

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11611

研究課題名(和文) TRPS1発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Elucidating the transcriptional regulation of TRPS1

研究代表者

阿部 真土 (Abe, Makoto)

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：40448105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子TRPS1の変異により遺伝性疾患である毛髪鼻指節骨症候群(TRPS)が発症する。本疾患は若年での脱毛症や、変形性関節症発症など重篤な病態を示すことがある。また、患者の多くは低身長を示すことが多い。Trps1遺伝子変異マウスはTRPSの病態を示し病態発症のメカニズムの理解はかなり進んできた。疾患の理解が進む一方で、TRPS1遺伝子発現制御の機序はほとんどわかっていない。本研究ではマウス個体レベルでTrps1遺伝子の発現を制御するゲノム候補領域を欠失させたマウスを作成した。さらに片アレルでTrps1遺伝子を欠損させたマウスを交配で作出し、生後から進行する頭殿長伸長の強い抑制を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TRPSは重篤な病態を示すことがあり、病態発症機序を解明することは重要である。世界で2系統のTrps1遺伝子変異マウスが報告されている。コンベンショナルなKOマウス(Trps1-KO)とTrps1のDNA結合領域があるGATAタイプのジンクフィンガーモチーフのみの欠失マウスである(Trps1-deltaGt)。今まで多くの知見を供してきたTrps1遺伝子変異マウスはホモを用いて行ってきたが、生後に進行する病態などに関して解析することは困難であった。今回作出したEnh+/-;Trps1+/-マウスは生後もしばらくは生きることができ、成長不全を示すことから病態をより反映するモデル動物と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Tricho-rhino-phalangeal syndrome (TRPS) is a genetic disorder inherited in an autosomal dominant manner. Missense mutation or deletion of the transcription factor, TRPS1, is known as most of the causes of TRPS. Patients of TRPS suffer from pediatric alopecia, joint pathologies, and short stature. Understanding of the TRPS pathologies have been intimately investigated by the usage of Trps1 knockout mouse strains. Most of the studies reporting the pathologies of TRPS is shown by the usage of homozygote knockout mice. There are no doubt that analysis of these knockout mice have proved the pathologies of TRPS; however, the perinatal lethality of the knockout mice hampered the investigation of TRPS in postnatal stages. During this funding period, we were able to generate Trps1 hypomorphic strain which live for several days and display significant growth failure. This strain enables investigation of postnatal pathologies of TRPS.

研究分野：発生生物学

キーワード：TRPS1 骨系統疾患 脱毛症 エンハンサー ノックアウトマウス 先天性心形態異常 低身長 軟骨成長板

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、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

TRPS1 遺伝子の変異や欠失は遺伝性疾患 TRPS の原因であることは知られていた。また、TRPS1 遺伝子に変異が入る位置により、表現型とある程度の相関があることも報告されていた。また、TRPS が特徴的な表現型を示すことから TRPS 疑いの患者が少なからずおり、TRPS1 遺伝子には変異が見出せない場合があることも知られていた。TRPS が時として重篤な症状を示すことから疾患が発症するメカニズムや、重症化する機序を解明することは大変重要である。近年では TRPS1 遺伝子が位置するゲノム領域と大腿骨の骨量の低下が連鎖することや、骨芽細胞分化のマスタ因子の一つである RUNX2 と相互作用することなどが報告されたことで、TRPS1 が骨格系の発生や恒常性の維持に關与する可能性、またその作用機序が主要な骨形成因子を制御することで行われている可能性が示唆されていた。TRPS の病態発症のメカニズムは Trps1 遺伝子改変動物を用いた解析から多くの知見が得られてきた。しかし、いまだに根本的な治療法の開発には至っていないどころか、動物モデルでの化合物などの効果を見るというところにも至っていないのが本プロジェクト開始当初の状況であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、TRPS の病態を反映するより適した動物モデルを作成することを目的とした。この際、TRPS1 遺伝子発現を制御、増強するゲノム配列を見出すことで、この配列をゲノム編集法により欠失させたマウスを作出する手法を用いる。

### 3. 研究の方法

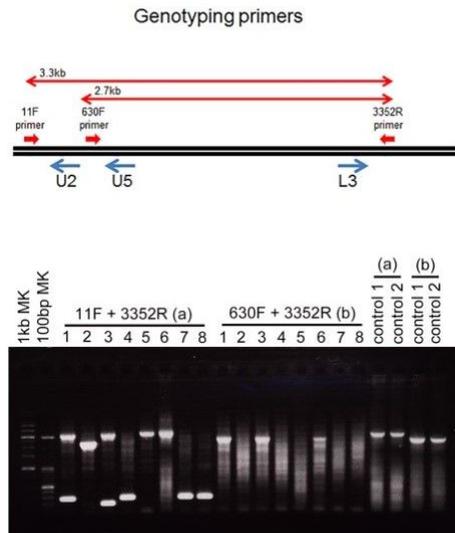
- (1) 前回の助成期間内にマウス Trps1 遺伝子転写開始部位上流約 4kb 配列の組織発現プロモーターとエンハンサーの有無の検証はレポーターを含むトランスジェニックマウスを作成して行った。その結果、関節軟骨、毛包、心臓、腎臓など Trps1 が発現する組織の一部に組織発現エンハンサー活性が認められた。今回、この配列の大部分(最小プロモーターと考えられる配列は残している)をゲノム編集法で欠失させたマウスを作出し、交配により、このエンハンサーを両アレルで欠失するホモ K0 マウス (Trps1-Enh1-K0 マウス) を産出し、Trps1 ノックアウトマウスでみられる表現型の一部でも見出せるかを検討した。
- (2) 軟骨成長版を含めた Trps1 遺伝子発現エンハンサーのさらなる同定を目指し、Trps1 ゲノム領域のオープンクロマチン領域の検討を行い(共同研究者による解析) 同定した発現エンハンサー候補領域を欠失させたマウスをゲノム編集法で作出した。欠失させた領域は最も長いもので 20kb (Enh2/3)、さらにその中のピークが大きく 2 か所同定できたので、それぞれのピーク配列 (Enh2、Enh3) を含む領域のみを個別にゲノム編集法で欠失させたマウスを作出した。交配により、各系統のホモ欠失マウスを産出し、表現型解析、遺伝子発現解析を行った。
- (3) 各エンハンサー欠失マウスと Trps1 遺伝子ヘテロ欠失マウスを交配し、片アレルでエンハンサー候補領域を、もう片方のアレルで Trps1 遺伝子を欠失したマウスを産出した。これらのマウスの表現型解析、遺伝子発現解析を行った。
- (4) 表現型解析は通常の身体測定(体長測定、体重測定)のほか、骨格形態形成の解析を目的とし、マイクロ computed tomography (マイクロ CT) による撮影を行い、椎骨の弯曲の程度の変化などを検討した。遺伝子発現解析は組織での発現を検出するた

め、In situ hybridization 法を中心に用いた。

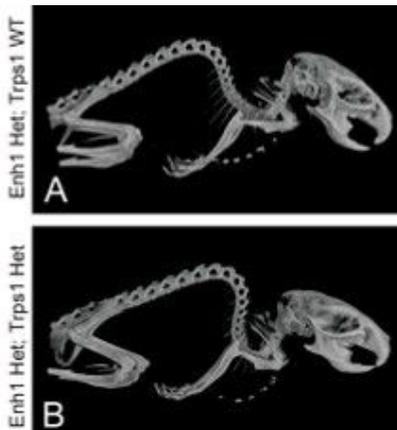
#### 4. 研究成果

##### (1) Trps1-Enh1-K0 マウスの作出ならびに表現型解析

Trps1 遺伝子の転写開始部位上流約 3.2kb の配列を欠失させるためのガイド RNA の候補配列の中で、Split-EGFP アッセイで最も切断効率の良かった組み合わせを決定した。マウスの受精卵に 2 種のガイド RNA と Cas9 を導入し、偽妊娠マウスの卵管へ移植、仔を産出した。この行程は共同実験者である大阪大学伊川正人教授のラボで行った。遺伝子型判定を行い、複数のヘテロ欠失マウスを得ることができた(右図: 欠失させる遺伝子座を挟むように判定用のプライマーを設計した。11F と 3352R のプライマーの組み合わせで PCR を行うと、いくつかのサンプルで長い産物と短い産物が増幅されている。長い産物はゲノムそのものを増幅したもので、短い産物(役 300bp) は欠失した部位は増幅されなかったものを示し、Enh1 ヘテロ K0 マウスであることを示している)。



ゲノム編集法を用いた K0 マウスの F0 世代はモザイクとなることがあるため、まず得られたヘテロ雄マウスを野生型 C57Bl/6 雌マウスと交配させ、F1 世代で Enh1 の欠失アレルを持つ仔マウスをその後の交配実験に用いた。Enh1 ヘテロ雌雄の交配の結果、期待する割合で Enh1 ホモ K0 マウスの産出が認められた。一部の Enh1-K0 マウスに軽度の側弯症がみられたが、大部分の K0 マウスは正常の形態形成、成長を示し、ホモ K0 雌雄の交配により、仔も産出可能であることが分かった。そこで、片アレルで Trps1 遺伝子を欠失させた場合の表現型を検討するため、Enh1 ヘテロマウスと Trps1 ヘテロマウスを交配し、



Enh1+/-;Trps1+/-マウスを得た。このマウスはコントロールマウスと比べて強度の後湾症がみられた(左図: 上はコントロールマウスのマイクロ CT 側面像を示し、下は Enh1+/-;Trps1+/- マウスの側面像を示す。Enh1+/-;Trps1+/-マウスで胸椎から腰椎にかけての椎骨の強度の後湾が認められる)。この表現型は Trps1- $\square$ Gt ヘテロマウスに似ており、一部 Trps1 遺伝子の発現に Enh1 配列が関与していることが示唆された。このマウスは理研バイオリソースセンターに寄託した (RBRC10942)。

##### (2) Trps1 遺伝子発現新規エンハンサー候補の欠失マウスの作出

Trps1 遺伝子周囲のオープンクロマチン領域の検討を行い、Trps1 遺伝子が含まれる領域内に約 15kb 離れた 2 つのピークを見出した(データ示さず)。この 2 つのピークは各々 2kb ほどの長さであった(Enh2、Enh3)。そこでまずこの 2 つのピークを同時に欠失したマウスをゲノム編集法により作出した(Enh2/3-K0 マウス)。この行程は共同研究者であるがん研究会の八尾良治先生のラボで行った。Enh2/3 を欠失した F0 マウスを複数得ることができ、まず野生型 C57Bl/6 雌との交配でヘテロの F1 世代を得た。ヘテ

口の雌雄の交配により、約 24%の割合で Enh2/3-K0 マウスを得た。これは期待する割合に極めて近く、出生後すぐに致死などの可能性は低いと思われた。ただ、数匹の Enh2/3-K0 マウスは（原因は不明だが）生後 3 週目あたりで死んでしまっていることがあった。成長の程度を解析するため、生後 8 週目まで体重を測定したところ、有意ではないものの、Enh2/3-K0 マウスで体重の増加がコントロール群（野生型、ヘテロ欠失マウス）と比較して緩徐である傾向がみられた。そこで、この系統のマウスの片アレルで Trps1 遺伝子を欠失するマウスを交配により作出した（Enh2/3+/-;Trps1+/-マウス）、生まれた仔マウスの中に、生後 3 日後ほどから明らかに成長の悪い個体がたびたび見られた。断乳を待たずに仔マウスを回収、安楽死後、遺伝子型判定を行うと、成長の悪い個体はすべて Enh2/3+/-;Trps1+/-の遺伝子型であった（上図：生後 4 日目の同腹マウスの仔の一部を示す。左側 2 匹は野生型、中央 2 匹は Enh2/3 ヘテロ欠失マウス、右側 1 匹は Enh2/3+/-;Trps1+/-マウスを示す。ダブルヘテロマウスに約 30%の頭殿長の短縮がみられる）。生後 3 週目の断乳時に遺伝子型判定を行い、現在までに 1 匹だけ Enh2/3;Trps1+/-マウスを確認できているが、このマウスも同腹のマウスとのサイズの差は明らかであった（データ示さず）。Trps1 遺伝子 K0 マウスは出生直前や出生後すぐでも見た目で K0 マウスを判定することは容易であるが、このダブルヘテロマウスは出生時には見た目で判別することは困難であった。また、胎生後期に妊娠雌マウスを安楽死させ、胎子を回収してもダブルヘテロマウスを頭殿長の差や見た目で同定することは困難であった（データ示さず）。これは、出生後から成長不全がみられ始めることを示唆していると考えられた。



ウスの片アレルで Trps1 遺伝子を欠失するマウスを交配により作出した（Enh2/3+/-;Trps1+/-マウス）、生まれた仔マウスの中に、生後 3 日後ほどから明らかに成長の悪い個体がたびたび見られた。断乳を待たずに仔マウスを回収、安楽死後、遺伝子型判定を行うと、成長の悪い

い個体はすべて Enh2/3+/-;Trps1+/-の遺伝子型であった（上図：生後 4 日目の同腹マウスの仔の一部を示す。左側 2 匹は野生型、中央 2 匹は Enh2/3 ヘテロ欠失マウス、右側 1 匹は Enh2/3+/-;Trps1+/-マウスを示す。ダブルヘテロマウスに約 30%の頭殿長の短縮がみられる）。生後 3 週目の断乳時に遺伝子型判定を行い、現在までに 1 匹だけ Enh2/3;Trps1+/-マウスを確認できているが、このマウスも同腹のマウスとのサイズの差は明らかであった（データ示さず）。Trps1 遺伝子 K0 マウスは出生直前や出生後すぐでも見た目で K0 マウスを判定することは容易であるが、このダブルヘテロマウスは出生時には見た目で判別することは困難であった。また、胎生後期に妊娠雌マウスを安楽死させ、胎子を回収してもダブルヘテロマウスを頭殿長の差や見た目で同定することは困難であった（データ示さず）。これは、出生後から成長不全がみられ始めることを示唆していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeuchi Y., Kito A., Itoh S., Naruse H., Fijikawa J., Sadek K., Yamashiro T., Waksaka S., Abe M.	4. 巻 371
2. 論文標題 Kruppel-Like Factor 4 represses osteoblast differentiation via ciliary Hedgehog signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp. Cell Research	6. 最初と最後の頁 417-425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.yexcr.2018.09.002	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 該当する
1. 著者名 Fujikawa J., Takeuchi Y., Nomir A.G., Kito A., Elkhatab E., Ghaleb A., Yang V., Akiyama S., Morisaki I., Yamashiro T., Wakisaka S., Abe M.	4. 巻 370
2. 論文標題 Kruppel-like factor 4 regulates metalloproteinase and aggrecanase gene expression in chondrocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Tissue Research	6. 最初と最後の頁 441-449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-017-2674-0	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 該当する
1. 著者名 Yamauchi Y., Itoh S., Naruse H., Itoh Y., Abe M., Kagioka T., Hayashi M.	4. 巻 119
2. 論文標題 HipOP mesenchymal population has high potential for repairing injured peripheral nerves	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Cellular Biochem.	6. 最初と最後の頁 417-425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.26684	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 Takeuchi Y., Tatsuta S., Kito A., Itoh S., Itoh Y., Akiyama S., Yamashiro T., Wakisaka S., Abe M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Kruppel-Like Factor 4 upregulates Matrix Metallo proteinase 13 expression in chondrocytes via mRNA stabilization.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Tissue Research	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） なし	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14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阿部真土、佐伯直哉、波多賢二、宮崎紗理奈、立田咲百合
2. 発表標題 TRPS1遺伝子の発現制御機構の解析
3. 学会等名 2019年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立田咲百合、金井凜、竹内優斗、佐伯直哉、阿部真土
2. 発表標題 核内レセプターNr1i2は骨芽細胞遺伝子発現を制御する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 犬伏俊博、中西祐一郎、阿部真土、山口祐、山城隆
2. 発表標題 ヒアルロン酸は神経堤細胞の遊走を調節することで顎顔面形成を制御する
3. 学会等名 第78回日本歯科矯正歯科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内優斗、藤川順司、立田咲百合、阿部真土
2. 発表標題 KLF4は頭頸部正常発生に必須である
3. 学会等名 第12回大阪大学医学系若手研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部真土、竹内優斗、鬼頭昭吉、立田咲百合、金井凜
2. 発表標題 軟骨細胞におけるKLF4のMMP13発現誘導メカニズム
3. 学会等名 平成30年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内優斗、鬼頭昭吉、阿部真土
2. 発表標題 KLF4による骨芽細胞分化の抑制はヘッジホッグシグナルの活性化でレスキューできる
3. 学会等名 第11回大阪大学医学系若手研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鬼頭昭吉、竹内優斗、阿部真土
2. 発表標題 KLF4は軟骨細胞においてHDAC3を介してMMP13の発現を制御する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内優斗、鬼頭昭吉、阿部真土
2. 発表標題 KLF4は一次繊毛におけるヘッジホッグシグナルを介して骨芽細胞の分化を抑制する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Abe M.
2. 発表標題 Kruppel-Like Factor 4 in skeletal development and disease
3. 学会等名 Yonsei Biomedical Dialogue 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鬼頭昭吉、竹内優斗、阿部真土、脇坂聡
2. 発表標題 KLF4は一次繊毛の形成・維持・繊毛を介するシグナルに作用し骨芽細胞分化を抑制する
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 阿部真土
2. 発表標題 Roles of TRPS1 in craniofacial development
3. 学会等名 Internationla Symposium 2017 Oral and Craniofacial Development and Diseases
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 阿部真土、竹内優斗、鬼頭昭吉、脇坂聡
2. 発表標題 転写因子KLF4はヘッジホッグシグナリングを制御することで骨芽細胞分化を抑制する
3. 学会等名 第93回日本解剖学会・近畿支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鬼頭昭吉、竹内優斗、阿部真土
2. 発表標題 KLF4はHDAC3の活性を制御することでMMP13の発現を誘導する
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 阿部真土、竹内優斗、鬼頭昭吉、アーメドノミル
2. 発表標題 マウスTr p s 1 遺伝子上流配列の組織特異的遺伝子発現への寄与
3. 学会等名 平成29年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="https://web.dent.osaka-u.ac.jp/oa1/">https://web.dent.osaka-u.ac.jp/oa1/</a>
---

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
研究分担者	佐藤 淳  (Sato Sunao)  (70335660)	大阪大学・歯学研究科・講師    (14401)	