローチでは、解析が困難であると考えた。そこで、**Zfhx4 KO** マウスを作製し、骨格形成過程における **Zfhx4** の関与を検討することとした。まず、**Zfhx4** エキソン 2 の 5'側に近接するイントロン 1 と、エキソン 3 の 3'側のイントロン領域に **loxP** 配列を導入した **Zfhx4 flox** ヘテロマウスを作製した (図 1)。**Zfhx4 flox** ヘテロマウスの **flox** アリルの **germ line transmission** は、PCR (図 3A) ならびにサザンブロット (図 3B) により確認した。次に、**Zfhx4 flox** マウスと **CAG-Cre** トランスジェニックマウスを交配し、**Zfhx4** 遺伝子欠損ヘテロマウスを作製した。**Zfhx4** 遺伝子欠損ヘテロマウスの **CAG-Cre** トランスジェンを削除するために、**C57BL/J** マウスと交配し、**Cre** 遺伝子陰性の **Zfhx4** 遺伝子欠損ヘ

テロマウスを PCR 解析により選別した。Zfhx4 flox ヘテロマウスならびに Zfhx4 遺伝子欠損ヘテロマウスは、明確な症状を示さず、生殖能も有していた。樹立された Zfhx4 遺伝子欠損ヘテロマウスを用いて、Zfhx4 KO マウスの作製に用いた。

3. Zfhx4 KO マウスが呈する内軟骨性骨形成障害

Zfhx4 KO マウスは、出生時より喘ぎ呼吸を呈し、生後 1 日以内に死亡した (図 4A)。

Zfhx4 の骨格形成への関与を検討するために、生後 0 日齢の Zfhx4 KO マウスおよび同腹の WT マウスをアリザリンレッド・アルシアンブルー二重染色し、骨格標本作製した。Zfhx4 KO マウスは、頭蓋の前後径の短縮、肋骨の形成不全、胸腔の矮小化、肩甲骨、上腕骨の短縮、大腿骨の短縮を呈した (図 4B)。したがって、Zfhx4 は、骨格形成過程、特に内軟骨性骨形成過程において重要な役割を果たしていると示唆された。そこで、Zfhx4 が内軟骨性骨形成に関与しているかを検討するために、内軟骨性骨形成がダイナミックに起こっている胎生 15.5 日齢の Zfhx4 KO マウスを骨格標本にて解析したところ、生後 0 日齢の Zfhx4 KO マウスと同様に、肋骨の形成不全、胸腔の矮小化、および近位肢節の短縮が観察された (図 5A)。内軟骨性骨形成過程における Zfhx4 の関与を明らかにするために、胎生 15.5 日齢の Zfhx4 KO マウスの大腿骨を病理組織学的に

検索した。その結果、胎生 15.5 日齢の *Zfhx4* KO マウスでは、大腿骨の短縮と軟骨細胞の肥大化の遅延を認めた (図 5B)。以上の実験結果より、*Zfhx4* が内軟骨性骨形成過程に深く関与していることが示された。

次に、*Zfhx4* が内軟骨性骨形成のどのステップに関与しているかを明らかにするために、胎生 15.5 日齢の *Zfhx4* KO マウス大腿骨における軟骨細胞分化マーカーの発現を免疫染色法により解析した。内軟骨性骨形成の前期マーカーである 2 型コラーゲンの発現は、同腹の WT マウスと同程度であった (図 6)。一方、後期マーカーである 10 型コラーゲンおよび MMP13 の発現は、*Zfhx4* KO マウスでは著しく低下していた (図 6)。

さらに、内軟骨性骨形成過程における *Zfhx4* の関与をさらに検討するために、*in situ* ハイブリダイゼーション解析により内軟骨性骨形成のマーカー遺伝子の発現を胎生 15.5 日齢の *Zfhx4* KO マウスを用いて解析した。免疫染色による実験結果に一致して、2 型コラーゲンの発現は同腹の WT マウスと同程度であったが (図 7)、10 型コラーゲンおよび MMP13 の発現は、*Zfhx4* KO マウスでは著しく低下していた (図 7)。また、軟骨形成に必須かつ内軟骨性骨形成の前期マーカーである転写因子 *Sox9* の *Zfhx4* KO マウスにおける発現は、同腹の WT マウスと同程度であったが、前肥大化のマーカー遺伝子である *Ihh* ならびに PTH 受容体の発現は WT マウスより遅れており、転写因子 *Runx2*

ならびに **Osterix** の発現は軽度に低下していた (図 7)。これらの実験結果より、**Zfhx4** は、内軟骨性骨形成過程の後期段階の制御に深く関与していることが示されたので、さらに内軟骨性骨形成の石灰化過程に対する検討を行った。胎生 16.5 日齢 **Zfhx4 KO** マウス大腿骨を **von Kossa** 染色にて解析した結果、内軟骨性骨形成の石灰化過程が著しく障害されていることが判明した (図 8)。従って、**Zfhx4** は内軟骨性骨形成の後期段階の制御に深く関与していることが明らかとなった。

4. 内軟骨性骨形成過程における **Zfhx4** の役割

内軟骨性骨形成の肥大化ならびに石灰化過程の制御には、**Runx2** および **Osterix** が必須的役割を担っていることが明らかにされている。従って、**Zfhx4** は、**Runx2** あるいは **Osterix** と関連して内軟骨性骨形成を制御している可能性が考えられた。その可能性を検討するために、**Zfhx4** と **Runx2** ならびに **Osterix** の細胞内局在を検討した。軟骨細胞分化能を有する未分化間葉系細胞株 **C3H10T1/2** に **Flag-Zfhx4** ならびに **Venus-Runx2** あるいは **Venus-Osterix** を遺伝子導入し、抗 **Flag** 抗体にて免疫染色後に、各々の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡下にて解析した。その結果、**Zfhx4** は **Runx2** と異なる細胞内局在を示した (図 9A)。一方、**Zfhx4** と **Osterix** の細胞内局在は良く一致してい

た (図 9B)。この実験結果は、Zfhx4 KO マウスと Osterix KO マウスがよく似た表現型を示すことに符合していた²⁰。Zfhx4 と Osterix の相互関係をさらに検索するために、免疫共沈降法により Zfhx4 と Osterix の物理的結合を検討した。その結果、Zfhx4 と Osterix が物理的に結合していることを見出した (図 10)。したがって、Zfhx4 は Osterix と結合することにより内軟骨性骨形成を制御していると考えられた。

考察

転写因子は、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどを制御し、細胞の運命の決定に深く関与している。内軟骨性骨形成過程においては、**Sox9**、**Runx2** ならびに **Osterix** を中心に、様々な転写因子や転写共役因子が協調し、連続的かつ多段階に渡る細胞分化プログラムを統括している。本研究では、内軟骨性骨形成の制御機構の理解を深めるために、内軟骨性骨形成に関わる新規転写因子の同定とその機能解析を目指した。その結果、軟骨細胞に高発現する転写因子として **Zfhx4** を同定し、**Zfhx4** が内軟骨性骨形成の後期段階の制御に深く関与していることを明らかにした。**Zfhx4 KO** マウスは、肥大軟骨細胞の形成を示すものの、長管骨の短縮と、軟骨基質の石灰化と分解の遅延を示した。この **Zfhx4 KO** マウスの表現型は、**Osterix KO** マウスで見られる内軟骨性骨形成障害に良く近似していた²⁰。**Osterix KO** マウスでは肥大軟骨細胞までの分化を認めるが、軟骨基質の石灰化、基質小胞の形成ならびに軟骨基質の分解が観察されず、内軟骨性骨形成が阻害されることが示されている²⁰。そこで、**Zfhx4** と **Osterix** の相互関係を検索したところ、**Zfhx4** は **Osterix** と一致した核内局在を示し、物理的に結合していることを明らかにした。一方、**Zfhx4** は、**Runx2** とは異なる核内局在を示した。このことは、**Zfhx4 KO**

マウスと **Runx2 KO** マウスで観察される内軟骨性骨形成障害が異なることに符号する。

以上の結果から、**Zfhx4** は、**Osterix** と結合し、転写複合体を形成することにより、内軟骨性骨形成の制御に関与していると考えられた。個体レベルにおける **Zfhx4** と **Osterix** の関係を明らかにするために、現在、**Zfhx4** ヘテロマウスと **Osterix** ヘテロマウスを交配し、**Zfhx4** と **Osterix** のダブル KO マウスを作製している。**Zfhx4/Osterix** ダブル KO マウスを解析することにより、**Zfhx4** と **Osterix** が内軟骨性骨形成に果たす役割が一層明らかになっていくと考えられる。

Zfhx4 は **Osterix** と物理的に結合することから、**Zfhx4** が **Osterix** の転写標的遺伝子の発現調節に関与している可能性が考えられる。これまでに **Osterix** の標的遺伝子としては **MMP13** が明らかとなっている²⁰。本研究において、胎生 15.5 日齢の **Zfhx4 KO** マウス大腿骨の免疫染色法および *in situ* ハイブリダイゼーション解析結果より、**MMP13** の発現が著しく低下していることから、**MMP13** が **Zfhx4** の標的遺伝子であると考えられる。しかしながら **Zfhx4** の分子量が 400kDa と非常に大きいため、**Zfhx4** と **Osterix** の相互関係を *in vitro* での解析を進めることは非常に困難である。幸いなことに、最近、ゲノム編集技術の **TALEN** や **CRISPR/Cas9** を用いた新規遺伝子ノックイン法 **PITCh** (**Precise Integration into Target Chromosome**) システム⁴⁰ が開発された。PITCh シ

システムを駆使することで、クロマチン免疫沈降法などによる標的遺伝子の発現機構の解明と、質量分析による **Zfhx4** が形成する転写複合体を網羅的に解析することが可能となる。**Zfhx4** は多くの **homeo box** ドメインや **Zinc Finger** ドメインを有することから、様々な転写因子や転写共役因子と結合する転写プラットフォームとして機能している可能性が考えられるため、**Zfhx4** の転写複合体解析は、**Zfhx4** の分子機能の全貌解明に大きな役割を果たすと思われる。今後、**PITCh** システムを利用して、**Zfhx4** の標的遺伝子ならびに **Zfhx4** と相互作用するタンパク質を探索し、内軟骨性骨形成過程における **Zfhx4** の分子メカニズムの包括的な検討を行っていききたい。

Zfhx4 が神経組織や様々な組織に発現する巨大な分子であることから^{29,39,41}、**Zfhx4** **KO** マウスは胎生初期に致死となり、骨格形成過程における解析が困難となると懸念されたため、まず **Zfhx4 flox** マウスを設計し、作製した。予想に反して、**Zfhx4 KO** マウスは、生後 1 日以内に死亡するものの出生し、内軟骨性骨形成は遅延するものの骨への置換も観察された。**Zfhx4 KO** マウスが、胎生初期致死や著しい骨格形成不全を示さなかった理由として、他の転写因子が **Zfhx4** の機能を代償している可能性が考えられる。**Zfhx** ファミリーである **Zfhx3(ATBF1-A)** は、4 つの **homeodomain** と 23 の **zinc finger domain** を持つ 404 kDa の転写因子であり⁴²、**Zfhx4** と比較的高い相同性を有している

⁴¹。 **Zfhx3** ヘテロマウスは、生後 20 日で非常に小さい体長を示した ⁴³。 **ATBF1** ヘテロマウスにおいて骨格形成過程に関するこれ以上の詳細な検討はなされていないが、ヘテロマウスでの所見より、**Zfhx3** が **Zfhx4** の機能を補償している可能性が推察される。また、**Zfhx3** は胃がんにおいてではあるが、**Runx3** と協調して働いている報告もある ⁴⁴。

Zfhx3 の内軟骨性骨形成への関与を明らかにするためには、軟骨特異的 **Zfhx3** コンディショナル KO マウスの作製および解析も必要であり、**Zfhx4** との相互関係も興味を持たれる。

本研究において、**Zfhx4** は軟骨細胞分化初期段階にある胎生 12.5 日齢マウス肢芽細胞から見出された。したがって、**Zfhx4** が軟骨細胞の分化初期に関与する可能性も想定されたが、**Zfhx4 KO** マウスは、内軟骨性骨形成の前期段階では明確な表現型を示さなかった。**Zfhx4 KO** マウスでは、肥大軟骨細胞の形成を観察されるものの、長管骨の短縮と、軟骨基質の石灰化および分解の遅延を認め、内軟骨性骨形成の後期マーカーである 10 型コラーゲンおよび **MMP13** の発現は、**Zfhx4 KO** マウスでは著しく低下していた。

すなわち、**Zfhx4 mRNA** は、軟骨細胞分化初期から発現しているものの、その機能は軟骨細胞前期分化には発現せず、後期分化過程で発揮されると言える。胎生 12.5 日齢マウス肢芽細胞を用いて見出された **Zfhx4** の **KO** マウスが内軟骨性骨形成の後期段階に

限定して認められるのかは現在のところ不明である。一つの可能性としては、軟骨細胞の分化初期においても **Zfhx3** が代償的に作用していることが考えられる。

Zfhx4 の発現制御機構に関するメカニズムも興味を持たれる。この検討を行うため、初代軟骨細胞に **BMP2**、**TGFβ**、**PTHrP**、**FGFb** および **Wnt3a** を作用させても、**Sox9**、**Sox5**、**Sox6**、**Runx2**、**Osterix** および **Mef2c** を過剰発現させても、**Zfhx4 mRNA** の発現に変動を認めなかった。マウス胚細胞における **Microarray** 解析の実験結果でも、**BMP2** 添加や **Sox6** および **Sox9** の過剰発現によって **Zfhx4** の発現に大きな変化は認めず高発現を維持していたことから、未分化間葉細胞から軟骨細胞への分化初期に関わるシグナルが **Zfhx4** の発現制御に関与していると推測される。

Zfhx4 KO マウスの頭蓋骨の前後径は、**WT** マウスに比べ短かった。また **Zfhx4 mRNA** は、頭蓋骨でも強い発現を示した。これら実験結果から、**Zfhx4** の膜性骨形成および骨芽細胞への関与を検討する必要があると考えられる。**Zfhx4** と結合する **Osterix** は膜性骨化ならびに骨芽細胞の分化でも重要な役割を担っていることが明らかになっており^{45,46}、膜性骨形成に対する **Zfhx4** の関与を検討することは意義深い。

Zfhx4 KO マウスで観察された内軟骨性骨形成の障害は、肩甲骨、上腕骨ならびに大腿骨の近位肢節と肋骨で顕著であった。骨系統疾患で低身長を呈する場合、四肢と体幹

の比を計測することは臨床診断を確定する上で極めて重要な意義がある。四肢と体幹の比により、四肢短縮型、体幹短縮型、均衡型に分けられ、四肢短縮型はさらに近位肢節短縮型、中間肢節短縮型、遠位肢節短縮型に分類される。したがって **Zfhx4 KO** マウスは、四肢短縮型の中で近位肢節短縮型に近い病態を呈したと考えられる。近位肢節短縮型骨系統疾患としては、軟骨無形成症⁴⁷、**autosomal recessive omodysplasia (ARO)**⁴⁸、**omodysplasia**⁴⁹があり、疾患名が定まっておらず発症メカニズムが不明である近位肢節短縮型骨系統疾患の報告もある⁵⁰。今後、**Zfhx4** が近位肢節短縮型骨系統疾患の原因遺伝子として報告される可能性もある。さらに、**Zfhx4** は、**8q21.11 Microdeletion Syndrome** の原因遺伝子の一つと示唆されている³⁸。**Zfhx4 KO** マウスは、**8q21.11 Microdeletion Syndrome** に類似した症状として小顎症を示したが、明らかな屈指症、合指症は認めなかった。**Zfhx4** は、脳、骨格筋、肝で発現し⁵¹、神経前駆細胞や筋細胞の分化にも関与していると報告されている⁴¹。また **Zfhx4** は神経膠芽腫の腫瘍始原細胞の恒常性の維持に必要であることも示されている⁵²。多発性硬化症⁵³、先天性心疾患⁵⁴、先天性眼瞼下垂⁵⁵、知的障害⁵⁶に **Zfhx4** 遺伝子の変異を認める臨床報告もある。今後、**Zfhx4 KO** マウスを詳細に解析することにより、骨格形成だけでなく、神経をはじめとした他の組織における **Zfhx4** の生体内での機能に対する理解が深まると考えられる。

本研究の遂行により、**Zfhx4** が内軟骨性骨形成の後期段階で重要な役割を果たす転写因子であることが明らかとなった。またそのメカニズムとして、**Zfhx4** と **Osterix** の結合が関与していることを示し、**Zfhx4** が **Osterix** を始めとする転写制御因子のプラットフォームとして機能している可能性が示唆された。内軟骨性骨形成は、ヒトの骨格の形成・発育の制御、骨折の治癒過程、変形性関節症の発症にも関与することから、内軟骨性骨形成の分子メカニズムを理解することは、口腔外科的観点からも頭蓋顎顔面骨の先天性疾患、骨折の治癒過程、顎関節における変形性関節症に対する診断あるいは治療を考える上で非常に意義深いことと考える。今後、骨格形成異常の病態解明や診断、および再生療法を始めとする新規治療法開発にも寄与することを視野にいれ、**Zfhx4** の生物学的機能を *in vitro* レベルで明らかにし、内軟骨性骨形成の制御機構に迫っていきたいと考える。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて戴き、終始御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔病因病態制御学講座顎口腔腫瘍学、由良義明教授、ならびに、同口腔分子免疫制御学講座生化学教室、西村理行教授に深甚なる謝意を表します。そして、本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座生化学教室、波多賢二准教授に心より感謝申し上げます。さらに本研究を行うに際し、多大な御援助、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座生化学教室、村上知彦講師ならびに高畑佳史助教に深く感謝します。最後にこの研究に対して多大なる御協力と御助言を戴いた大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座生化学教室ならびに口腔病因病態制御学講座教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. Kobayashi, T. and Kronenberg, H. Minireview : Transcriptional Regulation in Development of Bone. *Endocrinology*. **146**, 1012–17 (2014).
2. Al-Hashmi, N., Imtiaz, F., Ramzan, K., Faden, M., Shuaib, T., Al-Otaibi, L., Al-Hemidan, A. and Al-Owain, M. Novel splice (IVS18+1G>C) mutation in COL2A1 causing Kniest dysplasia. *Clin Dysmorphol*. **22**, 39–41 (2013).
3. Winterpacht, A., Hilbert, M., Schwarze, U., Mundlos, S., Spranger, J. and Zabel, B. U. Kniest and Stickler dysplasia phenotypes caused by collagen type II gene (COL2A1) defect. *Nat Genet*. **3**, 323–6 (1993).
4. Antunes, R. B., Alonso, N. and Paula, R. G. Importance of early diagnosis of Stickler syndrome in newborns. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. **65**, 1029–34 (2012).
5. Hoornaert, K. P., Vereecke, I., Dewinter, C., Rosenberg, T., Beemer, F. A., Leroy, J. G., Bendix, L., Björck, E., Bonduelle, M., Boute, O., Cormier-Daire, V., Die-Smulders, C. De, Dieux-Coeslier, A., Dollfus, H., Elting, M., Green, A., Guerci, V. I., Hennekam, R. C. M., Hilhorts-Hofstee, Y., Holder, M., Hoyng, C., Jones, K. J., Josifova, D., Kaitila, I., Kjaergaard, S., Kroes, Y. H., Lagerstedt, K., Lees, M., Lemerrer, M., Magnani, C., Marcelis, C., Martorell, L., Mathieu, M., McEntagart, M., Mendicino, A., Morton, J., Orazio, G., Paquis, V., Reish, O., Simola, K. O. J., Smithson, S. F., Temple, K. I., Aken, E. Van, Bever, Y. Van, Ende, J. van den, Hagen, J. M. Van, Zelante, L., Zordania, R., Paepe, A. De, Leroy, B. P., Buyzere, M. De, Coucke, P. J. and Mortier, G. R. Stickler syndrome caused by COL2A1 mutations : genotype – phenotype correlation in a series of 100 patients. *Eur J Hum Genet*. **18**, 872–880 (2010).

6. Snead, M. P. and Yates, J. R. W. Clinical and molecular genetics of Stickler syndrome. *J Med Genet.* **36**, 353–9 (1999).
7. Miyamoto, Y., Nakashima, E., Hiraoka, H., Ohashi, H. and Ikegawa, S. A type II collagen mutation also results in oto-spondylo-megaepiphyseal dysplasia. *Hum Genet.* **118**, 175–8 (2005).
8. Melkonieni, M., Brunner, H. G., Manouvrier, S., Hennekam, R., Superti-furga, A., Ka, H., Pauli, R. M., Essen, T. Van, Warman, M. L., Bonaventure, J., Miny, P. and Ala-kokko, L. Autosomal recessive disorder otospondylomegaepiphyseal dysplasia is associated with loss-of-function mutations in the COL11A2 gene. *Am J Hum Genet.* **66**, 368–77 (2000).
9. Lee, B., Vissing, H., Ramirez, F., Rogers, D. and Rimoin, D. Identification of the Molecular Defect in a Family with Spondyloepiphyseal Dysplasia. *Science.* **244**, 978–80 (1989).
10. Jung, S.-C., Mathew, S., Li, Q.-W., Lee, Y.-J., Lee, K.-S. and Song, H.-R. Spondyloepiphyseal dysplasia congenita with absent femoral head. *J Pediatr Orthop B.* **13**, 63–9 (2004).
11. Aigner, T., Dietz, U., Stöss, H. and Mark, K. von der. Differential expression of collagen types I, II, III, and X in human osteophytes. *Lab Invest.* **73**, 236–43 (1995).
12. Nishimura, R., Hata, K., Ono, K., Amano, K., Takigawa, Y., Wakabayashi, M., Takashima, R. and Yoneda, T. Regulation of endochondral ossification by transcription factors. *Front Biosci.* **17**, 2657–66 (2012).
13. Akiyama, H. and Lefebvre, V. Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *J Bone Min. Metab.* **29**, 390–5 (2011).
14. Akiyama, H., Chaboissier, M. C., Martin, J. F., Schedl, A. and de Crombrughe, B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the

- chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* **16**, 2813–28 (2002).
15. Yoshida, C. A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y. and Komori, T. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation , and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* **18**, 952–63 (2004).
 16. Wright, W. E., Sassoon, D. A. and Lin, V. K. Myogenin , a Factor Regulating Myogenesis , Has a Domain Homologous to MyoD. *Cell.* **56**, 607–17 (1989).
 17. Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., Mortensen, R. M. and Farber, D. PPAR gamma Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro. *Mol Cell.* **4**, 611–7 (1999).
 18. Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., de Crombrugge, B. and Lefebvre, V. The Transcription Factors L-Sox5 and Sox6 Are Essential for Cartilage Formation. *Dev Cell.* **1**, 277–90 (2001).
 19. Smits, P., Dy, P., Mitra, S. and Lefebvre, V. Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J Cell Biol.* **164**, 747–58 (2004).
 20. Nishimura, R., Wakabayashi, M., Hata, K., Matsubara, T., Honma, S., Wakisaka, S., Kiyonari, H., Shioi, G., Yamaguchi, A., Tsumaki, N., Akiyama, H. and Yoneda, T. Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx2 during endochondral ossification. *J Biol Chem.* **287**, 33179–90 (2012).
 21. Kawakami, Y., Tsuda, M., Takahashi, S., Taniguchi, N., Esteban, C. R., Zemmyo, M., Furumatsu, T., Lotz, M., Belmonte, J. C. I. and Asahara, H. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**, 2414–9 (2005).

22. Furumatsu, T., Tsuda, M., Yoshida, K., Taniguchi, N., Ito, T., Hashimoto, M., Ito, T. and Asahara, H. Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. *J Biol Chem.* **280**, 35203–8 (2005).
23. Takigawa, Y., Hata, K., Muramatsu, S., Amano, K., Ono, K., Matsuda, A., Takada, K., Nishimura, R. and Yoneda, T. The transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling a transcription factory with Sox9. *J Cell Sci.* **123**, 3780–8 (2010).
24. Amano, K., Hata, K., Muramatsu, S., Wakabayashi, M., Takigawa, Y., Ono, K., Nakanishi, M., Takashima, R., Kogo, M., Matsuda, A., Nishimura, R. and Yoneda, T. Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription. *Mol Biol Cell.* **22**, 1300–11 (2011).
25. Hata, K., Takashima, R., Amano, K., Ono, K., Nakanishi, M., Yoshida, M., Wakabayashi, M., Matsuda, A., Maeda, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Whitson, R. H., Nishimura, R. and Yoneda, T. Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nat Commun.* **4**, 2850 (2013).
26. Nakamura, Y., Yamamoto, K., He, X., Otsuki, B., Kim, Y., Murao, H., Soeda, T., Tsumaki, N., Deng, J. M., Zhang, Z., Behringer, R. R., Crombrughe, B. De, Postlethwait, J. H., Warman, M. L., Nakamura, T. and Akiyama, H. Wwp2 is essential for palatogenesis mediated by the interaction between Sox9 and mediator subunit 25. *Nat Commun.* **2**, 251 (2011).
27. Zou, W., Chen, X., Shim, J.-H., Huang, Z., Brady, N., Hu, D., Drapp, R., Sigrist, K., Glimcher, L. H. and Jones, D. The E3 ubiquitin ligase Wwp2 regulates craniofacial development through mono-ubiquitylation of Goosecoid. *Nat Cell Biol.* **2011** **13**, 59–65 (2011).
28. Hata, K., Nishimura, R., Muramatsu, S., Matsuda, A., Matsubara, T., Amano, K., Ikeda, F., Harley, V. R. and Yoneda, T. Paraspeckle protein p54 nrb links Sox9-

- mediated transcription with RNA processing during chondrogenesis in mice. *J Clin Invest.* **118**, 3098–108 (2008).
29. Nogami, S., Ishii, Y., Kawaguchi, M., Sakata, N., Oya, T., Takagawa, K., Kanamori, M., Sabit, H., Obata, T., Kimura, T. and Sasahara, M. ZFH4 protein is expressed in many neurons of developing rat brain. *J Comp Neurol.* **482**, 33–49 (2005).
 30. Matsumura, H., Hasuwa, H., Inoue, N., Ikawa, M. and Okabe, M. Lineage-specific cell disruption in living mice by Cre-mediated expression of diphtheria toxin A chain. *Biochem Biophys Res Commun.* **321**, 275–9 (2004).
 31. Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S. A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem.* **214**, 70–6 (1993).
 32. Hirata, M., Kugimiya, F., Fukai, A., Ohba, S., Kawamura, N., Ogasawara, T., Kawasaki, Y., Saito, T., Yano, F., Ikeda, T., Nakamura, K., Chung, U. II and Kawaguchi, H. C/EBPbeta Promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57. *PLoS one.* **4**, e4543 (2009).
 33. Himeno, M., Enomoto, H., Liu, W., Ishizeki, K., Nomura, S., Kitamura, Y. and Komori, T. Impaired Vascular Invasion of Cbfa1-Deficient Cartilage Engrafted in the Spleen. *J Bone Min. Res.* **17**, 1297–1305 (2002).
 34. Inada, M., Yasui, T., Nomura, S., Miyake, S., Deguchi, K., Himeno, M., Sato, M., Yamagiwa, H., Kimura, T., Yasui, N., Ochi, T., Endo, N., Kitamura, Y., Kishimoto, T. and Komori, T. Maturational Disturbance of Chondrocytes in Cbfa1 -Deficient Mice. *Dev Dyn.* **214**, 279–90 (1999).
 35. Hirao, M., Tamai, N., Tsumaki, N., Yoshikawa, H. and Myoui, A. Oxygen tension regulates chondrocyte differentiation and function during endochondral ossification. *J Biol Chem.* **281**, 31079–92 (2006).

36. Hartley, J. L., Temple, G. F. and Brasch, M. A. DNA Cloning Using In Vitro Site-Specific Recombination. *Genome Res.* **10**, 1788–95 (2000).
37. Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M. S. and Leahy, D. J. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzym.* **529**, 227–40 (2013).
38. Palomares, M., Delicado, A., Mansilla, E., de Torres, M. L., Vallespín, E., Fernandez, L., Martinez-Glez, V., García-Miñaur, S., Nevado, J., Simarro, F. S., Ruiz-Perez, V. L., Lynch, S. A., Sharkey, F. H., Thuresson, A.-C., Annerén, G., Belligni, E. F., Martínez-Fernández, M. L., Bermejo, E., Nowakowska, B., Kutkowska-Kazmierczak, A., Bocian, E., Obersztyn, E., Martínez-Frías, M. L., Hennekam, R. C. M. and Lapunzina, P. Characterization of a 8q21.11 microdeletion syndrome associated with intellectual disability and a recognizable phenotype. *Am J Hum Genet.* **89**, 295–301 (2011).
39. Hemmi, K., Ma, D., Miura, Y., Kawaguchi, M., Sasahara, M., Hashimoto-Tamaoki, T., Tamaoki, T., Sakata, N. and Tsuchiya, K. A Homeodomain-Zinc Finger Protein , ZFH4 , Is Expressed in Neuronal Differentiation Manner and Suppressed in Muscle Differentiation Manner. *Biol Pharm Bull.* **29**, 1830–5 (2006).
40. Nakade, S., Tsubota, T., Sakane, Y., Kume, S., Sakamoto, N., Obara, M., Daimon, T., Sezutsu, H., Yamamoto, T., Sakuma, T. and Suzuki, K. T. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat Commun.* **5**, 5560 (2014).
41. Sakata, N., Hemmi, K., Kawaguchi, M., Miura, Y., Noguchi, S., Ma, D., Sasahara, M., Kato, T., Hori, M. and Tamaoki, T. The mouse ZFH-4 protein contains four homeodomains and twenty-two zinc fingers. *Biochem Biophys Res Commun.* **273**, 686–93 (2000).

42. Miura, Y., Tam, T., Ido, A., Morinaga, T., Miki, T., Hashimoto, T. and Tamaoki, T. Cloning and Characterization of an ATBF1 Isoform That Expresses in a Neuronal Differentiation-dependent Manner. *J Biol Chem.* **270**, 26840–8 (1995).
43. Sun, X., Fu, X., Li, J., Xing, C., Martin, D. W., Zhang, H. H., Chen, Z. and Dong, J. Heterozygous Deletion of Atbf1 by the Cre-loxP System in Mice Causes Prewaning Mortality. *Genesis.* **50**, 819–27 (2012).
44. Mabuchi, M., Kataoka, H., Miura, Y., Kim, T. S., Kawaguchi, M., Ebi, M., Tanaka, M., Mori, Y., Kubota, E., Mizushima, T., Shimura, T., Mizoshita, T., Tanida, S., Kamiya, T., Asai, K. and Joh, T. Tumor suppressor, AT motif binding factor 1 (ATBF1), translocates to the nucleus with runt domain transcription factor 3 (RUNX3) in response to TGF-beta signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun.* **398**, 321–5 (2010).
45. Nishio, Y., Dong, Y., Paris, M., O’Keefe, R. J., Schwarz, E. M. and Drissi, H. Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene.* **372**, 62–70 (2006).
46. Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R. and de Crombrughe, B. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell.* **108**, 17–29 (2002).
47. Shirley, E. D. and Ain, M. C. Achondroplasia: manifestations and treatment. *J Am Acad Orthop Surg.* **17**, 231–41 (2009).
48. Masel, J. P., Kozlowski, K. and Kiss, P. Autosomal recessive omodysplasia: report of three additional cases. *Pediatr Radiol.* **28**, 608–11 (1998).
49. Maroteaux, P., Sauvegrain, J., Chrispin, A. and Farriaux, J. Omodysplasia. *Am J Med Genet.* **32**, 371–5 (1989).

50. Mégarbané, A., Melick, N. and Daou, L. A newly recognized skeletal dysplasia with rhizomelic limbs and retinitis pigmentosa. *Am J Med Genet A*. **130A**, 176–80 (2004).
51. Kostich, W. A. and Sanes, J. R. Expression of zfh-4, a new member of the zinc finger-homeodomain family, in developing brain and muscle. *Dev Dyn*. **202**, 145–52 (1995).
52. Chudnovsky, Y., Kim, D., Zheng, S., Whyte, W. A., Bansal, M., Bray, M. A., Gopal, S., Theisen, M. A., Bilodeau, S., Thiru, P., Muffat, J., Yilmaz, O. H., Mitalipova, M., Woolard, K., Lee, J., Nishimura, R., Sakata, N., Fine, H. A., Carpenter, A. E., Silver, S. J., Verhaak, R. G. W., Califano, A., Young, R. A., Ligon, K. L., Mellinghoff, I. K., Root, D. E., Sabatini, D. M., Hahn, W. C. and Chheda, M. G. ZFH4 interacts with the NuRD core member CHD4 and regulates the glioblastoma tumor-initiating cell state. *Cell Rep*. **6**, 313–24 (2014).
53. Comabella, M., Craig, D. W., Morcillo-Suárez, C., Río, J., Navarro, A., Fernández, M., Martin, R. and Montalban, X. Genome-wide Scan of 500 000 Single-Nucleotide Polymorphisms Among Responders and Nonresponders to Interferon Beta Therapy in Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. **66**, 972–8 (2009).
54. Osoegawa, K., Iovannisci, D. M., Lin, B., Parodi, C., Schultz, K., Shaw, G. M. and Lammer, E. J. Identification of novel candidate gene loci and increased sex chromosome aneuploidy among infants with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A*. **164A**, 397–406 (2014).
55. McMullan, T. F. W., Crolla, J. A., Gregory, S. G., Carter, N. P., Cooper, R. A., Howell, G. R. and Robinson, D. O. A candidate gene for congenital bilateral isolated ptosis identified by molecular analysis of a de novo balanced translocation. *Hum Genet*. **110**, 244–50 (2002).
56. Silfhout, A. T. V., Hehir-Kwa, J. Y., Bon, B. W. M. van, Schuurs-Hoeijmakers, J. H. M., Meader, S., Hellebrekers, C. J. M., Thoonen, I. J. M., Brouwer, A. P. M. de, Brunner, H. G., Webber, C., Pfundt, R., Leeuw, N. de and Vries, B. B. A. De.

Clinical significance of de novo and inherited copy-number variation. *Hum Mutat.* **34**, 1679–87 (2013).

表 1. real-time PCR に用いた Taqman プライマーおよびプローブ

| | |
|----------------------|---------------------------------|
| Zfhx4-F | 5'-TTAATTTCTGAATGGCCCAGGTCT-3' |
| Zfhx4-R | 5'-CCTGTACACTGACTTGAGACCAAT-3' |
| Zfhx4-probe | 5'-GGGTTGAGGTGTTGAGGCAGCCAGG-3' |
| β -Actin-F | 5'-TTAATTTCTGAATGGCCCAGGTCT-3' |
| β -Actin-R | 5'-ATTGGTCTCAAGTCAGTGTACAGG-3' |
| β -Actin-probe | 5'-CCTGGCTGCCTCAACACCTCAACCC-3' |

表 2. Zfhx4 flox マウス、Zfhx4 KO マウス、および、CAG-Cre トランスジェニックマウスの遺伝子型の確認に用いた PCR プライマー

| | |
|---------------|-------------------------------|
| Zfhx4-Flox-F1 | 5'-CACTGTGCATGAGGCAAAAC-3' |
| Zfhx4-Flox-R1 | 5'-GAACCTCTTCGAGGGACCTAA-3' |
| Zfhx4-Flox-F2 | 5'-GCCAAAGGCTGACTCAAAAC-3' |
| Zfhx4-Flox-R2 | 5'-GGGTCCCCACTGTGATTTCT-3' |
| Zfhx4-Del-F1 | 5'-GGCAAACGGTGATCCTCTA-3' |
| Zfhx4-Del-R1 | 5'-GGGTCCCCACTGTGATTTCT-3' |
| Zfhx4-Del-F2 | 5'-TCACTGTGCATGAGGCAAAAC-3' |
| Zfhx4-Del-R1 | 5'-GGGTCCCCACTGTGATTTCTA-3' |
| Zfhx4-Ex2-F1 | 5'-CGTCCCAGAGAAAGAGCTGA-3' |
| Zfhx4-Ex2-R1 | 5'-CTCTGTAGGTTTTGACCTTTTGG-3' |
| CAG-Cre-F | 5'-GTTTCACTGGTTATGCGGCGG-3' |
| CAG-Cre-R | 5'-TTCCAGGGCGCGAGTTGATAG-3' |

表 3. Zfhx4 flox マウスの遺伝子型の確認に用いたサザンブロットティングのプロローブ

5'-TGGAAGCAGGCCATCCTGAACTGAGTGAAGCTGAACTGCAGCAGC
TCTATGCCTCCTTGCCAATGAATGGTGAGCTCTGGGCAGAGAGTGAG
ACAATGACCCAGGATGACCATGGCATAGATCAGGAAATGGAGAGAGA
ATATGAGGTGGACCATGAAGGGAAGGCAAGTCCTGTAGAGAGCGACA
GCAGCTCTATCCCAGATGATCTGGGCTTGGAAACCAAAGCGGACCTTA
CCTTTTAGAAAAGGACCCAACCTTTACAATGGAAAAATTCCTCGATCCAT
CTCGTCCTTACAAGTGTACAGTGTGTAAAGAGTCATTTACCCAAAAGA
ACATTCTCTTGGTCCATTATAATTCAGTGTCTCACTTGCATAAGTTGAAA
AAGGTTTTGCAAGAAGCCTCCAGTCCTGTCCCCCAGGAAGCCAATAG
CAGCACAGATAATAAGCCCTACAAGTGCAGCACCTGCAGTGTTGCATA
CAGCCAAAGCTCGACCTTGGAGATCCACATGAGATCAGTGCTCCACC
AGACAAAGGCCAGGGCTGCAAAGCTGGAACCAAGTAGACACCTACC
CAGTGGTCATAGCATCACAGCT-3'

表 4. マウス肢芽細胞における遺伝子プロファイリング

胎生 12.5 日齢よりマウス肢芽細胞を採取し、コントロールウイルス、BMP2 ウイルスあるいは、Sox6 および Sox9 ウイルスを感染させ、Microarray 解析により、遺伝子プロファイルを検索した。

| | Gene | Control | BMP2 | Sox9 + Sox6 |
|----|-----------------------|----------------|-------------|--------------------|
| 1 | <i>p54nrb</i> | 3431.6 | 3431.6 | 3431.6 |
| 2 | <i>Arid5b</i> | 2606.5 | 3297.8 | 2731.3 |
| 3 | <i>Oasis</i> | 1914.7 | 1773.0 | 2103.9 |
| 4 | <i>BBF2H7</i> | 1811.2 | 1654.6 | 1485.9 |
| 5 | <i>Zfhx4</i> | 1750.6 | 1228.6 | 1540.7 |
| 6 | <i>Cbfb</i> | 1600.3 | 1832.1 | 1389.4 |
| 7 | <i>TAZ</i> | 1573.3 | 1502.4 | 1469.1 |
| 8 | <i>Gli3</i> | 1525.4 | 1525.4 | 1494.5 |
| 9 | <i>Runx1</i> | 1016.2 | 1545.4 | 1312.9 |
| 10 | <i>ATF4</i> | 802.0 | 924.9 | 834.1 |
| 11 | <i>Sox9</i> | 672.0 | 1382.9 | 871.4 |
| 12 | <i>Wwp2</i> | 504.7 | 687.7 | 521.1 |
| 13 | <i>Gli2</i> | 490.0 | 328.5 | 417.4 |
| 14 | <i>Runx2</i> | 472.8 | 876.1 | 422.0 |
| 15 | <i>Dlx5</i> | 246.6 | 425.9 | 177.9 |
| 16 | <i>Sox6</i> | 230.2 | 230.2 | 985.0 |
| 17 | <i>Dlx2</i> | 170.3 | 1033.0 | 197.0 |
| 18 | <i>Msx2</i> | 145.6 | 1031.7 | 165.6 |
| 19 | <i>Lef1</i> | 141.6 | 230.7 | 143.3 |
| 20 | <i>Gli1</i> | 134.9 | 134.9 | 132.5 |
| 21 | <i>Sox5</i> | 129.6 | 129.6 | 129.6 |
| 22 | <i>Dlx6</i> | 116.4 | 136.2 | 111.3 |
| 23 | <i>Osterix</i> | 66.3 | 1095.6 | 58.7 |

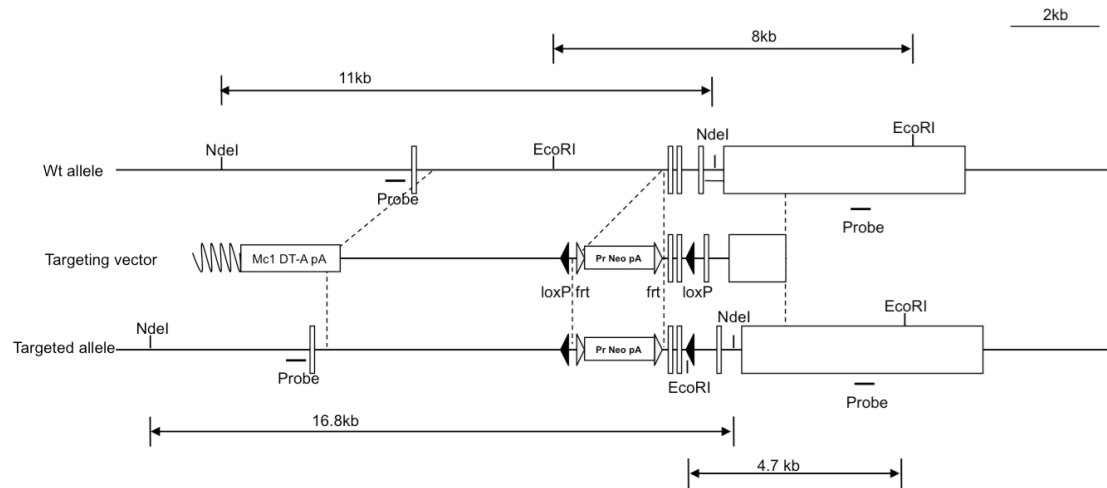


図 1. Zfhx4 flox ターゲティングベクターの設計図

Zfhx4 エキソン2の5'側に近接するイントロン1と、エキソン3の3'側のイントロン領域にloxP配列を導入した、ネオマイシン耐性遺伝子発現カセットを含むターゲティングベクターを作製した。サザンブロッティングで使用したProbeは、図のとおりである。

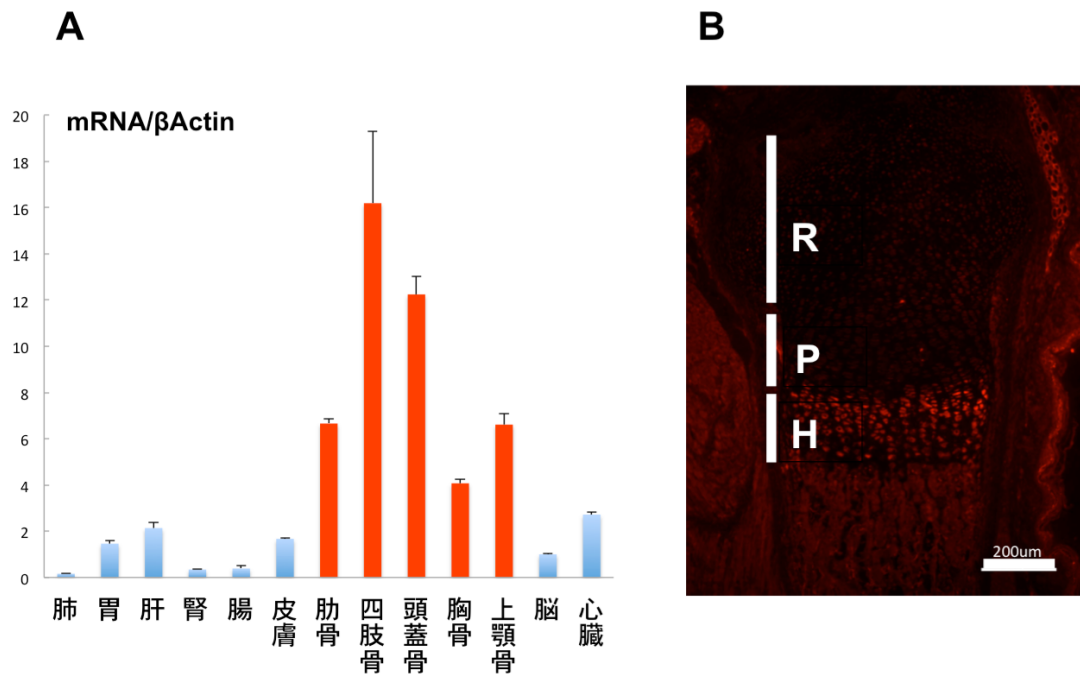


図 2. 組織および成長軟骨板における *Zfhx4* の発現

(A) 生体内組織における *Zfhx4* mRNA の発現. 生後 0 日齢 ICR マウスから採取した各組織を検体とし、*Zfhx4* 遺伝子特異的な Taqman probe を用いて RT-qPCR を行った。各組織の *Zfhx4* 遺伝子発現量は β -アクチンの発現量で補正し、脳での発現量の倍数で示した。(平均および標準偏差を示す。)

(B) 軟骨組織における *Zfhx4* の蛍光免疫染色. 生後 2 日齢マウス脛骨を、抗 *Zfhx4* 抗体を用いて免疫染色を行った後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー: 200 μ m R: 静止軟骨細胞層 P: 増殖軟骨細胞層 H: 肥大軟骨細胞層

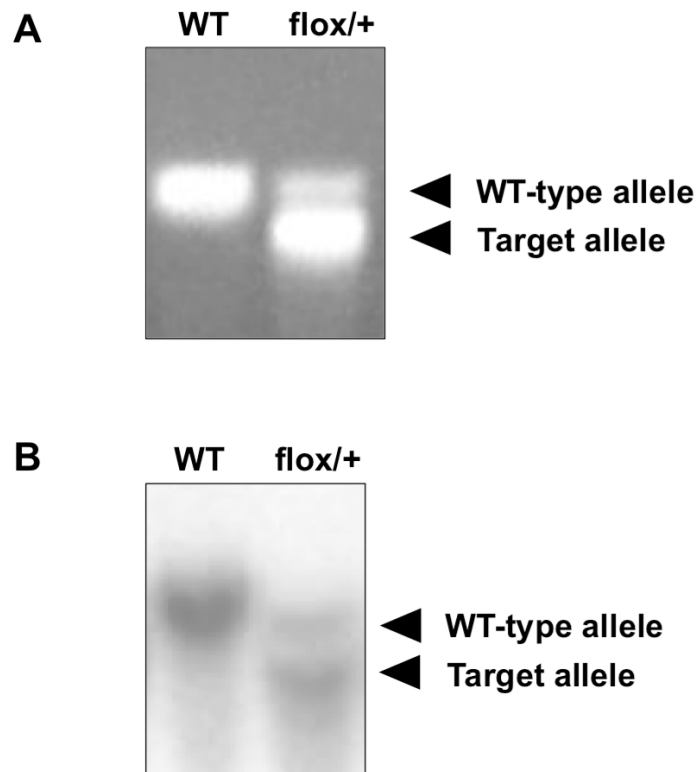


図 3. Zfhx4 flox ヘテロマウスの flox アリルの germ line transmission の確認

(A) Zfhx4 flox キメラマウスと C57BL/J を交配して得られた産仔の尻尾よりゲノム DNA を採取し、Zfhx4 flox ヘテロマウスの flox アリルを、PCR により確認した。WT : 野生型。

(B) Zfhx4 flox キメラマウスと C57BL/J を交配して得られた産仔の尻尾よりゲノム DNA を採取し、Zfhx4 flox ヘテロマウスの flox アリルを、サザンブロットにより確認した。WT:野生型。

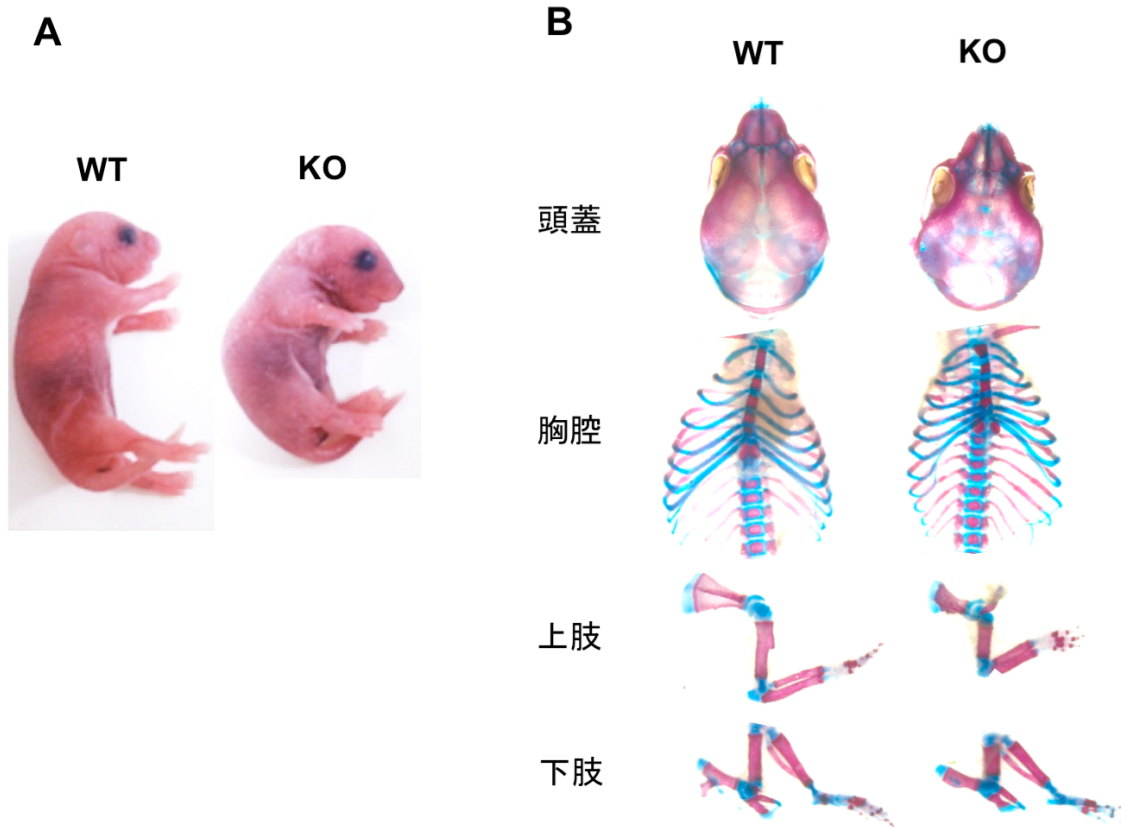


図 4. 生後 0 日齢 Zfhx4 KO マウスの表現型

(A) 生後 0 日齢 野生型 マウスおよび同腹の Zfhx4 KO マウスの全体写真

(B) 生後 0 日齢 野生型 マウスおよび 同腹の Zfhx4 KO マウスの骨格標本像. 生後 0 日齢 WT マウスおよび Zfhx4 KO マウスをエタノールで浸漬固定後、軟骨組織はアルシアンブルーで、骨組織はアリザリンレッド S 溶液で染色した。

WT : 野生型マウス, KO : Zfhx4 KO マウス

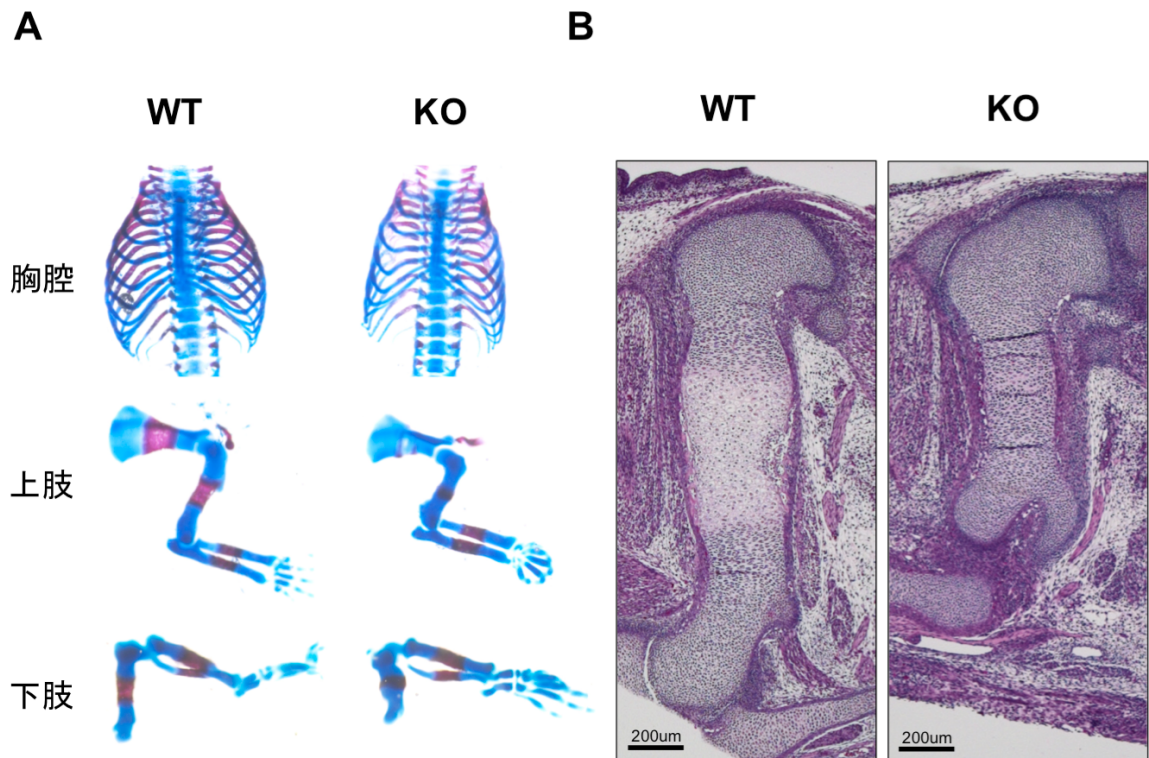


図 5. 胎生 15.5 日齢 Zfhx4 KO マウスにおける骨格形成の遅延

(A) 胎生 15.5 日齢 野生型 マウスおよび Zfhx4 KO マウスの骨格標本. 生後 0 日齢 野生型マウスおよび 同腹の Zfhx4 KO マウスをエタノールで浸漬固定後、軟骨組織はアルシアンブルーで、骨組織はアリザリンレッド S 溶液で染色した。

(B) 胎生 15.5 日齢 野生型 マウスおよび同腹の Zfhx4 KO マウスの大腿骨の HE 染色。

スケールバー: 200µm WT : 野生型マウス, KO : Zfhx4 KO マウス

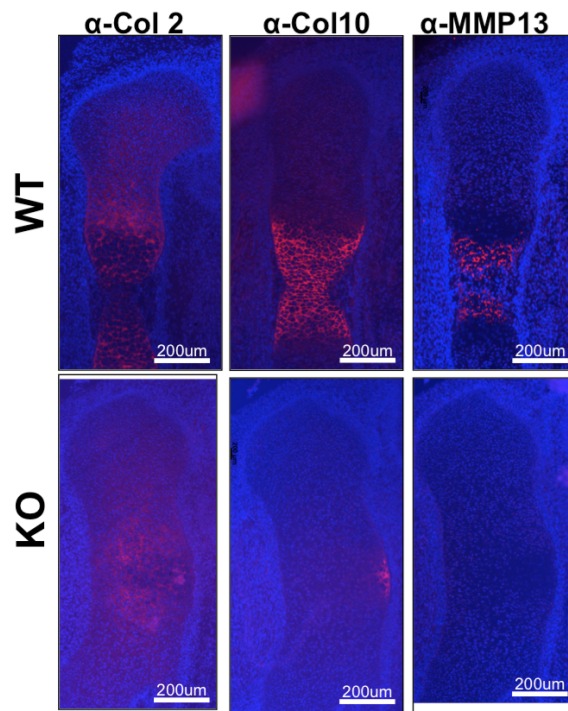


図 6. 胎生 15.5 日齢 Zfx4 KO マウスの内軟骨性骨形成の後期過程の阻害

胎生 15.5 日齢野生型マウスならびに同腹の Zfx4 KO マウスの大腿骨切片を抗 2 型コラーゲン抗体 (α -Col2)、抗 10 型コラーゲン抗体 (α -Col10)、抗 MMP13 抗体 (α -MMP13) を用いて免疫染色を行った後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。スケールバー: 200 μ m WT : 野生型マウス, KO : Zfx4 KO マウス

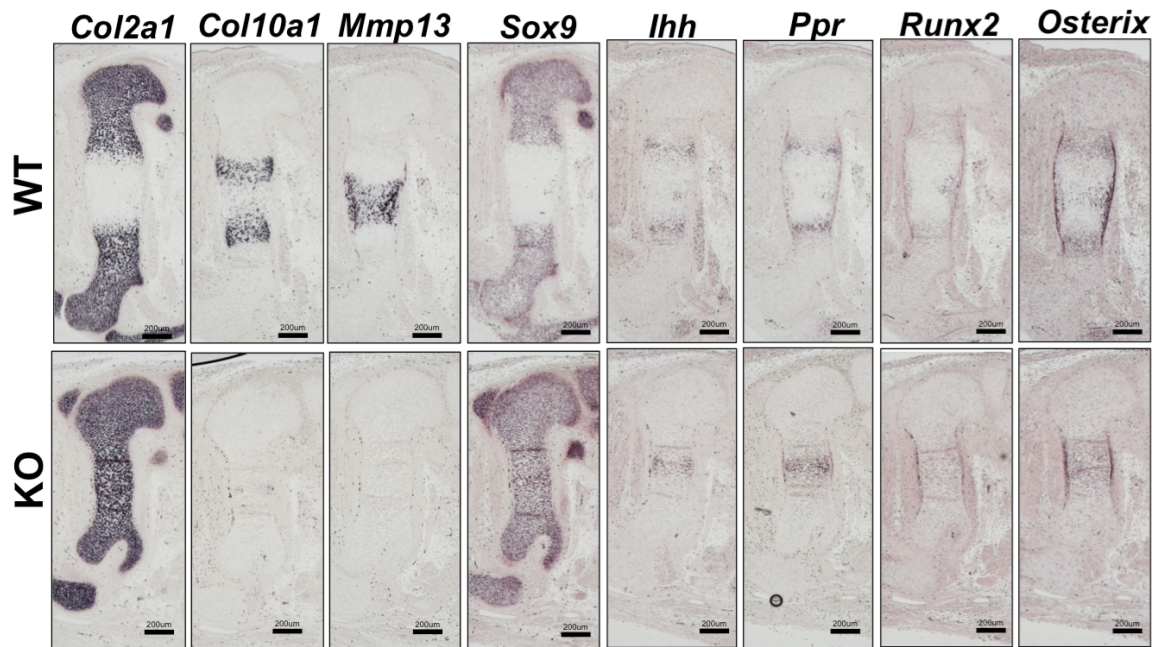


図 7. 胎生 15.5 日齢 Zfx4 KO マウスの内軟骨性骨形成の後期過程の阻害

胎生 15.5 日齢野生型マウスならびに同腹の Zfx4 KO マウスの大腿骨における *Col2a1*、*Col10a1*、*Mmp13*、*Sox9*、*Ihh*、PTH 受容体 (*Ppr*)、*Runx2* および *Osterix* の mRNA の発現を in situ ハイブリダイゼーション法により検討した。スケールバー：200µm WT：野生型マウス，KO：Zfx4 KO マウス

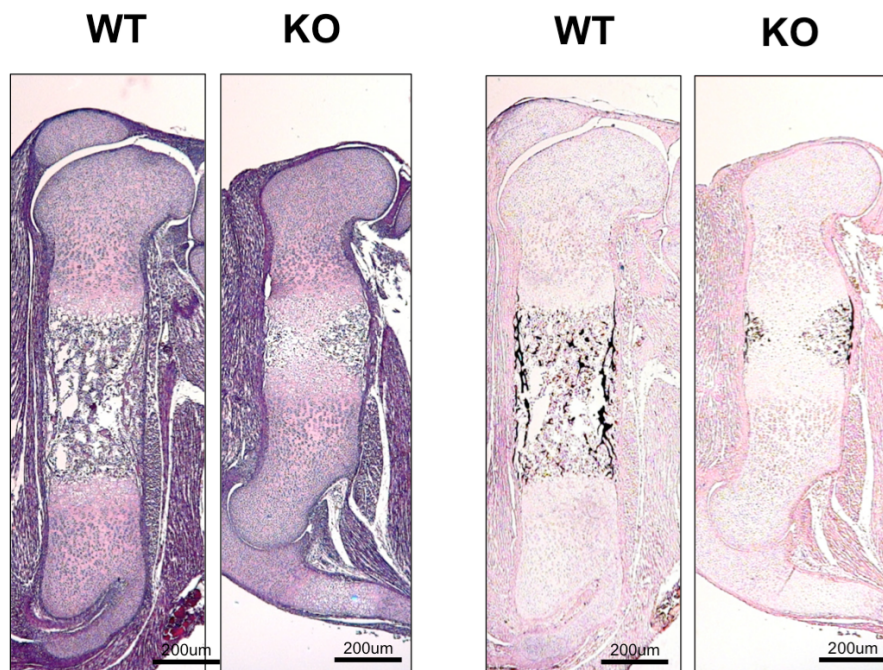


図 8. 胎生 16.5 日齢 *Zfhx4* KO マウスにおける内軟骨性骨形成の石灰化過程の阻害

胎生 16.5 日齢野生型マウスおよび同腹の *Zfhx4* KO マウスの大腿骨における軟骨基質の石灰化ならびに軟骨組織の骨組織への置換を von Kossa 染色により検討した。左パネルは HE 染色像を示す。スケールバー: 200µm WT: 野生型マウス, KO: *Zfhx4* KO マウス

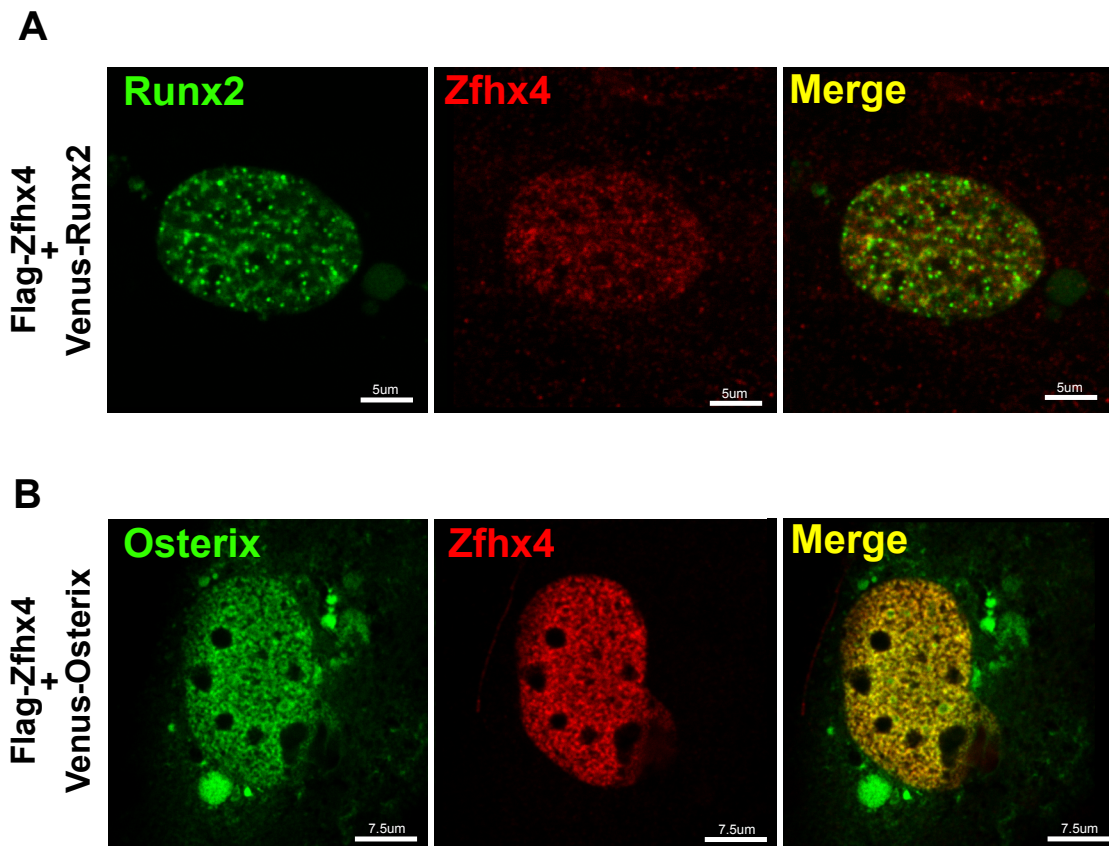


図 9. Zfhx4 と Osterix の核内における共局在

Flag 標識した Zfhx4 発現ベクター(Flag-Zfhx4)と Venus 標識した Runx2 発現ベクター (Venus-Runx2) もしくは Venus 標識した Osterix 発現ベクター (Venus-Osterix) を C3H10T1/2 細胞にトランスフェクションし、48 時間後、抗 Flag 抗体にて染色後、共焦点レーザー顕微鏡 (Leica SP8)にて XY 軸の写真撮影を行った。Merge は重ね合わせ画像を示す。

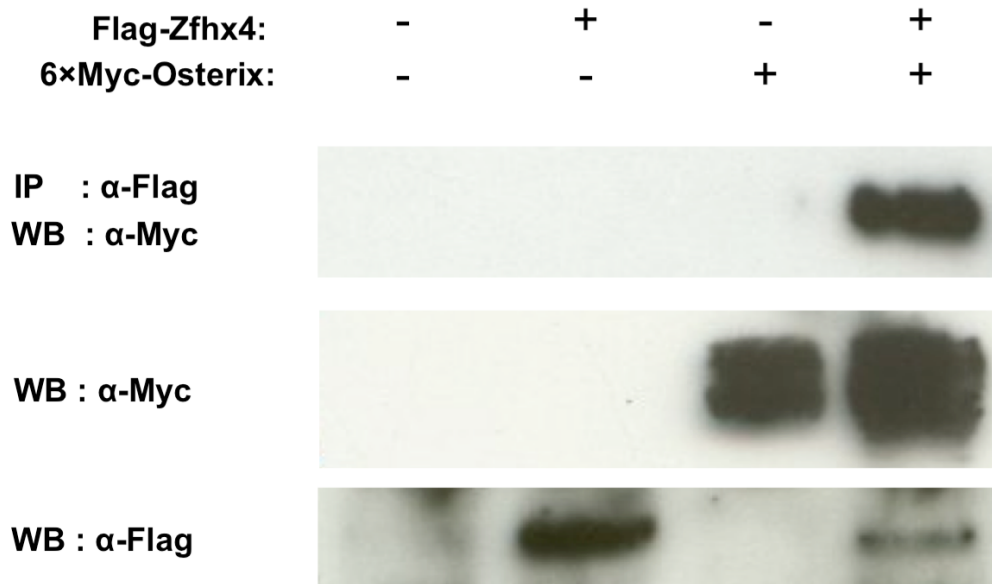


図 10. Zfhx4 と Osterix の物理的結合

293 FT細胞に、pcDNAZeoベクター、Myc 標識した Osterix 発現ベクター (Myc-Osterix)、Flag 標識した Zfhx4 発現ベクター(Flag-Zfhx4)、あるいはその両者 をトランスフェクションし、60 時間培養後、細胞溶解し、細胞内タンパク質を回収した。得られたタンパク質を抗 Flag 抗体にて免疫沈降後、抗 Myc 抗体にてウェスタンブロッティングを行った(パネル最上段)。Myc-Osterix と Flag-Zfhx4 の発現レベルは、抗 Myc抗体(パネル中段)、抗 Flag抗体(パネル最下段)を用いたウェスタンブロッティングにより確認した。