

機関番号：17301  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590331  
 研究課題名(和文) TGF シグナル系と細胞外マトリックスの異常が引き起こす疾患群の発症機序の解明  
 研究課題名(英文) Genetic disorders caused by the aberration of TGF signaling pathway and extracellular matrix proteins  
 研究代表者 木下 晃 (Kinoshita Akira)  
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号：60372778

研究成果の概要(和文)：これまでに我々は、*TGFBI* および *TGFBR2* 遺伝子の変異により常染色体優性遺伝病が発症することを報告してきた。本研究では、患者で同定された変異を導入した *Tgfb1* および *Tgfbr2* 遺伝子改変マウスを作製し、その表現型から TGF シグナル系の異常が引き起こす細胞外マトリックス産生・沈着異常を明らかにしようとしたが、作製したキメラマウスは全て不妊であり、目的を達成することは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that mutations in *TGFBI* and *TGFBR2* caused autosomal dominant disorders (Cammurati-Engelmann disease and Marfansyndrome type II). To reveal the relationship between unregulated production/adoption of extracellular matrix proteins and aberrant TGF signaling, I tried to establish model mice harboring mutant alleles of *Tgfb1* or *Tgfbr2*. However, all of chimera mice were infertile, and I could not accomplish this investigation program.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：人類遺伝学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：Transforming Growth Factor  $\beta$  1 (*TGFBI*)、TGF 受容体 2 型 (*TGFBR2*)、モデルマウス、ES 細胞、細胞外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

報告者は著明な骨膜の肥厚化を伴う常染色体優性遺伝病である Camurati-Engelmann disease (CED) の原因が transforming growth factor- $\beta$  1 の変異であること (Kinoshita et al, Nature Genetics, 2000) や、fibrillin に変異を持たない Marfan syndrome 患者の一部 (Marfan syndrome type II, MS2) が transforming growth factor- $\beta$  receptor type II (*TGFBR2*) の変異で発症することを報

告してきた (Mizuguchi et al, Nature Genetics, 2004)。TGF シグナル系は細胞増殖(抑制)、アポトーシス、発生・分化の過程に関わるシグナル系である。特に、TGF- $\beta$  1 は細胞外マトリックス (ECM) タンパク質の産生を促進することが知られている。

TGF は latent TGF- $\beta$  binding protein (LTBP) を足場にして ECM に結合する (潜在型で活性は無い)。プロテアーゼで切断された遊離 TGF も latent associated protein (LAP)

領域によって活性を抑えられており、LAP 領域の切断によりはじめて活性型となる。CED は LAP 領域の変異が原因であり、変異により容易に活性型となることも報告者らにより明らかにされた。この活性型 TGF が骨基質タンパクの産生を過剰に亢進させている可能性がある。

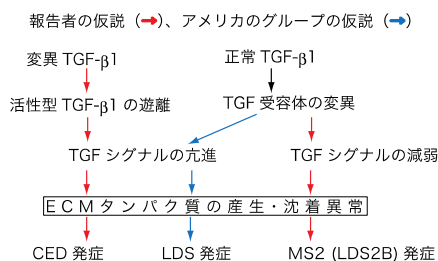
また Marfan syndrome は ECM の一種で弾性線維タンパクである Fibrillin 遺伝子の変異で発症する疾患であることは広く知られている。Fibrillin に変異を導入したマウスでは、TGF が ECM に沈着できずに遊離し、そのシグナルが過剰に亢進し発症することが明らかにされている。

報告者らは TGF receptor type II (TGFR2) の変異でも Marfan syndrome (MS2) が発症することを報告している。しかしながら、この受容体の変異はシグナルの減弱を引き起こすことから、TGF シグナルの減弱が MS2 の原因であると結論づけた。この結果は、前述の研究と相反する結果である。報告者らによる論文発表後に、TGFR2 と TGFR1 の変異で発症する症候群として、Loeys-Dietz syndrome (LDS) としてまとめられ、MS2 も LDS2B 型と再分類されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Transforming Growth Factor (以下 TGF) シグナル系の異常で起こる疾患群の発症機序の解明であり、特に細胞外マトリックス (extracellular matrix; 以下 ECM) との関係に着目して *in vivo* (モデルマウス) と *in vitro* (培養細胞) で行う。

(i) *TGFB1* と *TGFR2* の変異が TGF シグナル系を亢進させるのか、減弱させるかを明らかにすることにある。前述の通り、我々は *TGFR2* の変異がシグナルを減弱させ MS2 が発症すると報告した。一方、アメリカの研究グループは変異により、シグナルが増強し、発症すると報告している。この相反する仮説を検証することを第一の目的とする。



(ii) *TGFB1* と *TGFR2* の変異が ECM 産生に与える影響を *in vitro*, *in vivo* level で明らかにする。

本研究では、新たに作製するモデルマウスを用いて、TGF シグナルと ECM 産生の制御機

構を明らかにすることで、Marfan syndrome 患者で影響を受ける血管や結合組織の維持機構、CED で影響を受ける骨形成に新たな知見を与えると共に、ありふれた疾患 (common disease) への応用、創薬への展開を最終目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、ES 細胞における相同組換え機構を利用した gene targeting 法を用いて、(1) MS2 のモデルとして、変異 (S449F: 449 番目のセリンをフェニルアラニンに置換) TGF 受容体 II 型を発現するノックインマウスの作製、(2) CED のモデルとして、変異 (R218C: 218 番目のアルギニンがシステインに置換) を発現するノックインマウスの作製、(3) TGF-β の沈着・貯蔵の場としての ECM の産生・分解をこれらのマウスを用いて解析、特に弾性線維 (フィブリリン、エラスチン) を中心に解析をする。

また、*in vitro* level での研究として、MS2 患者と LDS 患者で同定された変異を導入した TGFR2 発現ベクターを作製後、マウス線維芽細胞 (NIH3T3) に導入し、stable cell line を作製し、ECM タンパク質の発現を定量する。

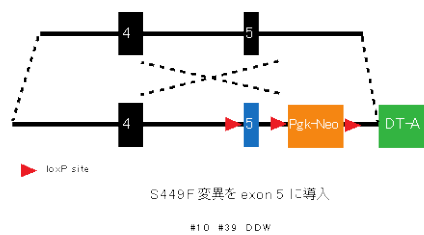
## 4. 研究成果

### (1) MS2 モデルマウスの作製

モデルマウスの作製のために、新たに targeting vector を defective prophage  $\lambda$ -Red recombineering system を用いて作製した。

ES 細胞に上記のベクターをエレクトロポレーション法で導入した後、相同組換え ES 細胞の選択を PCR で行った。相同組換え 2 クローンを得ることが出来た。

Tgfr2 S449F knock-in mouse の作製



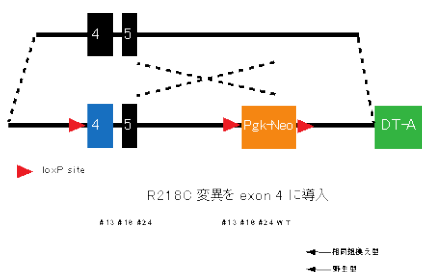
この 2 クローンを培養・ストック後にキメラマウス作製に供した。キメラマウスの作製にはアグリゲーション法を用いた。仮親から出生したマウスの中に、キメラマウスは認められなかった。

### (2) CED モデルマウスの作製

上記の MS2 マウスと同様に、新たに

targeting vector を作製し、ES 細胞に導入した。相同組換え体の選択を PCR と Southern hybridization 法で行い、3 クローンを得ることが出来た。

Tgfb1 R218C knock-in mouse の作製



このうちの2クローンをキメラマウス作製に供したが、わずか1匹のキメラマウスしか得ることが出来ず、しかもキメラ率は低かった(10-20%程度)。また、本来は♂(使用したES細胞が♂由来)が生まれてくるはずだが、このマウスは♀の表現型であった。

野生型♂と交配を続けたが、ヘテロマウスは誕生せず、生後4ヶ月程度で死亡した(腹水がたまり、腫瘍も確認できた)。

これらのモデルマウスの作製を複数回試みたが、誕生したキメラマウスは、全て不妊の表現型を示した。剖検により未熟な精巣(低形成)や精巣の形態を失い卵巣様化が確認された。ほとんど精子がなく(無精子症)、運動性の無い奇形精子がわずかに観察された。*TGFB1* および *TGFB2* に変異を導入したES細胞やそれ由来するマウス生殖細胞では妊性を失うのかもしれない。骨基質であるオステオカルシンが性ホルモンとして作用し、オステオカルシンノックアウトマウスでは、♂の生殖能が著しく低下するとの報告があった(Oury et al, Cell, 2011)。TGFシグナルはオステオカルシンの産生を抑制することも知られており、作製したキメラマウスでもTGFシグナルの亢進による過剰な産生抑制がおこっている可能性が考えられる。

### (3) 変異 *TGFB2* 安定発現細胞の作製とECM産生の解析

変異 *TGFB2* を発現するベクターを作製した。野生型 *TGFB2* cDNA をクローニングした後に、mutagenesis により変異を導入した。その後、Invitrogen 社の pcDNA3.1 (-) vector にサブクローニングし、以下の実験に用いた。

野生型および変異 *TGFB2* 発現ベクターをマウス線維芽細胞株(NIH3T3)にエレクトロポレーションし、G418による薬剤選択を行った。各発現ベクターに対して6クローンずつ

をストックした。

これらのクローンから total RNA を抽出後、定量 RT-PCR を行い、ECM タンパク質の mRNA 量を定量した。変異体と野生型の間で発現量に有為な差は認められなかった。例えば MS の原因遺伝子 *Fbn1* では、野生型と各変異体間では、TGF- $\beta$ 1 の無添加時のみ、deltaCyt (細胞質内のドメインが欠失)と R528C 変異体でのみ発現量の差が認められた。しかし、TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) 刺激下ではその発現量に有為な差は認められなかった。

定量を行った遺伝子

Transforming Growth Factor Beta Receptor type 1  
Transforming Growth Factor Beta Receptor type 2  
Transforming Growth Factor Beta Receptor type 3  
Decorin (Dcn)  
Elastin (Eln)  
Fibrillin (Fbn1)  
Fibronectin 1 (Fn1)  
Fibulin 2 (Fbn2)  
Fibulin 5 (Fbn5)  
Procollagen, type 6, alpha 1 (Col6a1)  
Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (Timp1)



## 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 14 件)

### 木下 晃

TGF シグナル異常による骨・軟骨疾患  
-単一遺伝病からありふれた疾患まで  
医学のあゆみ 234 (10): 987-992.

Ono S, Yoshiura KI, Kurotaki N, Kikuchi T, Niikawa N, Kinoshita A.

Mutation and copy number analysis in paroxysmal kinesigenic dyskinesia families. (2011)

*MovDisord*. (Epub ahead of print).

Miura K, Higashijima A, Shimada T, Miura S, Yamasaki K, Abe S, Jo O, Kinoshita A, Yoshida A, Yoshimura S, Niikawa N, Yoshiura KI, Masuzaki H. (2011)

Clinical application of fetal sex determination using cell-free fetal DNA in pregnant carriers of X-linked genetic disorders.

*J Hum Genet.* (Epub ahead of print).

Yamasaki K, Miura K, Shimada T, Miura S, Abe S, Murakami M, Sameshima T, Fujishita A, Kotera K, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. (2011)  
Epidemiology of human papillomavirus genotypes in pregnant Japanese women.  
*J Hum Genet.* (Epub ahead of print).

Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. (2010)

Identification of Pregnancy-Associated MicroRNAs in Maternal Plasma.  
*Clin Chem.* 56 (11): 1767-1771.

Miura K, Miura S, Yamasaki K, Shimada T, Kinoshita A, Niikawa N, Yoshiura K, Masuzaki H. (2010)

The possibility of microarray-based analysis using cell-free placental mRNA in maternal plasma.  
*PrenatDiagn.* 30(9): 849-861.

Oikawa M, Kuniba H, Kondoh T, Kinoshita A, Nagayasu T, Niikawa N, Yoshiura KI. (2010)

Familial brain arteriovenous malformation maps to 5p13-q14, 15q11-q13 or 18p11: Linkage analysis with clipped fingernail DNA on high-density SNP array.  
*Eur J Med Genet.* 53(5): 244-249.

Takahata T, Yamada K, Yamada Y, Ono S, Kinoshita A, Matsuzaka T, Yoshiura K, Kitaoka T. (2010)

Novel mutations in the SIL1 gene in a Japanese pedigree with the Marinesco-Sjögren syndrome.  
*J Hum Genet.* 55(3): 142-146.

Tsuda M, Yamada T, Mikoya T, Sogabe I, Nakashima M, Minakami H, Kishino T, Kinoshita A, Niikawa N, Hirano A, Yoshiura K. (2010)

A type of familial cleft of the soft palate maps to 2p24.2-p24.1 or 2p21-p12.  
*J Hum Genet.* 55(2): 124-126.

Super Science High School Consortium. (2009)

Japanese map of the earwax gene frequency: a nationwide collaborative study by Super Science High School Consortium.  
*J Hum Genet.* 54(9): 499-503.

Kuniba H, Yoshiura K, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. (2009)

Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome.  
*J Hum Genet.* 54(5): 304-309.

Miyazaki K, Mapendano CK, Fuchigami T, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura K, Niikawa N, Kishino T. (2009)  
Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse Snurf/Snrpn gene.  
*Gene.* 432 (1-2): 97-101

Nakashima M, Tsuda M, Kinoshita A, Kishino T, Kondo S, Shimokawa O, Niikawa N, Yoshiura K. (2008)

Precision of high-throughput single-nucleotide polymorphism genotyping with fingernail DNA: comparison with blood DNA. *ClinChem.* 54 (10): 1746-1748.

Kuniba H, Tsuda M, Nakashima M, Miura S, Miyake N, Kondoh T, Matsumoto T, Moriuchi H, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Naritomi K, Matsumoto N, Kinoshita A, Yoshiura KI, Niikawa N. (2008)

Lack of C20orf133 and FLRT3 mutations in 43 patients with Kabuki syndrome in Japan. *J Med Genet.* 45(7): 479-480.

[学会発表] (計 9 件)

三浦清徳 東島愛 三浦生子 山崎健太郎 阿部修平 城大空 長谷川ゆり 中山大介 木下晃 吉浦孝一郎 増崎英明  
HELLP 症候群と関連した胎盤特異的 microRNA の網羅的解析  
第 55 回日本人類遺伝学会 (2010)

引田正宣 津田雅由 佐々木健作 三嶋博之 吉田和加 夏目長門 内山健志 平野明喜 木下晃 吉浦孝一郎  
唇顎口蓋裂の Genome-wide association study  
第 55 回日本人類遺伝学会 (2010)

小野慎治 田中健之 木下晃 石田雅之 森本浩之輔 吉浦孝一郎  
SFTPC 遺伝子変異を認めた家族制肺線維証の一家系  
第 55 回日本人類遺伝学会 (2010)

城大空 三浦清徳 東島愛 三浦生子 山崎健太郎 阿部修平 増崎雅子 長谷川ゆり 木下晃 吉浦孝一郎 増崎英明  
子宮内膜癌特異的 microRNA の網羅的スクリーニング  
第 55 回日本人類遺伝学会 (2010)

阿部修平 三浦清徳 木下晃 山崎健太郎 三浦生子 嶋田貴子 吉浦孝一郎 増崎英明  
ウイルス感染防御遺伝子のコピー数多型と HPV 持続感染に関する検討  
第 55 回日本人類遺伝学会 (2010)

長谷川ゆり 三浦清徳 東島愛 城大空 阿部修平 三浦生子 増崎雅子 山崎健太郎 木下晃 吉浦孝一郎 増崎英明  
全胎状奇胎に特異的な microRNA の網羅的スクリーニング  
第 55 回日本人類遺伝学会 (2010)

東島愛 三浦清徳 三浦生子 山崎健太郎 阿部修平 城大空 長谷川ゆり 中山大介 木下晃 吉浦孝一郎 増崎英明  
母体血中における胎盤特異的 microRNA 群の網羅的スクリーニング  
第 55 回日本人類遺伝学会 (2010)

小野慎治 菊池妙子 木下晃 小澤寛樹 新川詔夫 吉浦孝一郎  
発作性運動誘発性アテトーゼ (PKC) の変異解析  
第 54 回日本人類遺伝学会 (2009)

木下晃 Brian C. Schutte 吉浦孝一郎  
ヒト疾患モデルとしての interferon regulatory factor 6 遺伝子改変マウスの表現型解析  
第 16 回日本遺伝子診療学会 (2009)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 晃 ( KINOSHITA AKIRA )

研究者番号 : 60372778

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :