

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462781

研究課題名(和文) 関節におけるTRPS1発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Transcriptional regulation of TRPS1 in articular chondrocytes

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Tricho-Rhino-Phalangeal症候群(TRPS)は先天性な遺伝性疾患であり、関節を含めた骨格系や毛髪発生にほとんどの罹患者で問題が生じる。TRPS罹患者は特徴的な顔貌と中手骨関節軟骨の異常形態がその診断のヒントとなる。今回、TRPS1発現制御の異常でもTRPS様の表現型が起こりうることからTRPS1組織発現エンハンサーの探索を行った。脊椎動物でよく保存されている転写開始部位から4kb上流配列までの配列にレポータを組み込んだトランスジェニックマウスを作成した。その結果、用いた配列内に関節軟骨の発現エンハンサーが含まれることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In order to identify the possible enhancer of TRPS1 gene, we generated a transgenic mice line those drive Cre recombinase activity under approximately 4kb proximal promoter sequence of the murine Trps1 gene (Trps1-Cre). We crossed our Trps1-Cre line with Cre reporter mice strain and detected the Cre activity from embryonic to postnatal stages. The Cre activity was observed in the organs such as central nervous system, articular chondrocytes, heart, and hair follicle. These regions are known to express Trps1 mRNAs. Cre activity detected in the cardiac region was somewhat unexpected since there were almost no reports regarding to involvement of Trps1 in cardiac development. We were able to detect Trps1 mRNA expression in the cardiac cushion.

研究分野：解剖学

キーワード：エンハンサー トランスジェニックマウス TRPS1 転写因子 遺伝性疾患 関節軟骨 変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

骨格系は重力に対抗するための力学的な支柱として作用するだけでなく、その内部での造血、臓器の保護、ミネラルの貯蔵、さらにはホルモンを産生する内分泌器官としてなど多岐にわたる役割を持つ。したがって正常な骨格形成は生体の恒常性を担保するうえできわめて重要といえる。また、骨格の成長不全では低身長を示すのみならず、個々の骨の間を走行する脈管・神経を圧迫することで機能不全を示すことがある。さらに頭頸部の骨格形態はおおよその顔貌を決めるため、骨格の形態異常はそのまゝ顔貌の異常として現れることになる。

Tricho-rhino-phalangeal 症候群 (TRPS) は先天性に骨格形態異常を示す遺伝性の疾患である。患者には特徴的な洋ナシ状の鼻や小さな顎、中手骨の関節の形態異常、毛包の発育不全などが共通にみられる。その発症頻度は低いものの、罹患者の中には著しい低身長や若年で変形性関節症を発症するなど表現型が極めて重篤な場合があり、その原因の究明が必要な疾患の一つといえる。TRPS はその原因として TRPS1 の遺伝子変異が同定されている。TRPS1 遺伝子にみられる変異は二つのパターンに分けられる。ひとつは TRPS1 の遺伝子座が完全に欠損もしくは TRPS1 遺伝子途中で終始コドンが入るタイプであり、このタイプの罹患者は特徴的な顔貌や中手骨関節の変形はみられるものの表現型はマイルドなことが多い。一方、TRPS1 翻訳産物の DNA 結合部位にアミノ酸の置換を示す変異が見られる罹患者は低身長、毛髪発生の異常、関節症状の重篤度が強い傾向が見られる。TRPS の罹患者で TRPS1 遺伝子に変異が同定されているのは、様々な統計があるが、約 8 割にとどまっている。2 割の TRPS 様の表現型を示す患者は TRPS1 遺伝子に変異が見られないことからこの中には発現制御領域に問題がある場合が含まれることが考えられた。TRPS1 遺伝子の発生中の発現は組織・部位特異的にみられるが、その発現制御機構・ゲノム上のエンハンサー配列は一切同定されていない。

2. 研究の目的

本研究計画は TRPS1 遺伝子発現の制御配列を見出し、組織特異的なエンハンサーを同定すること、さらにそのエンハンサー配列に結合するタンパク群を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画は大きくは以下の 2 点について行う

TRPS1 遺伝子転写開始部位上流配列で種を超えてよく保存されている配列を用いた

レポーターマウスの作成、ならびに

TRPS1 発現制御配列に作用する因子群の同定を試みる

TRPS1 レポーターマウスの作成

種を超えてよく保存されている TRPS1 遺伝子周囲の配列をまず相同性検出ソフトを用いてピックアップした。特によく保存されていた Trps1 転写開始部位上流の 4kb ゲノム配列をクローニングし、スプライシングドナー・アクセプター配列を含むイントロンと Cre リコンビナーゼ cDNA をその下流に組み込んだトランスジーンを作成した。マウス前核期胚に精製したトランスジーンをインジェクションしたのちに、偽妊娠マウスに胚を移植した。トランスジーンが生殖細胞系列に入ったトランスジェニックマウスを選択し、6 ラインえることができた (Trps1-Cre ライン 1~6)。すべてのラインを個別に Cre レポーターマウス系統と交配し、胎生 14 日あたりで胎仔を摘出し、ホルマウントで染色し Cre 活性の有無、またその局在を確認した。ほぼ同じ部位に染色が見られたライン 1 と 4 をその後の解析に用いた。ホルマウントでの染色液の浸透が悪くなる胎生後期のサンプルは新鮮凍結、ジェノタイピング後に切片を作成しスライドガラス上で染色を行った。

TRPS1 発現制御配列に作用する因子群の同定の試み

Trps1-Cre マウス作成のために用いた TRPS1 の転写開始部位上流配列は組織特異的発現エンハンサー配列を含むことが確認できたのちにこの配列に作用する転写因子もしくは転写共役因子の同定を試みた。Trps1 遺伝子上流 4kb を認識するガイド RNA をいくつか設計し、FLAG 標識した変異型 Cas9 (dead Cas9) とともに Trps1 遺伝子を発現する軟骨細胞株に導入し FLAG 抗体で免疫沈降により狙ったゲノムに結合している因子の沈降を目指す。また、並行して 4kb のゲノム配列にレポーターをつなげ、細胞でのレポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

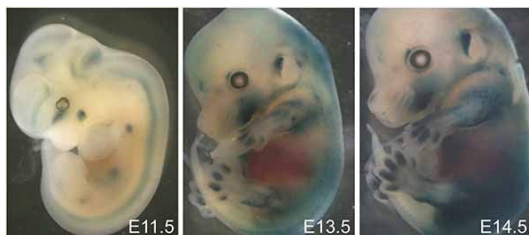
まず種を超えて保存されている Trps1 ゲノム周囲の配列の同定をゲノム VISTA ソフトウェアで行った。

その結果、転写開始部位上流配列、イントロン、3'側配列を含めた合計 4 か所に相同性の高い配列が見出された。その中で転写開始部位上流は約 4~5kb の相同配列があり最も長い保存領域であった。

我々はこの配列内に TRPS1 の発現エンハンサーが含まれるかを個体レベルで検討することにした。そのために約 4kb のゲノム断片を二つに分けてクローニングし、正しい断片であることをシーケンシングにより確認した。さらにこの 2 つの断片を合わせて約

4kbの断片を得た。この断片の下流にイントロンとCreリコンビナーゼcDNAを組み込み受精卵インジェクション用のトランスジーンとした。Creリコンビナーゼを組み込んだ理由としてはTrps1は軟骨成長板や関節軟骨に発現することが既に報告されているためその組織における発現エンハンサーを含めばすぐに新規のCre-deletorマウスの樹立が可能となるためである。

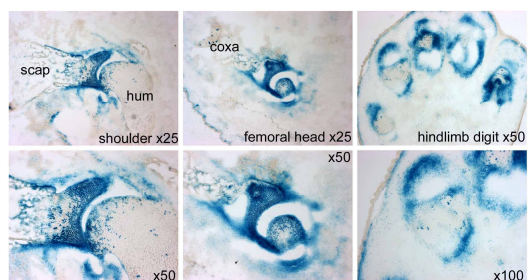
我々は6つのTrps1-Creマウスのラインを確立し、Creレポーターマウスとの交配を行った。その結果、いくつかのラインではCre活性が全く見られなかったものの、2つのラインではほぼ同一の染色が認められた(下図)。胎生11.5日齢(E11.5)では脊髄、上肢・下肢の近位部、上下顎の移行部に染色が限局し



で見られた。胎生13.5日齢(E13.5)では指骨、肘・膝の関節周囲に染色が追加して見られた。胎生14.5日齢(E14.5)では発生の開始した毛包に染色が見られ始めた。次に胎生期で最も早期に染色が見られる時期を特定するため胎生期をさかのぼって染色を行った。

ホールマウント染色において比較的限局したCre活性が見られたが、詳細に染色される細胞を同定するために組織切片における染色様式を検討した。

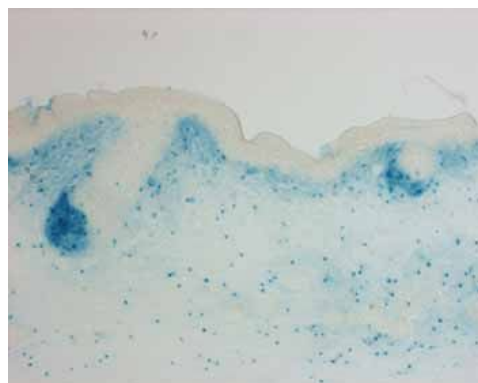
関節軟骨においてはE15.5日齢では長管骨・指骨の関節軟骨を含む細胞に強い染色が見られた(下図)。しかし、厳密に関節軟骨



だけの染色ではなく一部の静止期軟骨細胞や靭帯・滑膜にも染色が見られた。TRPS1遺伝子は関節軟骨において発現することが既に報告されているが、我々の用いたゲノムの断片内に関節軟骨の発現エンハンサーの一部を含むことが示唆された。若年性の関節疾患はTRPS罹患患者に見られる病態であり、さらに責任配列の絞り込みを行っていく予定である。今回の軟骨における染色では軟骨成長板にはほぼ染色が見られなかった。TRPS1は軟骨成長板にもその遺伝子発現が報告されており、TRPS罹患患者では軟骨成長板の形成不全によると思われる著しい低身

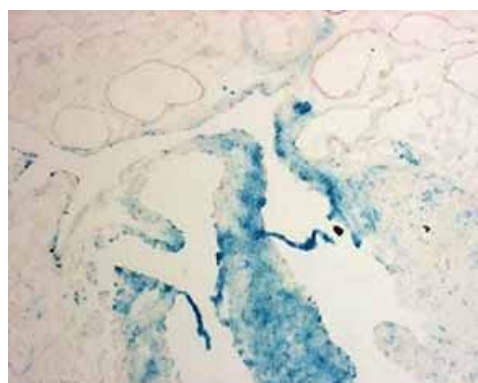
長を示す罹患患者が存在する。今後はTRPS1の軟骨成長板における発現エンハンサーの探索が病態の解明に必須となる。

毛包におけるCre活性はE14.5日齢のホールマウント染色像で認められたが、細胞レベルでの活性を検討するためにやはり切片上で染色を行った(E15.5背側上皮;下図) Cre活性は発生中の毛乳頭(間葉細胞)に認



められ、上皮には認めなかった。またこの活性はすべての毛乳頭に認められた。一方、真皮にも弱いものの活性を認めた。若年性の脱毛はTRPS罹患患者の特徴の一つであるため一部毛包エンハンサーのさらなる絞り込みを行っていく予定である。

今回のトランスジェニックマウス作成で最も意味があると思われたのが(意外ではあったが)心臓におけるCre活性の検出である。これまでTRPS1遺伝子が心臓において発現しているという報告は全くなかった。さらに



は過去のマウスを用いての報告では「心臓における発現は認めない」とまでの表記もあるところが我々は心臓の広い範囲に染色を認め、心内膜から形成される弁には特に強い染色を認めた(下図)。

そこで我々はTRPS1遺伝子の心臓における遺伝子発現を再度確認することにした。するとE13.5日齢において心内膜隆起と呼ばれる部位にきわめて限局した発現が認められた。心内膜隆起は発生が進むことで心室・心房中隔をはじめは共通のチューブとして発生する肺動脈・大動脈の中隔形成を担う領域である。最近のTRPSの表現型をまとめた論文によると、TRPS罹患患者には通常よりも高い頻

度で先天性の心臓形態異常が見られることが記述されている。また、認められる心臓形態異常はバラエティーに富んでおり心房・心室中隔欠損、左心不全、弁閉鎖不全など広範にわたる。ところが、TRPS1 遺伝子の心臓における遺伝子発現は心内膜隆起に限局して認めたのに対し、TRPS 罹患者の心臓形態異常が心臓全体に近い形で見られるという報告に一見矛盾していると思われた。Trps1-Cre マウスに見られた心臓の広範な Cre 活性は実は TRPS1 の遺伝子を発現した細胞が発生の過程で遊走した娘細胞である可能性が考えられた。つまり今回の解析で TRPS1 の遺伝子発現は極めて限局しているが、その娘細胞は広範囲の心臓形成に寄与していることを示唆していると考えられた。

我々は組織特異的な TRPS1 発現エンハンサーを含む断片を用いて発現に寄与する部位の同定を試みた。いくつかの欠失断片を作成してルシフェラーゼレポーター-cDNA とつなぎ合わせたベクターを作成した。その欠失断片を含むベクターを培養細胞株中にトランスフェクションし、転写活性を測定した。その結果、転写開始部位 700bp を含む断片においてほぼ 100%があることが分かった。この配列内には 200bp ほどの CG の連続する配列が認められた。しかしあくまでこの結果はピットロでの検証であるので、今後は個体レベルでの検証が必要と考えられる。

続いて我々は 4kb のゲノム断片に結合する因子の同定を試みた。このために 4kb の断片中に約 1kb の間隔で 3 つのガイド RNA を設計し、これをガイド RNA 発現ベクターに組み込んだ。これを dCas9 を発現するベクターとともに軟骨細胞株内に導入した。導入効率を上げるためにエレクトロポレーション法を用いた。目的とするゲノムの断片を沈降させてくることができるとは検証したが、確固たる証拠を得るに至らず、この検証は今後継続して行っていく予定である。おそらくはガイド RNA の標的へのターゲティング効率が悪いことが原因の一つと思われるため、ターゲティング効率を検証するベクターを用いることで最良のガイド RNA を選択、使用する。

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 2 件)

Nomir A.G., Takeuchi Y., Fujikawa J., Elsharaby A.A., Wakisaka S., Abe M. Fate mapping of Trps1 daughter cells during cardiac development using novel Trps1-Cre mice. *Genesis* 54(7); 79-388;

2016. (査読あり)

Fujikawa J., Tanaka M., Itoh S., Fukushi T., Kurisu K., Takeuchi Y., Morisaki I., Wakisaka S., Abe M. Kruppel-like factor 4 expression in osteoblasts represses osteoblast-dependent osteoclast formation. *Cell Tissue Res.* 358(1); 177-87; 2014. (査読有)

{ 学会発表 } (計 21 件)

阿部真土、アーメドノミル、鬼頭昭吉、竹内優斗 : Tricho-rhino-phalangeal 症候群の原因遺伝子 TRPS1 の発現エンハンサー解析 平成 28 年度先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 琵琶湖ホテル (滋賀) 平成 29 年 2 月 6 日-7 日

Inui-Yamamoto C., Inui T., Honma S., Abe M., Wakisaka S. The formation of mandibular condyle in rats fed with unpalatable chow. *Oral Neuroscience* 2016 Oct. 1st Osaka Univ. Graduate School of Dentistry (大阪)

藤川順司、アーメドノミル、竹内優斗、鬼頭昭吉、阿部真土、脇坂 聡 : Klf4 遺伝子欠損マウスは頭部、四肢の骨格発生異常を示す 第 58 回歯科基礎医学会学術集会 札幌コンベンションセンター (札幌) 平成 28 年 8 月 24 日-26 日

Nomir A., Takeuchi Y., Fujikawa J., Abe M., Wakisaka S. A novel transgenic mice explains pleiotropic congenital cardiac defects of TRPS patients. 第 58 回歯科基礎医学会学術集会 札幌コンベンションセンター (札幌) 平成 28 年 8 月 24 日-26 日

Abe M. Many faces of KLF4 during

skeletal development. Seoul National University (ソウル、韓国) 平成 28 年 7 月 27 日 (招待講演)

竹内優斗、藤川順司、アーメドノミル、鬼頭昭吉、阿部真土、脇坂聡：骨格パターンニングに異常を示す新規変異マウスの原因遺伝子座の探索 第 122 回大阪大学歯学会例会 大阪大学弓倉記念ホール (大阪) 平成 28 年 7 月 14 日

Nomir A., Takeuchi Y., Fujikawa J., Abe M., Wakisaka S. Understanding the cause of pleiotropic congenital cardiac defects in patients with TRPS. 第 122 回大阪大学歯学会例会 大阪大学弓倉記念ホール (大阪) 平成 28 年 7 月 14 日

中村恵理子、波多賢二、吉田倫子、村上智彦、高畑佳史、阿部真土、米田俊之、西村理行：転写因子 Zfhx4 は Osterix と結合して内軟骨骨形成の後期過程を制御する 第 33 回日本骨代謝学会 新宿京王プラザホテル (東京) 平成 27 年 7 月 23 日 - 25 日

Nakamura E., Hata K., Yoshida M., Murakami T., Takahata Y., Abe M., Wakisaka S., Yoneda T., Nishimura R. A transcription factor Zfhx4 functions as a transcriptional platform for Osterix during endochondral ossification. 2015 ASBMR Annual Meeting (Seattle, Washington アメリカ) Oct 9-12

竹内優斗、阿部真土、脇坂聡、山城隆：KLF4 は骨芽細胞の接着結合を制御する 第 74 回日本矯正学会大会 福岡国際会議場・マリメッセ (福岡) 平成 27 年 11 月 18 日 - 20 日

Nomir A.G., Takeuchi Y., Fujikawa j.,

Abe M. Fate of Trps1-daughter cells during the cardiac development. 第 38 回 日本分子生物学会年会 平成 27 年 12 月 1 日 - 4 日神戸ポートアイランド(神戸)

Nomir A.G., Abe M., Takeuchi Y., Fujikawa J., Wakisaka S. Fate of TRPS1-daughter cells during joint and cardiac development. International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases 2015 年 12 月 10 日 (大阪大学 弓倉記念ホール)(大阪)

Takeuchi Y., Fujikawa J., Nomir A.G., Abe M. KLF4 regulates cell-cell adhesion in osteoblasts. International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases 2015 年 12 月 10 日 (大阪大学 弓倉記念ホール)(大阪)

Fujikawa J., Nomir A.G., Takeuchi Y., Abe M. Novel mutant mice exhibiting craniofacial and axial skeletal defects. International symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases 2015 年 12 月 10 日 (大阪大学 弓倉記念ホール)(大阪)

Nakamura E., Hata K., Yoshida M., Murakami T., Takahata Y., Abe M., Wakisaka S., Yoneda T., Nishimura R. A novel transcription factor Zfhx4 is critical for chondrogenesis and craniofacial development. International symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases 2015 年 12 月 10 日 (大阪大学 弓倉記念ホール)(大阪)

場（福岡） 平成 26 年 9 月 25 日 - 27 日

Abe M. Pleiotropic roles played by KLF4 during skeletal development. International symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases 12 月 10 日（大阪大学 弓倉記念ホール）（大阪）

Abe M. : Cell-autonomous and non-cell-autonomous roles played by the transcription factor KLF4 in skeletogenesis. Joint Symposium of Osaka University Graduate School of Dentistry and Yonsei University College of Dentistry;（ソウル、韓国）March 21, 2014.（招待講演）

藤川順司、竹内優斗、栗栖浩二郎、阿部真土 : KLF4 は軟骨細胞でのプロテアーゼの発現を制御する 第 32 回日本骨代謝学会 学術集会 大阪国際会議場（大阪）平成 26 年 7 月 24 日 - 26 日

竹内優斗、藤川順司、栗栖浩二郎、阿部真土 : 転写抑制因子 Trps1 の関節軟骨発現制御エンハンサーの探索 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 大阪国際会議場（大阪）平成 26 年 7 月 24 日 - 26 日

藤川順司、阿部真土、竹内優斗、脇坂聡 : 骨芽細胞における KLF4 の発現は破骨細胞成熟を抑制する 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡国際会議場（福岡）平成 26 年 9 月 25 日 - 27 日

竹内優斗、阿部真土、藤川順司、脇坂聡、山城隆 : 転写抑制因子 Trps1 の関節軟骨発現制御エンハンサーの探索 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡国際会議

〔図書〕(計 0 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

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~oa1/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 真土 (ABE, Makoto)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号 : 40448105

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()