

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592698

研究課題名(和文)哺乳類顎関節形成メカニズムの解析

研究課題名(英文)Role of Trps1 in temporomandibular development

研究代表者

阿部 真土 (Abe, Makoto)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40448105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Trichorhinophalangeal症候群(TRPS)の患者において特徴的な顔貌が見られる要因を見出すことを目的とし、TRPSの約8割で変異が見られる転写因子であるTrps1の遺伝子欠損マウスの頭頸部発生様式を詳細に解析した。Trps1遺伝子欠損マウスはすべてのホモ個体で特に下顎、鼻尖部の矮小化が認められ、下顎においては近位部骨格の低形成を認めた。顎関節を構成する下顎頭の関節軟骨は細胞増殖の低下により重篤な発生障害を示した。また、顎関節の発生も認めず、顎の円滑な運動に必須の関節円板、関節腔の形成が見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Patients of Trichorhinophalangeal syndrome (TRPS) exhibit characteristic facial appearance which includes pear-shape nose and micrognathia (small jaw). In most of the case, TRPS results from mutation in the gene, TRPS1. In order to understand the mechanisms of the appearance of the facial phenotype in the TRPS patients, we examined the craniofacial development of the Trps1 knockout mice. The knockout mice were examined during its embryonic stage since this KO pups die soon after its birth. Trps1 was expressed throughout the embryonic stages of temporomandibular development. KO mice showed defects in mandibular bone development, especially in its proximal region. Articular disc, upper and lower joint cavities were never formed in the mutants. Also, the cellular proliferation at the condylar cartilage was significantly decreased.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：顎関節 発生 転写因子 TRPS1 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

頭頸部に異常が見られる先天奇形は脳の異常を含めるときわめて多く、頭頸部骨格の異常に限っても約200出生にひとりと高い確率で見られる。奇形発症の正確な診断・予防・治療にはまず原因の同定、その異常が起こるメカニズムの解明が重要であるといえる。頭頸部に発生異常を示す疾患の原因となる遺伝子変異が同定されているものは多い。たとえば、Apert 症候群や Crouzon 症候群は頭蓋骨の縫合部の異常な早期癒合が見られるが、FGFR2 の変異がその原因であることが報告されている。これらの疾患は父親が高齢になるに従い症例が増えることが知られており (paternal age effect)、その原因が FGFR2 変異に伴う下流シグナルの活性化による変異を持つ精子幹細胞の clonal expansion によるものであることが示唆されている。Trichorhinophalangeal 症候群 (TRPS) は毛髪、鼻、指骨に特徴的な異常を示す疾患である。その発症頻度は低いものの、時に著しい低身長、小顎や若年で変形性関節症を発症するなど表現型が重篤な場合もある。TRPS の患者の約 8 割に転写因子である TRPS1 の遺伝子変異が見られる。報告されている変異にはいわゆる変異のホットスポットがあり、各々の変異部位と表現型の強弱との間に相関があることが予想されている。TRPS1 は分子内中ほどに位置する GATA タイプのジンクフィンガーモチーフを介してゲノム DNA に結合し、またその C 末端に存在する Ikaros タイプのジンクフィンガーモチーフにより転写の強力な抑制因子として作用することが主にビトロの解析から示唆されている。しかし Trps1 遺伝子欠損マウスにおける遺伝子発現の変化から必ずしも転写抑制因子としてのみ作用するのではなく、逆に転写を活性化する場合もあることが示唆されている。また、核内のみで作用するのではなく細胞質でも何らかの作用を持つ可能性も報告されている。

2. 研究の目的

TRPS 患者の頭頸部において見出される異常の起こるメカニズムを詳細に解析する。また、ヒト TRPS において見られる変異のホットスポットの違いによる作用の違いを解析する。さらに TRPS1 遺伝子の発現制御エンハンサー配列の同定を試みる。

3. 研究の方法

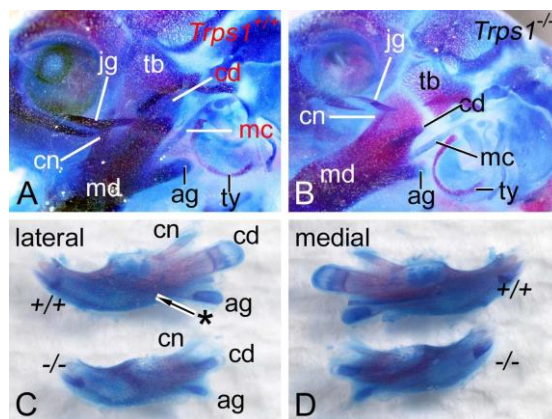
① TRPS 患者の頭頸部に現れる形態異常の要因を見出すために、ヒト TRPS のモデルとなる Trps1 遺伝子欠損マウスの発生異常を詳細に解析する。

- ② マウス Trps1 遺伝子においてヒト TRPS に見られる変異に相同な塩基に変異を導入し、その結果得られる個々の Trps1 変異タンパクの核移行を培養細胞を用いた免疫染色、転写への影響をレポーターアッセイで解析する。
- ③ マウスとヒト TRPS1 遺伝子で相同性の高い領域をウェブ上のツールで見出し、TRPS1 遺伝子発現制御領域の検出をマウス個体レベルで目指す。

4. 研究成果

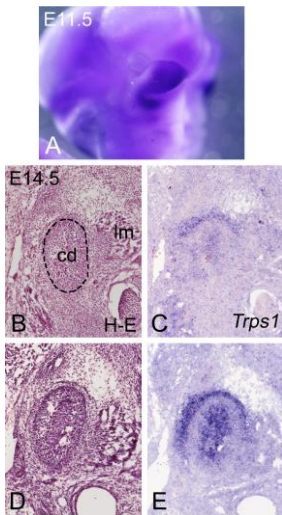
① Trps1 遺伝子欠損マウスの表現型解析

Trps1 遺伝子ノックアウトホモマウスは生後すぐに致死をきたす為、表現型解析は胎生期マウス胎仔を用いて行った。まず胎生 18.5 日齢マウスを骨格染色 (骨をアリザリンレッドで赤色に、軟骨をアルシアンブルーにより青色に染色) し、コ



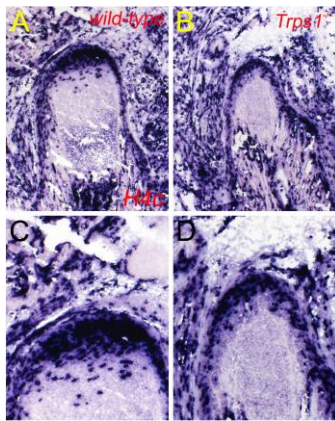
ントロール (+/+, +/-) とホモマウスの頭頸部の形態を詳細に比較した。

その結果、顎関節部の骨格形態が著しく低形成であることが見出された (上図 A はコントロールマウスの骨格側面観、B は Trps1 ホモ変異マウスの側面観を示す。ag, angular; cd, condyle; cn, coronoid; jg, jugal; mc, Meckel's cartilage; tb, temporal bone)。さらに詳細に下顎の形態を観察すると、ホモ変異マウスでは歯胚を含む遠位部の形態はコントロールと同等であるが、下顎頭を含む近位部の発達が特に阻害されていることが分かった (下図 C はコントロール、ホモ変異マウス下顎の外側面観、図 D は内側面観をそれぞれ示す)。また、外側面観でコントロールでは顕著に発達している咬筋粗面 (咬筋付着部) が変異マウスでは不明瞭であることもわかった (図 C\*)。このことは胎仔性の顎運動が貧弱であることを間接的に示しているものと考えられた。



次に顎関節発生過程における *Trps1* の発現を調べたところ、顎関節原基が辛うじて見られ始める時期から *Trps1* 遺伝子の発現が認められた (左上図は胎生 11.5 日齢 (A)、胎生 14.5 日齢 (B,C)、胎生 15.5 日齢 (D,E) の冠状断切片を用いた *Trps1* 遺伝子発現解析を示す。cd, condyle; lm, lateral pterygoid muscle)。

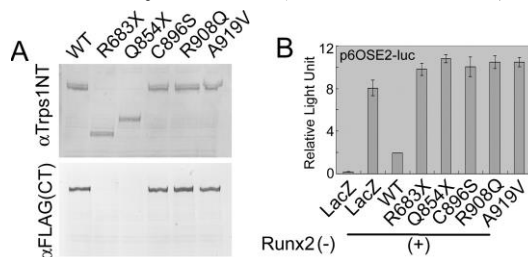
*Trps1* の下顎頭軟骨の増殖への作用を調べたところ、コントロールマウスに比べ、ホモ変異マウスの増殖活性の低下が認め



られた。このことは *Trps1* ホモ変異マウスの下顎形成不全の一因が下顎頭軟骨増殖活性の低下であることが示唆された (左中図はコントロール (A,C) および *Trps1* ホモ変異マウス (B,D) の下顎頭前頭断切片の細胞増殖を検出したもの。C,D は A,B の強拡大像)。

### ② 異なる変異 *Trps1* の作用の違いの検出

TRPS を示す患者の約 8 割に TRPS1 CDS にアミノ酸の変異、もしくはアミノ酸から終始コドンへのナンセンス変異が認められる。これらの変異により TRPS1 の転写作用へ影響が出ることが考えられる。ところが TRPS の表現型の重篤度と TRPS1 に認める変異の種類に相関があることは予想されているものの実証されていない。そこでまずヒト TRPS1 遺伝



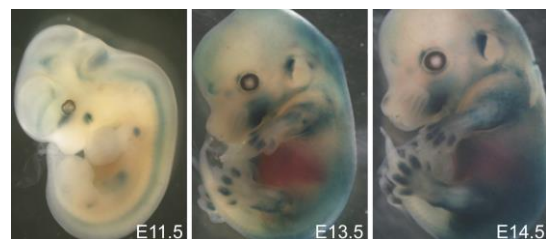
子に既に報告されている変異と相同のアミノ酸をマウス *Trps1* 遺伝子に導入した。5 種類の FLAG 標識した変異 *Trps1* 発現

コンストラクトを作製し野生型 *Trps1* とともにタンパクレベルでの発現をウエスタンブロットにて確認した (左下図 A)。*Trps1* は骨芽細胞分化に必須の因子である *Runx2* の転写活性を強く抑制することが以前報告されている。そこで野生型 *Trps1* タンパクと 5 つの変異 *Trps1* タンパクの *Runx2* の転写活性阻害作用を比較した (左下図 B)。その結果 *Runx2* により誘導された転写が野生型 *Trps1* との共発現で抑制され、変異 *Trps1* ではいずれも抑制は見られなかった。個々の変異 *Trps1* で抑制作用の違いがあることが期待されたが残念ながら見られなかった。

### ③ *Trps1* 遺伝子発現制御領域の同定

TRPS の患者の約 8 割に TRPS1 遺伝子の CDS 中に変異の存在が報告されているが、TRPS 様の表現型を示すにもかかわらず TRPS に変異が見出されない患者がいる。この患者では *Trps1* の上流もしくは下流に位置する因子の変異が原因となっている可能性がある。そこで TRPS1 遺伝子の発現制御をつかさどる因子群の同定を最終的な目標として、マウス *Trps1* 遺伝子転写開始部位上流領域のマウス個体における活性を調べた。

マウス *Trps1* 遺伝子転写開始部位から上流約 4kb のゲノム断片をクローニングしその下流に Cre リコンビナーゼ cDNA をつないだ (4.0*Trps1*-Cre)。このコンストラクトをマウス受精卵に顕微注入にトランスジェニックマウスの作成を試みた。4.0*Trps1*-Cre 遺伝子を持つ雄 F0 マウスを 7 匹獲得しその遺伝子は子孫へ遺伝していることが確認できた。すべての 4.0*Trps1*-Cre マウスのラインと Cre レポーターマウス (*Rosa26-lacZ* マウス) の雌雄を交配し、その仔をジェノタイプング後ホール、もしくは切片上での Cre 活性の検出に用いた。すべてのラインで軟骨、関節、靭帯、腎臓、心臓、毛包などに Cre 活性が見出された (右下図は



4.0*Trps1*-Cre<sup>+/+</sup>;*R26R*<sup>+/+</sup>胎生 11.5 日、13.5 日、14.5 日齢マウスのホール X-gal 染色像を示す。青色が認められる部位が Cre 活性を持つ、もしくは持っていた細胞の分布する部位である)。この結果は Cre リコンビナーゼ発現に用いた 4.0*Trps1* のゲノム配列に最少プロモーター配列とともに組織特異的なエンハン

サー配列も含まれていることを示唆している。

#### 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 4 件)

- ① Yoshioka S, Takahashi Y, Abe M, Michikami I, Imazato S, Wakisaka S, Hayashi M, Ebisu S. Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and tissue inhibitor of metalloprotease 1 during tertiary dentinogenesis. *J Biochem* 153(1); 43-50; 2013
- ② Michikami I, Fukushi T, Tanaka M, Egusa H, Maeda Y, Ooshima T, Wakisaka S, Abe M. Kruppel-like factor 4 regulates membranous and endochondral ossification. *Exp Cell Res* 318(4);311-25; 2012
- ③ Michikami I, Fukushi T, Honma S, Yoshioka S, Itoh S, Muragaki Y, Kurisu K, Ooshima T, Wakisaka S, Abe M. Trps1 is necessary for normal temporomandibular joint development. *Cell Tissue Res* 348;131-140; 2012
- ④ Abe S, Namba N, Abe M, Fujiwara M, Aikawa T, Kogo M, Ozono K. Monocarboxylate Transporter 10 Functions as a Thyroid Hormone Transporter in Chondrocytes. *Endocrinology* 153(8);4049-58; 2012

[学会発表] (計 9 件)

- ① M Abe : 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; March 21, 2014.  
(招待講演)

- ② 藤川順司、田中真理子、森崎市治郎、阿部真土、脇坂聡：転写因子 Klf4 の骨格発生における役割解析 第 59 回大阪大学歯学会総会 弓倉記念ホール (大阪大学歯学部) 平成 25 年 1 月 10 日
- ③ 藤川順司、阿部真土、三浦治郎、脇坂聡：Klf4 は軟骨細胞でのプロテアーゼの発現を制御する 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 岡山コンベンションセンター(岡山)2013 年 9 月 20 日-22 日(発表日：9 月 22 日)
- ④ 藤川順司、田中真理子、福士暁也、栗栖浩二郎、阿部真土：Runx2 は KLF4 による骨芽細胞分化抑制をレスキューする 第 36 回日本分子生物学会年会 神戸ポートアイランド (神戸) 2013 年 12 月 3 日-6 日 (発表日：12 月 3 日)
- ⑤ 福士暁也、藤川順司、田中真理子、栗栖浩二郎、阿部真土：Klf4 は軟骨細胞分化を制御する 第 35 回 日本分子生物学会年会 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (福岡) 2012 年 12 月 11 日-14 日
- ⑥ 藤川順司、田中真理子、福士暁也、栗栖浩二郎、阿部真土：Klf4 は骨芽細胞間、ならびに細胞外基質との正常な接着を制御する 第 35 回 日本分子生物学会年会 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (福岡) 2012 年 12 月 11 日-14 日
- ⑦ 田中真理子、藤川順次、伊藤祥作、阿部



真土「骨芽細胞での Klf4 の過剰発現は細胞外基質の発現を低下させ破骨細胞の分化を制御する」第 30 回日本骨代謝学会学術集会（京王プラザホテル、東京）2012 年 7 月 19 日－21 日

⑧ 難波範行、阿部真土、阿部早苗、藤原誠、相川友直、古郷幹彦、大藪恵一「成長板における甲状腺ホルモントランスポーター MCT8、MCT10 の発現」2012 年 9 月 27 日－29 日 第 46 回小児内分泌学会学術集会（大阪国際会議場、大阪）

⑨ Noriyuki Namba, Makoto Abe, Sanae Abe, Makoto Fujiwara, Tomonao Aikawa, Mikihiro Kogo, Keiichi Ozono. The thyroid hormone transporters Monocarboxylate Transporters 8 and 10 (MCT8, MCT10) are expressed reciprocally in growth plate chondrocytes. ASBMR 2012 Annual Meeting Oct 12-15 (Minneapolis Convention Center) Minneapolis, Minnesota

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 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 0 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

阿部 真土 (ABE, Makoto)  
大阪大学・歯学研究科・助教  
研究者番号：40448105

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

伊藤 俊治 (ITO, Syunji)  
和歌山県立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号：50275351