



Title	Trps1のハイポモルフマウスの表現型解析
Author(s)	佐伯, 直哉
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/91876">https://doi.org/10.18910/91876</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 佐伯直哉 )	
論文題名	Trps1のハイポモルフマウスの表現型解析
論文内容の要旨	
<p><b>【緒言】</b></p> <p>TRPS1は骨格系や毛包などの組織に特異的に発現する転写因子である。TRPS1遺伝子の変異や欠失は先天性骨系統疾患である毛髪鼻指骨節症候群 (Tricho-rhino-phalangeal syndrome: TRPS) の原因となり、患者は特徴的な顔貌や骨格形態の異常、生後顕著となる成長障害、若年での関節疾患発症など広汎な異常を示す。Trps1<sup>-</sup> KOマウスを用いてこれまで詳細な病態解析が行われてきたが、出生直後に100%致死となることから、TRPS患者で認められる生後の成長障害や若年での関節疾患等の発症機序の解明は困難であった。今回Trps1遺伝子の発現制御領域を同定し、そのゲノム領域を欠失させることで新規Trps1低発現型マウスを作出した。作出したマウスが生後のTRPSの再現モデルとなりうるか検討することを本研究の目的とした。</p> <p><b>【方法と結果】</b></p> <p>1. <u>Trps1転写開始部位上流配列のマウス個体レベルでの寄与の検討</u></p> <p>Trps1遺伝子の転写開始部位上流にTrps1遺伝子発現に寄与しうる配列を含むことを当研究室からすでに報告している (Nomir et al. Genesis 2016)。そこで、最小プロモーターを残し、転写開始部位より上流約700~4700bpの約4kbを欠失させたマウスを作出した (Trps1<sup>ΔEnh1/ΔEnh1</sup>)。さらに、片側のアリのTrps1遺伝子を欠失させたマウス (Trps1<sup>ΔEnh1/-</sup>) も交配により作出し、表現型解析を行った。その結果、両系統ともに成獣まで生存し、体重変化に異常はなかった。Trps1<sup>ΔEnh1/-</sup>でのみ股関節の大腰筋溝 (Psoas valley) に軽度の形態異常を認めた。</p> <p>2. <u>ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing) およびヒストン修飾ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation sequencing) によるエンハンサー候補領域の検討</u></p> <p>Trps1遺伝子周囲のオープンクロマチン領域と転写活性化されている領域にみられるヒストン修飾を手掛かりとしたエピゲノム解析をマウスより採取した肋軟骨細胞で行った。その結果、Trps1遺伝子座の第1イントロン内でATAC-seq、ChIP-seq (H3K4me2、H3K27ac) でピークが重なる領域を2か所 (Enh2、Enh3) 見出した。</p> <p>3. <u>エンハンサー候補配列のインビトロでの転写活性制御能の検討</u></p> <p>Trps1遺伝子発現の制御候補配列 (Enh2、Enh3) をルシフェラーゼレポーターベクターにクローニングした。マウス肋軟骨や膝関節から採取した初代軟骨細胞、マウス頭蓋冠より調整した骨芽細胞、軟骨細胞株 (ATDC5)、ヒト胎児腎細胞株 (HEK293) にレポーターベクターを遺伝子導入し転写活性を測定した。その結果、特にEnh2は当配列を持たないベクターと比較して転写活性が有意に上昇した。</p> <p>4. <u>エンハンサー候補領域を個々に欠失させたマウスの作出、表現型解析</u></p> <p>Enh2、Enh3を個々に欠失させたマウス (Trps1<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>、Trps1<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>) をゲノム編集により作出した。期待する欠失はPCRによる遺伝子判定で行った。どの系統も成獣まで生存したが、片側のアリのTrps1遺伝子を欠失させたマウス (Trps1<sup>ΔEnh2/-</sup>、Trps1<sup>ΔEnh3/-</sup>) でTrps1<sup>ΔEnh1/-</sup>と同様の股関節のPsoas valleyに形態異常を認めた。</p> <p>5. <u>エンハンサー候補領域2か所を同時に欠失させたマウスの作出、表現型解析</u></p> <p>Enh2、Enh3を含む約20kbを欠失させたマウスをゲノム編集により作出した。期待する欠失はPCRを用いて判定し、さらにプライミングなどに異常がないことをRT-PCRにより確認した。個々の臓器・組織を採取し、遺伝子発現レベルの比較をリアルタイムPCR法で行った。その結果、Trps1<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>マウスでのTrps1の発現量は寛骨等で</p>	

低下していた。このマウスは成獣まで生存し交配も可能であったが、成獣まで野生型マウスよりも体重増加が有意に少なかった。また、股関節のPsoas valleyに重篤な形態異常を認めた。組織学的解析より、生後4週で腸恥隆起相当部位の石灰化が遅延していた。片側アリのTrps1遺伝子を欠失させたマウス (Trps1<sup>ΔEnh2/3/-</sup>) では、成獣以前に死亡するマウスが激増した。生存した個体も顕著な成長不全を認め、さらに重篤な股関節の形態異常を認めた。組織学的に一部の成獣で腸恥隆起相当部位が骨化せずに軟骨細胞の残存を認めた。膝関節でも顕著な形態異常を認め、組織切片では成獣期以降でも大腿骨の二次骨化中心相当部位に軟骨細胞が残存していた。この系統では全成獣マウスで膝蓋骨の内側偏位を認めた。

#### 6. 培養軟骨細胞増殖アッセイ

骨格の違いが軟骨細胞の増殖能に寄与するかを野生型、Trps1<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>、Trps1<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>、Trps1<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>の膝軟骨より軟骨細胞を調整し、培養下での細胞増殖アッセイを行ったところ、培養6日目ではTrps1<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>、Trps1<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>と野生型、9日目でTrps1<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>、Trps1<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>、Trps1<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>と野生型の間で有意に増殖能の低下を見認めた。

#### 【結論】

2つのTrps1エンハンサー候補領域を同時に欠失させたTrps1<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>マウスは出生後の体重変化に有意な差を認め、股関節形態異常を再現よく認めた。Trps1<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>マウスより調整した培養軟骨細胞は増殖能の低下も認められ成長板の発育に影響を与えていることが示唆された。一方、体重増加など個体レベルで成長に変化がみられなかったTrps1<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>とTrps1<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>マウスから調整した軟骨細胞でも培養下で増殖活性の低下が観察されたことから、Trps1発現レベルの低下を補完する仕組みが生体内で作動していることが示唆された。Trps1遺伝子を片アリの欠失させTrps1遺伝子発現をさらに低下させたTrps1<sup>ΔEnh2/3/-</sup>マウスは、より重篤な股関節形態異常と膝蓋骨の内側偏位、二次骨化中心形成の大幅な遅延を認めた。今回見出した候補ゲノム領域はマウス個体レベルでも機能していることが確認され、さらにTrps1遺伝子の発現がおそらく複数のゲノム領域で制御されることで、頑強な遺伝子発現維持を可能にしているものと考えられた。作出した系統の中でTrps1<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>マウスは効率よく生まれ、1年以上生存可能であった。この系統では股関節の形態異常など生後のTRPS病態の一部の再現を確認できた。Trps1<sup>ΔEnh2/3/-</sup>マウスの成獣個体の獲得効率は悪いが、膝蓋骨の偏位等はTRPS患者でみられる病態であり、今回作出したマウス系統が生後に顕著となるTRPS病態解析のための疾患モデルマウスとして有効であると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 佐 伯 直 哉 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 大 庭 伸 介 副 査 教授 豊 澤 悟 副 査 教授 阪 井 丘 芳 副 査 准教授 波 多 賢 二
<b>論文審査の結果の要旨</b>	
<p>本研究は、先天性骨系統疾患である毛髪鼻指節骨症候群（Tricho-rhino-phalangeal syndrome: TRPS）の原因遺伝子 <i>Trps1</i> の発現制御領域のゲノム領域を欠失させることで <i>Trps1</i> 低発現型マウスを新規に作出し、その表現型を解析することで TRPS のモデルマウスとなりうるかを検討したものである。</p> <p><i>Trps1</i> 遺伝子の発現制御領域の候補（Enh1、Enh2、Enh3）を取得し、ゲノム編集により当該発現制御領域を欠失させたマウス、および発現制御領域に加えて片側のアレルで <i>Trps1</i> 遺伝子を欠失させたマウスを作出した。その結果、Enh2 と Enh3 共に両アレルで欠失させたマウス、および Enh2 と Enh3 の欠失に加えて片側のアレルで <i>Trps1</i> 遺伝子を欠失させたマウスでは、TRPS 患者の生後の骨格系の異常を部分的に再現することが明らかとなった。したがって、これらのマウス系統は TRPS のモデルマウスとして妥当であることが示唆された。</p> <p>以上の知見は、毛髪鼻指節骨症候群の病態と TRPS1 の骨格組織における機能の理解に貢献するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。</p>	