



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

学位論文

Trps1 のハイポモルフマウスの表現型解析

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

療護歯科保健学講座

(障害者歯科治療部)

佐伯 直哉

## I. 緒言

毛髪鼻指節骨症候群 (Tricho-rhino-phalangeal syndrome: TRPS) は転写因子 *TRPS1* 遺伝子の変異や欠失により引き起こされる常染色体優性遺伝性疾患であり、2019 年の骨系統疾患の国際分類では遠位肢異形成症のグループに分類されている[1、2]。TRPS は重篤な症状を呈する希少疾患であり、患者は先天的に細く疎な毛髪 (約 90%)、鼻翼低形成 (約 90%)、短指趾症 (約 60%)、指の円錐骨端 (約 100%) のほか、心臓や腎臓などの奇形を認めることがある (約 10%) [3、4]。さらに出生後には、低身長 (約 50%)、若年からの変形性関節症発症 (約 40%)、膝蓋骨の脱臼といった骨格系の病態も顕著となる [3、4、5]。これまでに、骨格系にみられる異常について、*Trps1* 遺伝子を欠失あるいは機能を喪失させた *Trps1* ノックアウト (*Trps1*-KO) マウスや *Trps1* の DNA 結合モチーフである GATA ジンクフィンガー配列を欠失させた *Trps1*ΔGATA マウスを用いて詳細に検討されてきた[6、7]。これらの知見より、*Trps1* は、インディアンヘッジホッグ (Indian hedgehog: Ihh) と副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone-related peptide: PTHrP) が形成するネガティブフィードバックループと相互作用して軟骨細胞の肥大化を制御し、またヘッジホッグシグナル下流の転写因子である Gli3 とともに肥大化時に *Wnt5a* の発現を上昇させるなど[6、8-12]、正常な成長板軟骨の維持に必須の役割を持つことが示されてきた [8] (Fig. 1A)。さらに *Trps1*-KO マウスでは、成長板の成熟と骨膜領域の骨化の調和が崩れ、骨膜の骨化が早期に引き起こされることも報告されており、成長板における異常を介してその周囲の組織の分化にも影響

を及ぼしていることも報告されている[13]。このように *Trps1-KO* マウスは TRPS の病態発症機序の解明に大きく貢献してきたことに間違いはない。しかしながら *Trps1-KO* マウスも *Trps1*ΔGATA マウスも生後すぐに呼吸不全により死亡するため[8]、前述の骨格系の異常を含む生後の TRPS 病態の解析の研究が困難であった。

哺乳類の骨組織は、胚発生時に 2 つの異なる過程を経て形成される。膜内骨化は間葉系細胞の凝集から直接骨芽細胞の分化が起こり、骨が形成される。一方で、哺乳類における主要な骨形成過程である軟骨内骨化では、凝集した未分化間葉系細胞に由来する軟骨細胞によって最初に軟骨が形成され、この軟骨の鋳型が骨組織に置換される[14]。軟骨内骨化を経て形成される長管骨の発生に関する報告は多いのに対して、中軸骨格と四肢骨を連結する肩甲骨や寛骨の発生様式に関する知見は圧倒的に少ない。TRPS では長管骨の形態異常のみならず、特に下肢帯領域にも形態異常が頻発することが知られている[3]。

股関節は腸骨、恥骨、座骨の 3 つの骨から構成されており、体重を下肢に伝える運動機能や腹部臓器の支持機能など重要な機能を果たしている[15]。3 つの骨は寛骨臼を中心に融合し、寛骨は後肢の大腿骨頭と関節を形成して四肢を体幹に固定する[16、17]。それぞれの骨は体幹部の沿軸中胚葉から発生した間葉系細胞の凝集から始まる軟骨内骨化によって形成される[18-25]。骨盤の軟骨形成は、将来の寛骨臼近傍から始まり座骨、恥骨と続き、3 つの骨の中心は寛骨臼で融合するように拡大し[22、26]、ヒトの場合、最終的に寛骨臼の完全な癒合は思春期中期におこる[27、28]。完成した寛骨には「大腰筋溝 (psoas valley)」と呼ばれ

る寛骨臼縁を通過する腸腰筋の走行部位に一致する部位が存在する (Fig. 1B) [29]。psoas valley の形態異常は比較的高い頻度で見られるが、これは腸腰筋の病的肥厚や炎症時に腸腰筋により股関節に負荷がかかり、その結果起こる腸腰筋インピンジメントが主たる原因の一つとして知られている[30、31]。TRPS 患者の 45%以上が若年性の変形性股関節症を発症し[4、32]、大腿骨頭の変形を伴うペルテス病様病変を呈することが多い [33、34、35]。これらのことは股関節の正常発生に TRPS1 が関与することを示唆している。

本研究では、生後の TRPS 病態解析にも寄与しうるモデルマウスの作出を試みた。*Trps1* 遺伝子の発現候補領域の同定をまず行い、そのゲノム候補領域を欠失させた *Trps1* 低発現型マウスを新規に作出し、生後の TRPS の病態の一部を再現する動物モデルとなりうるか詳細に検討した。

## II. 材料ならびに方法

本研究における動物実験および遺伝子組換え実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会 の 審 査 ・ 承 認 （ 承 認 番 号 ： 動 歯 -29-016-0、 動 歯 -30-018-0、 動 歯 R-01-006-0）、大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の審査・承認（承認番号 4141、4930）のもとに行った。

### 1. コンベンショナル*Trps1*ノックアウトマウスの遺伝子型決定と*Trps1*ハイポモルフマウス

#### スの作製

*Trps1*-KO は和歌山県立医科大学の村垣泰光先生より供与頂いた。CRISPR/Cas9 ゲノム編集により *Trps1* 転写制御候補領域の欠失マウスを作製した。作製にあたって、プロモーター上流領域（Enh1）もしくは 第 1 イントロン内の約 3～4kb（Enh2、3）それぞれを個別に欠失、あるいは Enh2 と Enh3 の両方を含む約 20 kb の領域（Enh2/3）を欠失させた。Enh1 欠失（ΔEnh1）系統は大阪大学微生物学研究所の伊川正人先生、Enh2 欠失（ΔEnh2）、Enh3 欠失（ΔEnh3）、Enh2/3 欠失（ΔEnh2/3）系統はがん研究会の八尾良司先生により作出された。

ゲノム編集に用いたガイド RNA 配列は、ΔEnh1 では gRNA1 : TCCACTCCTCCCCGTTGCAAagg と gRNA2 : AAGACCAGCATGTATTAACctgg、ΔEnh2 では gRNA1 : CGCTGCTGCAAGTTCTGGggg、gRNA2 : GAGGAACTAAATTAAGCAGagg、ΔEnh3 では gRNA1 : ACTTTAGGAACAAAACACCAggg、gRNA2 : CAGGCAAGATCAGTTCCCAAagg、ΔEnh2/3 では gRNA1 : CGCTGCTGCAAGTTCTGGggg と gRNA2 :

CAGGCAAGATCAGTTCCCAAgg (小文字は PAM 配列を示す) である。crRNA、tracrRNA、Cas9 タンパク質複合体を C57BL/6J の受精卵にエレクトロポレーションにて導入し、2 細胞期まで in vitro で培養したのち、受精卵を偽妊娠雌マウスの卵管に移植した。遺伝子型判定で欠失を確認できた F0 マウスを C57BL/6J (日本 Slc) 野生型マウスと交配し、生まれた仔を遺伝子型判定した。*Trps1*-KO 系統も C57BL/6J 系統で維持されていたため、これ以降の交配はすべて C57BL/6J 系統の遺伝的背景で行った。

離乳時の遺伝子型の判定は、生後 3 週目以降に尾の組織片から精製したゲノム DNA を用いて、polymerase chain reaction (PCR) 法による野生型および変異型アレルの検出にて行った。本研究で使用したプライマーを Table 1 に示す。体重測定は通常の離乳後、4 週目から 9 週目まで 1 週ごとに行った。胎生期サンプルの獲得には、膣栓が出現した日の正午を胚発生日 0.5 日齢 (Embryonic (E) 0.5) とした。妊娠した雌マウスは CO<sub>2</sub> チャンバー装置もしくは過剰のペントバルビタール腹腔内投与 (ナカライテスク, Kyoto, Japan) により安楽死させ、帝王切開で胚を採取した。遺伝子型判定には皮膚、肝臓、もしくは尾の組織片から精製したゲノム DNA を用いた。

## 2. 骨・軟骨染色、マイクロCT画像、および3次元画像構築

骨と軟骨の染色は、McLoard の報告に従い行った[36]。具体的には、皮膚、内臓を除去し、95%エタノールで固定した。その後 2 日間アセトン中で、脂肪を除去した。続いて、3 日以

上 0.3% アルシアンブルーと 0.1%のアリザリンレッド溶液を 37°Cで 1 匹につき 10 ml を用いて染色した。その後、蒸留水で洗浄し、1% KOH 水溶液により骨格が周囲の組織からはっきり見えるようになるまで浸漬した。

骨盤領域のマイクロコンピュータトモグラフィー（マイクロ CT）解析では、R-mCT2（Rigaku, Tokyo, Japan）により、FOV（Field of view）20、90 V、160 A の条件で撮影し、連続した断層スライス画像を取得した。画像は 3 次元再構成画像ソフトウェア（TRI/3D-BON; RATOC system engineering Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いて作成した。腸腰筋走行部における寛骨の形態異常の指標となる psoas valley depth [37] は ImageJ ソフトウェアを使用して測定した。

### 3. 組織調製、RNA調製およびリアルタイムPCR

生後 3 日目の仔マウスをペントバルビタールの腹腔内過剰投与により安楽死させた後、冷リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline: PBS）中で実体顕微鏡を使用して各種組織や器官を解剖した。各組織・臓器は、別途、 $\beta$ -メルカプトエタノール添加 350  $\mu$ l 緩衝液 RLT にて-80°Cで保存した。尾の組織片は遺伝子型判定のため保存した。RNeasy Plus kit（Qiagen, Hilden, Germany）により、製造社の指示通りに RNA 精製を行った。野生型および *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh2/3/ $\Delta$ Enh2/3</sup> から得たサンプルを 30 秒間ホモジナイズし、その後、25°C、10,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清のみをカラム精製工程に使用した。精製した RNA 1  $\mu$ g から ReverTra



Ace (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用した逆転写反応により cDNA の調製を行った。リアルタイム PCR には THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO) を使用し、20  $\mu$ l で行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーを Table 2 に示す。解析は同腹仔から採取した組織・臓器で行い（雌雄の選別は行っていない）、2 匹の別の雌親マウスからの仔を用い解析を 2 回行い、同様の傾向を示す結果を得た（各回コントロール n=3、 $\Delta$ Enh2/3 n=2-3）。

#### 4. 肉眼的解析、組織切片の作製と組織学的解析

生後 4 週、10 週のマウスを CO<sub>2</sub> チャンバー装置により安楽死させ採取した大腿骨、股関節は直ちに 4%パラホルムアルデヒド含有 PBS にて 4°C で 24 時間浸漬固定を行った。一部は麻酔後、還流固定を行いさらに浸漬固定を行った。固定後、1~2 週間 10%エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) にて脱灰処理を行った。通法に従って、脱灰組織のパラフィン包埋を行い、厚さ 4  $\mu$ m のパラフィン切片を作製した。また、一部肉眼的解析のため、脱灰前に写真撮影を行った。通法に従い、脱パラフィン、親水処理後、ヘマトキシリン・エオジン染色またはトルイジンブルー染色を行った。染色された切片に対して脱水・透徹・封入処理後、光学顕微鏡 (OLYMPUS SZX12) による観察および画像撮影を行った。

#### 5. in situ hybridization

生後 1 か月の大腿骨から作製した厚さ 4  $\mu\text{m}$  のパラフィン切片を解析に供した。*Col1a1*、*Col2a1*、*Col10a1*、*Mmp13* に対するジゴキシゲニン (DIG) 標識 cRNA プローブを合成し、ハイブリダイゼーション、プローブ洗浄後、アルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗 DIG 抗体で反応させた。その後、BM Purple AP (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) を基質として用いて発色させた。

## 6. ウェスタンブロット

10 センチ培養プレートに約 90%コンフルエントになるまでマウス膝関節軟骨を培養し、直接 750  $\mu\text{l}$  の 5% $\beta$ -メルカプトエタノールを添加した 1x SDS (Sodium Dodecyl Sulfate: ドデシル硫酸ナトリウム) サンプルバッファーで回収した。その後、22G 注射針にサンプルを通し DNA を断裂させ、80°C で 20 分加熱し完全に SDS 化させた。10,000 rpm で 10 分間遠心後、上清を泳動サンプルとして用いた。1 レーンあたり 15  $\mu\text{l}$  のサンプルをアプライし、10% ポリアクリルアミドゲルを用いて、100 V で約 1 時間電気泳動を行った。その後、ゲルから PVDF メンブレンに 250 mA で 2 時間転写を行った。1%ブロックエース (大日本製薬) を Tris Buffered Saline (0.05% Tween 20 添加 ; TBST) に溶解した溶液でブロッキング後に、メンブレンを抗 Trps1 抗体 (Santa Cruz C-17, 26976 ; 希釈倍率 1 : 500) により室温で 16 時間反応させた。TBST でメンブレンを洗浄後、二次抗体 (BIOTINYLATED ANTI-GOAT IgG (H+L) BA-5000 ; 希釈倍率 1:1000) により室温で 1 時間、さらに HRP 標識 Streptavidin を室温で 1

時間反応させた。TBST でメンブレンを洗浄後、ジアミノベンチジン (TGI, D0078, Tokyo Japan) と過酸化水素 (和光純薬) を基質として発色させた。反応は蒸留水による洗浄により停止させた。等量のサンプルの泳動は同様に泳動、転写させたメンブレンを  $\alpha$ -Tubulin 抗体 (Sigma, ZRB1316-25UL, 1:2000) によるウェスタンブロットにより確認した。

## 7. ATAC-seq、ChIP-seq

マウス肋軟骨におけるオープンクロマチン領域の検出 (Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing: ATAC-seq) [38]、活性型エンハンサーの指標となるヒストン修飾 (H3K4me2 および H3K27ac) の検出 (Chromatin Immunoprecipitation sequencing: ChIP-seq) については共同研究者によって行われ、*Trps1* 遺伝子領域におけるピークデータを本研究で使用した。H3K4me2 および H3K27ac に対する ChIP ではそれぞれ抗 H3K4me2 抗体 (Cell Signaling Technology #9725)、抗 H3K27ac 抗体 (Cell Signaling Technology #8173) を用いて、断裂化したタンパク質-クロマチンの複合体と氷上で 4 時間反応させた。

## 8. 細胞培養

初代軟骨細胞の採取は過去の報告に従い行った [39]。すなわち、回収したマウス膝もしくは肋軟骨を 3 mg/ml のコラゲナーゼで 37°C 45 分インキュベートし、その後、軟骨組織を集めてさらに 16 時間 0.5 mg/ml のコラゲナーゼでインキュベートした。セルストレーナー

でろ過、1,000 rpm、10 分間の遠心により細胞を沈殿させて、PBS で 2 回洗浄したのちに実験に用いた。初代骨芽細胞は生後 1 週以内のマウス頭頂骨から採取した。すなわち、PBS 中に実体顕微鏡下で頭頂骨を採取後、PBS に 0.5 mg/ml コラゲナーゼと 1 mg/ml ディスパーゼを添加した酵素液中で 37°C 15 分、5 回反応させた（反応液量は 1 回 4 ml を用いた）。最初の 1 回目の反応液上清は廃棄し、その後 4 回の反応液上清中に遊離した細胞を回収し、初代骨芽細胞として用いた。初代軟骨細胞は 10% ウシ胎仔血清（fetal bovine serum: FBS）を含む DMEM high glucose 培地、初代骨芽細胞は 10% FBS を含む  $\alpha$ -MEM 培地、ATDC5 細胞は 10% FBS を含む DMEM/F-12 培地（ただし後述のトランスフェクション時は DMEM high glucose を使用）、HEK293 細胞は 10% FBS を含む DMEM high glucose 培地にて維持した。

## 9. ルシフェラーゼアッセイ

マウス *Trps1* の最小プロモーター 0.7 kb 単独、最小プロモーターに Enh1、Enh2、Enh3 領域を連結した配列をそれぞれホタルルシフェラーゼのルシフェラーゼレポーターベクターに導入した。ScreenFectA（富士フイルム、Osaka, Japan）を用いたトランスフェクションにより、ヒト胎児腎細胞株（HEK293）、軟骨細胞株（ATDC5）、肋軟骨細胞、膝軟骨細胞、頭蓋冠骨芽細胞にレポーターベクターを導入した。トランスフェクション効率を標準化するために、同時に pTK（チミジンキナーゼ）レニラルシフェラーゼベクターも導入した。トランスフェクションから 36 時間後に細胞を回収し、Dual Luciferase kit (Promega, Wisconsin

USA) を用いてレニラルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼの両方の活性をルミノメーター (Lumat LB9507, Berthold Japan K.K.) で測定した。

## 10. 軟骨細胞増殖アッセイ

初代軟骨細胞の調整は、通法に従って行った[39]。野生型、*Trps1*<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の膝軟骨細胞を 2000 cell/well で播種し、10% FBS-DMEM 中で培養した。3 日目、6 日目、9 日目でクリスタルバイオレット染色を行い、全細胞数をカウントした。

## 11. 統計学的解析

実験結果は平均値±標準偏差として表記した。2 群間に対して統計学的検定を行う場合は、t 検定を用いて比較を行った。3 群間の検定には、Prism 8 を使用し、一元配置分散分析 (ONE WAY ANOVA) を行った後、下位検定として Tukey's multiple comparisons test を行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

### III. 結果

#### 1. *Trps1*コンベンショナルノックアウトマウスの表現型

胎生期 (E15.5、16.5) の *Trps1* コンベンショナルノックアウトマウス (*Trps1*-KO) において骨格染色 (Fig. 2) を行った。*Trps1*-KO の寛骨のサイズは小さく、特に長軸の縮小が顕著に見られた。さらに下顎骨近位部の下顎角、下顎頭、筋突起のいずれも小さかった。また、椎骨体部の低形成が見られた。これらの表現型の一部は過去の報告と一致していた[6]。

#### 2. *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

本研究室の先行研究 [40] により、*Trps1* 転写開始部位の上流に *Trps1* 遺伝子発現に寄与しうる配列が存在することが明らかになっており、今回、生後の大腿骨の骨膜・骨内膜に位置する細胞や成長板軟骨細胞での本領域による転写活性も限定的に認めた (Fig. 3A, B)。そこで最小プロモーターを残して転写開始部位より上流の約 4 kb を含む配列を欠失させたマウス ( $\Delta Enh1$ ) をゲノム編集により作出し、交配により両アリルから *Enh1* を欠失させた *Trps1* <sup>$\Delta Enh1/\Delta Enh1$</sup>  と、*Enh1* の欠失に加えて片アリルから *Trps1* 遺伝子を欠失させた *Trps1* <sup>$\Delta Enh1/-$</sup> を作出した (Fig. 3C)。*Trps1* <sup>$\Delta Enh1/+$</sup> 同士を交配させて生まれてくる野生型、*Trps1* <sup>$\Delta Enh1/+$</sup> 、*Trps1* <sup>$\Delta Enh1/\Delta Enh1$</sup>  の匹数を断乳時に数えたところ、*Trps1* <sup>$\Delta Enh1/\Delta Enh1$</sup>  マウスの出現頻度はメンデルの法則に従っており (82 匹中 23 匹 ; 28%)、また 1 年以上生存することがわかった (Fig. 3D)。胎生期 (E17.5) の骨格染色では体長差、上肢、下肢、寛骨、下顎骨に違いは認めなかった (Fig. 3E-K)。生後 4 週から 9 週目までの体重変化についても野生型、

*Trps1*<sup>ΔEnh1/+</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh1/ΔEnh1</sup> では違いが認めなかった (Fig. 3L)。ヒト TRPS 患者の場合、生後に股関節変形症がみられることから[4]、*Trps1*<sup>ΔEnh1/ΔEnh1</sup> の股関節に対してマイクロ CT 解析、組織学的解析を行ったが、違いは認めなかった (Fig. 4A, B, D, E)。また、成獣マウス的大腿骨骨端部についても違いは認めなかった (Fig. 4G, H, J, K)。次に、*Enh1* の欠失に加えて片アリの *Trps1* 遺伝子を欠失させた *Trps1*<sup>ΔEnh1/-</sup> の股関節、大腿骨についてマイクロ CT、組織学的解析を行った (Fig. 4C, F, I, L)。股関節の形成過程で生じる *psoas valley* がマイクロ CT でやや深いことを認めたが (図 4A, C)、結合部分の組織学的解析では異常を認めず (図 4D, F)、大腿骨に関しても同様に異常は認めなかった (図 4G, I, J, L)。

### 3. ATAC-seqおよびヒストン修飾ChIP-seqによる*Trps1*遺伝子のエンハンサー候補領域の検討

*Trps1* 遺伝子周囲のオープンクロマチン領域と活性型エンハンサーの指標となるヒストン修飾を手掛かりとしたエピゲノム解析を野生型マウスより採取した肋軟骨細胞で行った。その結果、*Trps1* 遺伝子座の転写開始部位近傍に加えて約 40 kb ある第 1 イントロン内で ATAC-seq、ChIP-seq (H3K4me2、H3K27ac) でピークが重なる 3~4 kb の領域を 2 か所見出し、*Enh2*、*Enh3* として検討することとした (Fig. 5A)。この 2 か所の候補領域がエンハンサーの候補になり得るかを検討するため、*Trps1* の発現が見られるヒト胎児腎細胞株 (HEK293)、軟骨細胞に分化するマウス細胞株 (ATDC5)、マウス初代肋軟骨細胞、マウス初代膝軟骨細胞、マウス初代頭蓋冠骨芽細胞で、*Enh1* も含めたルンフェラーゼアッセイを

行った。Enh1、Enh2、Enh3 いずれも上記全ての細胞において、コントロールよりも強い転写活性の上昇を誘導したが、特に Enh2 において、その傾向は顕著であった (Fig. 5B, C)。

#### 4. 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

Enh2 と Enh3 をそれぞれ欠失させたマウス ( $\Delta$ Enh2、 $\Delta$ Enh3) をゲノム編集により作出し、成獣マウスの体重変化、股関節、大腿骨について検討した (Fig. 6、7)。 *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh2/ $\Delta$ Enh2</sup>、 *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh3/ $\Delta$ Enh3</sup> はコントロール群と比較しても生後 4~9 週での体重変化は認めなかった (Fig. 6A, B)。 *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh2/-</sup>、 *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh3/-</sup>では *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/-</sup>同様に股関節の psoas valley がやや深いことがわかったが (Fig. 7C, E)、いずれも組織像に違いは認めなかった (Fig. 7F-J)。また、大腿骨についても形態、組織ともに違いは見られなかった (Fig. 7K-S)。

#### 5. 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

次に Enh2、Enh3 を含む約 20kb を同時に欠失させたマウスをゲノム編集により作出した ( $\Delta$ Enh2/3)。標的領域の欠失はゲノム DNA における PCR 法を用いて判定し (Fig. 5A, 8A)、さらにスプライシングなどに異常がないことを、第 1 イントロンをはさむように設計したプライマーを用いた RT-PCR により確認した (Fig. 8B)。個々の臓器・組織を採取し、*Trps1* 遺伝子の発現比較はリアルタイム PCR 法で行った (Fig. 8C) その結果、*Trps1* <sup>$\Delta$ Enh2/3/ $\Delta$ Enh2/3</sup> での *Trps1* の発現量は腎臓、股関節、肋骨など複数の部位で低下していた。ウエスタンブロット法により *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh2/3/ $\Delta$ Enh2/3</sup> から採取した初代軟骨細胞における TRPS1 蛋白質の発現低



下も確認した (Fig. 8D)。

*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の新生仔の骨格染色を行ったところ、全身骨格、寛骨、下顎骨の低形成が見られ、椎骨椎体部の遅延を認めた (Fig. 9A-E)。そこで、野生型、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/+</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の生後の体重変化を生後 4～9 週目までを計測したところ、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> は野生型と比較して有意な体重減少を示した (Fig. 9F)。回収した際の体長もやや小さかった (Fig. 9G)。また、生後 1 か月齢のマウスでは *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の腸骨と恥骨の骨化遅延が見られた (Fig. 10A, B)。組織学的解析においても腸恥隆起相当部位の石灰化の遅延を認めた (Fig. 10C, D)。生後 2～3 か月齢のマウスの股関節については組織学的に違いを認めなかったが、マイクロ CT による形態解析では *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の psoas valley がコントロールと比較して有意に深かった (Fig. 10G, H, I)。生後のマウスの長管骨成長板でも *Trps1* の発現が認められるため、2～3 か月齢の大腿骨に対してマイクロ CT、組織学的解析を行った。マイクロ CT 解析では違いは認められなかったが (Fig. 11A-D)、組織学的解析で *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> 成長板の軟骨細胞の増殖層の配列の乱れを認めた (Fig. 11E-H)。軟骨細胞の配列の乱れは 1 か月齢の *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> でも認められた (Fig. 12A, B, G, H)。そこで、in situ hybridization 法により、大腿骨骨端における *Col1a1*、*Col2a1*、*Col10a1*、*Mmp13* の発現パターンを検討したところ *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の二次骨化中心形成領域内に *Col2a1* の発現が認められた (Fig. 12J)。

次に、Enh2/3 の欠失に加えて片側のアリの *Trps1* 遺伝子を欠失させたマウス

(*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>) を交配により作出し解析を行った。生後 3 週を超えて生存している *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> マウスは 29 匹のうち 2 匹だけであった。生後 5 日において生存するマウスを数えると、41 匹のうち 4 匹の *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> マウスが確認でき、これらは *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/+</sup> と *Trps1*<sup>+/-</sup> の雌雄マウスの交配により期待される 25% の出現頻度から有意に匹数は少なかった。一方胎生期では、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> マウスは 50 匹中 12 匹存在した (Fig. 13A)。これらをまとめると、*Trps1-KO* のように生後すぐに致死的にはならず、数日は生存するマウスがいることがわかった。生後から成獣の体長も *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> で明らかに小さいことがわかった (Fig. 13B, C, D)。出生 4 日目の骨格染色では、寛骨、上腕骨、肩甲骨の二次骨化中心を形成する領域が小さかった (Fig. 13E-H)。ほかの系統同様に股関節の解析を行うと、psoas valley がこれまでの系統 (ΔEnh1、ΔEnh2、ΔEnh3、ΔEnh2/3、ΔEnh1/-、ΔEnh2/-、ΔEnh3/-) の中で最も深いことがわかった (生後 3 か月齢のデータを示す ; Fig. 14A, B)。この原因の一つとして、ヒトにおいては腸腰筋が関係する可能性が示唆されていることなどから組織解剖を行ったところ、野生型と *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> の間で腸腰筋の付着部位、走行に違いは認められなかった (Fig. 14C, D)。組織学的解析において、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> の腸恥隆起相当部位に軟骨細胞の残存が認められた (Fig. 14E-J)。また、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> の大腿骨では遠位骨端の形態異常が認められ、マイクロ CT 解析から二次骨化中心の領域が野生型よりも小さいことがわかった (Fig. 15A)。組織学的解析において、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> の遠位骨端では成長板近傍の骨端部海綿骨に軟骨細胞が残存しており、これは生後 6 か月を過ぎた個体でも認めた (データ示さ

ず)。また、組織解剖、マイクロ CT 解析から、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>では膝蓋骨の内側脱臼を認めた (Fig. 15A)。6 か月齢の *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>でも膝蓋骨の内側脱臼を認めた。*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>新生仔の骨格染色では、膝蓋骨が定位置に存在したことから (2 匹中 2 匹) (Fig. 15B)、膝蓋骨の脱臼は後天的に起こることが示唆された。*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>と同様に、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>の成長板では軟骨細胞のカラム状の配列が崩れていた (Fig. 16A-D)。

## 6. 培養軟骨細胞増殖アッセイ

Enh2、Enh3、および両方の欠失により認められる骨格系の表現型が軟骨細胞の増殖能異常に起因する可能性を検証するために、野生型、*Trps1*<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の膝軟骨細胞を回収して細胞増殖アッセイを行った。野生型に対して、培養 6 日目で *Trps1*<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup> と *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> において、9 日目で *Trps1*<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> において有意な増殖能の低下を認めた (Fig. 17 ; N=4)。

## IV. 考察

### 1. *Trps1*発現制御候補領域について

ノックアウトマウスの表現型解析において、欠失させた遺伝子が個体の生存に必須である場合、胎生期もしくは生まれて間もなく死に至る可能性が高く、これら遺伝子の生体内での機能について得られる知見は限定的となってしまう。*Trps1-KO* マウスも生後間もなく致死となるため、特に生後の *Trps1* 遺伝子の役割についてはいまだ不明な点が多い。新生仔致死の表現型を回避する手法として時期・組織特異的ノックアウトが考えられる。*Trps1-KO* の出生時の致死の原因が骨格異常に起因する呼吸不全である可能性が高いため、*Sp7-Cre*、*Colla1-Cre*、もしくは *Col2a1-Cre* マウス系統 [41] などを用いた骨格組織特異的 *Trps1-KO* においても、コンベンショナル KO 同様に早期に致死となる可能性が考えられた。*Prx1-Cre* を用いることも検討したが、四肢骨を中心として標的にする Cre 系統であるため [42]、TRPS の病態が現れる中軸骨格、上下肢帯領域における *Trps1* 遺伝子の機能解析に不適切であると考えられた。また、タモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼによる時期・組織特異的ノックアウトマウスの場合、タモキシフェンによる骨への影響の可能性を否定できない[41]。これらの理由から本研究では、遺伝子発現制御領域の欠失により *Trps1* の発現を低下させたマウスを作出することで、出生直後の致死を回避し、生後の特に骨組織における表現型解析が可能となると考えた。同時に、いまだ知見の少ない *Trps1* の発現制御領域も見出せることができるのではないかと考えた。

Enh1 に関しては、*Trps1*<sup>ΔEnh1/-</sup>でわずかに股関節の形態異常が見られる程度であったことから、Enh1 が骨格における *Trps1* の生理的発現レベルの誘導・維持に必須ではないか、あるいは相補的に作用する別の領域があることを示唆された。Enh1 は関節軟骨には活性があるものの成長板軟骨における活性は限定的であることは、Enh1 欠失における軽微な表現型をある程度説明するものと考えられる[39]。一方、エピゲノム解析から *Trps1* の発現制御領域として候補に上がった Enh2、Enh3 の両方を同時に欠失させたマウスでは骨格系における顕著な表現型を認めたことから、Enh2、Enh3 を含むゲノム領域が（恐らくは *Trps1* の発現制御を介して）骨格系で果たす役割は大きいものとみられる。一方、個々の領域を個別に欠失させた場合の表現型はやはり軽微であったことから、これらの 2 つの領域 (Enh2、Enh3) が相補的に協調して骨格形成の際に作用していることが示唆された[43]。ただし、今回 Enh2 と Enh3 の間のゲノム領域も欠失させているため、この領域が骨格形成の制御に関与している可能性は否定できない。そのため、今後 Enh2 領域と Enh3 領域のみを同時に欠失させたマウスでの検証も必要であると考えられた。

## 2. *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>の体長差について

野生型と *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> において出生直後から体長差が認められる要因の一つに、軟骨細胞の増殖能の違いが考えられた (Fig. 17)。さらに、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> では生後 1 か月で成長板軟骨細胞の配列の乱れが認められ、生後 3 か月においてもその傾向は維持されていた。

過去の文献で、長管骨の短いマウスにおける成長板軟骨細胞の配列の乱れが報告されている[44-46]。成長板軟骨細胞の配列の乱れが *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> で認めた体長差の要因となっている可能性があり、今後さらに検討する必要がある。また、生後 1 か月の *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> において、二次骨化中心形成領域に *Col2a1* 陽性細胞、トルイジンブルー陽性細胞を認めたことは、二次骨化中心における骨形成が一時的に遅延していることを示唆している。このことも、少なくとも部分的には *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の体長の表現型の要因であると考えられる。

### 3. *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>の股関節形態異常について

Psoas valley は、腸腰筋の一部で椎骨に付着する最も重要な筋肉の一つであり、椎骨の両側、骨盤の淵に存在する長い筋肉の走行部位と一致する。遠位端で腸骨筋と結合し、腸腰筋を形成する。大腰筋は、運動時と静止時の運動力学的機能と、姿勢調整機能を有している。

*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の股関節では、生後 1 か月で寛骨臼を形成する部位の骨化が遅れていたものの、生後 3 か月経過で組織学的にはキャッチアップが起こっていた。しかしながら生後 3 か月の *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の寛骨臼の形態は、野生型と比べて psoas valley が有意に深かった。

これは大腿骨頭の被覆が浅いことを示し、臼蓋形成不全の病態に類似していることを示唆する[47,48]。 *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の股関節で認められる psoas valley の形態異常は、寛骨臼の骨化遅延部分に腸腰筋からの負荷が長期間加わったことによる変形 (deformation) である可能性が考えられる[49]。これらのことを踏まえると、 *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> では psoas valley の形態

異常による大腰筋の機能への影響（姿勢調節機能、運動機能）も考えられるため、今後、機能的な検証も必要と思われる。

#### 4. *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>の出生後の体長差について

*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>では出生直後から体長差が見られるが、考察 2 で述べた成長板軟骨細胞の増殖や配列の異常の他にも、生後の二次骨化中心の形成異常が関与している可能性が考えられる。生後の骨格成長には、二次骨化中心形成予定領域近傍の「stem cell niche」による幹細胞の自己複製と成長板への軟骨細胞の供給が関与するという報告がある[50]。*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>では、生後 3 か月においても二次骨化中心形成領域にトルイジンブルー陽性細胞が残存していた。したがって、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>では、二次骨化中心における骨形成の遅れによって stem cell niche が十分に形成されず、成長板への軟骨細胞の供給不足に陥り、生後の骨格成長に影響した可能性が考えられた。また、二次骨化中心は外力から成長板軟骨を保護する役割を有することも報告されている[51]。したがって、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>では二次骨化中心の形成が不十分なことによって成長板軟骨細胞を十分に保護できず、体長差となって表れた可能性が考えられた。生後 1 か月の *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> でも二次骨化中心における *Col2a1* 陽性軟骨細胞の残存と骨化遅延、および骨端の変形が認められており、これらも成長板軟骨の配列の乱れに関与している可能性がある。

体長に最も影響するホルモンの一つに成長ホルモン（GH）がある。TRPS に関して GH の

分泌量の関与は未だ一貫した結論に至っていない。TRPS 患者に対する GH の補充の効果はないとの報告[52、53]と、逆に効果があるとの報告もある[54、55]。また、Merjaneh らは GH 分泌は正常であるが、GH 治療を行った場合に有意に効果があるとしている[56]。これらの報告は GH 補充がヒト TRPS の低身長治療に対するスタンダードとはならないことを示唆しており、成長障害の起こる詳細な仕組みのさらなる理解が必要であると思われる。

#### 5. *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>の骨格系の異常と生存数の減少について

大腿骨遠位端の周囲は、主に大腿四頭筋からなる大腿四頭筋腱、膝蓋骨、膝蓋腱、脛骨から構成されている。大腿四頭筋は、4 つの異なる筋肉（大腿直筋、外側広筋、中間広筋、内側広筋）で構成されており、大腿四頭筋腱を介して膝蓋骨に共通の挿入点を持つことで膝の伸展の際に重要な役割を果たす[57]。

*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>の大腿骨遠位端は、成獣に達しても二次骨化中心に相当する部位に軟骨細胞が残存していた。この異常が生後 6 か月でも認められることは、二次骨化中心の成熟遅延のみならず、未成熟な状態で停止していることを示唆している。また、軟骨細胞の残存した未成熟な骨化状態が長期間続く間、大腿骨周囲の筋肉からの負荷を受け続けることで、大腿骨の遠位端の変形が起こった可能性が示唆される。

膝蓋骨は、半月形の舟状骨であり、伸展時の作動性と大腿四頭筋の牽引力を増加させる働きがあり[57]、支点となるため外力が集中しやすい。膝蓋腱は、定義上、骨（膝蓋骨）と骨



(脛骨結節)をつなぐため、靱帯ともいわれる。膝蓋腱は、大腿四頭筋と脛骨を結ぶ役割があり、大腿四頭筋とともに、膝の伸展と関節の安定性に重要な役割を担っている[57、58]。ヒトの場合、膝蓋骨の亜脱臼の繰り返しで大腿骨の内、外側顆が平坦化し、脱臼を起こすことが報告されているが[59]、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>マウスでも同様に大腿骨骨端の平坦化が認められている。従って、今回の膝蓋骨の脱臼の原因の一つは以前の報告同様に膝蓋骨の亜脱臼の繰り返しによる大腿骨の内・外側顆の平坦化が考えられる。内・外側顆の平坦化がみられた別の要因として、大腿骨骨端の骨化遅延部への周囲筋の負荷による平坦化が考えられる。*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>でも生後1か月の段階で二次骨化中心の形成が遅れる傾向が見られることから後者の可能性の方が強いのではないかと考えられた。この原因を突き止めるためには作出したマウスを生後初期に膝蓋骨を除去した状態で大腿骨の平坦化が起こるかを検証する必要があるかもしれない。

*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>の *psoas valley* が深い原因についても膝同様、未熟な *psoas valley* 相当部位に腸腰筋による負荷が長期間かかったことが示唆される。しかしながら、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>は成獣まで生存するマウスが少なく、サンプルもメスしか採取できていないことから、今後オスのサンプルを獲得して検証する必要がある。また、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>は従来の *Trps1*-KO のように生後すぐには致死적にはならず数日は生存するが、数週間後まで生存するマウスは極めて少ない。*Trps1* は心臓にも発現が認められるため[40]、ヒトの場合でも見られる先天性の心疾患を有していた可能性もある。また、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>に骨格の異常を少なからず認めるため、

大部分が呼吸器機能の異常を来した可能性も否定できない。呼吸器機能の障害の結果起こる成長不全のため、体格が大きくなる周囲の同腹仔よりも栄養状態不良となった結果、餓死した可能性も考えられるが、死因の特定に関しては議論の余地がある。

## 6. ヒトTRPSとの症状比較について

今回作出したマウスは骨格系以外の心臓、腎臓や毛包などの組織について詳細に解析ができておらず、骨格系以外の臓器の変化がどの程度ヒト TRPS を再現しているかさらなる解析が必要である。特に $\Delta$ Enh2/3 系統マウスの新生仔期で腎臓における *Trps1* 遺伝子の発現に明らかな低下が認められたため、ヒト TRPS 患者でも見られるような腎臓の発生もしくは腎機能に何らかの異常が出ている可能性は高い。今回見出したエンハンサー領域は軟骨細胞でのエピゲノム解析より見出されたものであり、骨格系に表現型が強く現れていることと矛盾してはいない。一方で、ほぼすべてのヒト TRPS 患者にみられる特徴的な指骨骨端部の変形は今回作出したマウス系統では観察できず、このことは 1) 症状が出現する閾値は骨格によって異なる可能性、2) 種の違いによる *Trps1* の機能の異なる可能性、3) 同じ軟骨原基内でも解剖学的位置の異なる部位で異なる（もしくは複数の）エンハンサーにより制御されているなどの可能性が考えられた。

## V. 結論

本研究では、生後 TRPS 疾患のモデルマウスを作製することを目的として、マウス *Trps1* 遺伝子のイントロン領域の転写調節領域を探索し、複数の候補モデルを作製し、詳細に検討を行ったところ、以下の結果を得た。

- (1) マウス *Trps1* 遺伝子の第 1 イントロン内に転写制御候補領域 (Enh2、Enh3) を同定した。
- (2) 転写制御候補領域 (Enh2、Enh3) を同時に欠失させると、軟骨細胞を含む多くの組織で *Trps1* の発現が低下した。
- (3) *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> では、体の成長が遅れ、股関節の形態、長管骨成長板の組織構造に異常が認められた。
- (4) *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>では、股関節の形態、大腿骨成長板の異常に加え、膝蓋骨の内側脱臼も認められた。

以上の結果から、今回作出したマウスは生後のTRPS疾患の一部を再現するモデルマウスとして妥当であることが示唆された。

## VI. 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇意なるご指導を賜りました。大阪大学大学院歯学研究科  
療護歯科保健学講座（障害者歯科治療部）秋山 茂久 准教授 に心から敬意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始様々御指導と御検閲をいただきました大阪大学大学  
院歯学研究科 口腔分化発育情報学講座（口腔解剖学第一教室）阿部 真土 講師および大  
庭 伸介 教授に厚く御礼申し上げます。最後になりますが、終始研究に対しご理解とご協  
力を頂いた、障害者歯科治療部ならびに口腔解剖学第一教室の教室員の皆様に厚く御礼申  
し上げます。

## VII. 文献

- [1] Mortier GR, Cohn DH, Cormier-Daire V, Hall C, Krakow D, Mundlos S, Nishimura G, Robertson S, Sangiorgi L, Savarirayan R, Sillence D, Superti-Furga A, Unger S, Warman ML. (2019) Nosology and classification of genetic skeletal disorders: revision. *Am J Med Genet A* 179(12): 2393-419.
- [2] Momeni P, Glöckner G, Schmidt O, Holtum D, Albrecht B, Gillessen-Kaesbach G, Hennekam R, Meinecke P, Zabel B, Rosenthal A, Horsthemke B, Lüdecke HJ. (2000) Mutations in a new gene, encoding a zinc-finger protein, cause tricho-rhino-phalangeal syndrome type I. *Nat Genet* 24:71–74
- [3] Maas S, Shaw A, Bikker H, Hennekam RCM. Trichorhinophalangeal Syndrome. (2017) *Gene Reviews* [Internet]
- [4] Maas SM, Shaw AC, Bikker H, Lüdecke H-J, Tuin K, Badura-Stronka M, Belligni E, Biamino E, Bonati MT, Carvalho DR, Cobben JM, Man SA, Hollander NSD, Donato ND, Garavelli L, Grønborg S, Herkert JC, Hoogeboom AJM, Jamsheer A, Latos-Bielenska A, Maat-Kievit A, Magnani C, Marcelis C, Mathijssen IB, Nielsen M, Otten E, Ousager LB, Pilch J, Plomp A, Poke G, Poluha A, Posmyk R, Rieubland C, Silengo M, Simon M, Steichen E, Stumpel C, Szakszon K, Polonkai E, Ende J, Steen A, Essen T, Haeringen A, Hagen JM, Verheij JBG, Mannens MM, Hennekam RC (2015) Phenotype and genotype in 103 patients with tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Eur J Med Genet* 58(5):279-292
- [5] Puliyl JM, Puliyl MM, Varughese S. (1992) The trichorhinophalangeal syndrome with repeated dislocation of the patella. *Clin Genet* 41(3):139-42
- [6] Suemoto H, Muragaki Y, Nishioka K, Sato M, Ooshima A, Itoh S, Hatamura I, Ozaki M, Braun A, Gustafsson E, Fässler R. (2007) *Trps1* regulates proliferation and apoptosis of chondrocytes through Stat3 signaling. *Dev Biol* 312(2):572-581
- [7] Napierala D, Sam K, Morello R, Zheng O, Munivez E, Shivdasani RA, Lee B. (2008) Uncoupling of chondrocyte differentiation and perichondrial mineralization underlies the skeletal dysplasia in

tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Hum Mol Genet* 17(14): 2244–2254

[8] Suemoto H. (2006) Function analyses of TRPS1, a GATA-type transcription factor, during osteochondrogenesis. *J Wakayama Med Soc* 57(2):74-80

[9] Wuelling M, Schneider S, Schröther VA, Waterkamp C, Hoffmann D, Vortkamp A. (2020) Wnt5a is a transcriptional target of Gli3 and Trps1 at the onset of chondrocyte hypertrophy. *Dev Biol* 457(1):104-118

[10] Kanno S, Gui T, Itoh S, Gai Z, Sun Y, Oikawa K, Yoshida M, Muragaki Y. (2011) Aberrant expression of the P2 promoter-specific transcript Runx1 in epiphyseal cartilage of Trps1-null mice. *Exp Mol Pathol* 90(2):143-148

[11] Nishioka K, Itoh S, Suemoto H, Kanno S, Gai Z, Kawakatsu M, Tanishima H, Morimoto Y, Hatamura I, Yoshida M, Muragaki Y. (2008) Trps1 deficiency enlarges the proliferative zone of growth plate cartilage by upregulation of Pthrp. *Bone* 43(1):64-71

[12] Wuelling M, Kaiser FJ, Buelens LA, Braunholz D, Shivdasani RA, Reinhard Depping, Andrea Vortkamp. (2009) Trps1, a regulator of chondrocyte proliferation and differentiation, interacts with the activator form of Gli3. *Dev Biol* 328(1):40-53

[13] Napierala D, Sam K, Morello R, Zheng O, E Munivez E, Shivdasani RA, Lee B. (2008) Uncoupling of chondrocyte differentiation and perichondrial mineralization underlies the skeletal dysplasia in tricho-rhino-phalangeal syndrome. *Hum Mol Genet* 17(14):2244-2254

[14] Long X, Ornitz DM. (2013) Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(1):a008334

[15] DeSilva JM, Rosenberg KM. (2017) *Anat Rec (Hoboken)* 300(4):628-632

[16] Young M, Selleri L, Capellini TD. (2019) Genetics of scapula and pelvis development: An evolutionary perspective. *Curr Top Dev Biol* 132:311-349

[17] Romer AS, Parsons TS. (1986) *The vertebrate body*. Saunders College Publishing 6:679.

- [18] Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. (2002). Expression of Cre recombinase in the developing mouse limb bud driven by a *Prxl* enhancer. *Genesis*, 33:77–80
- [19] Bardeen CR, Lewis WH. (1901) Development of the limbs, body-wall and back in man. *Am J Anat* 1:1–35
- [20] Capellini TD, Handschuh K, Quintana L, Ferretti E, Di Giacomo G, Fantini S, et al. (2011). Control of pelvic girdle development by genes of the *Pbx* family and *Emx2*. *Dev Dyn* 240(5):1173-89
- [21] O’Rahilly R, Gardner E (1975) The timing and sequence of events in the development of the limbs in the human embryo. *Anat Embryol (Berl)* 148:1–23
- [22] Laurenson RD. (1964) The primary ossification of the human ilium. *Anat Rec* 148:209–217
- [23] Fazekas I, Kosa F. (1978) Forensic fetal osteology. *Akademiai Kiado* 1–413
- [24] Pomikal C, Streicher J. (2010) 4D-analysis of early pelvic girdle development in the mouse (*Mus musculus*). *J Morphol* 271(1):116-126
- [25] Huang R, Christ B, Patel K. (2006) Regulation of scapula development. *Anat Embryol (Berl)* 211:65–71
- [26] Adair F. (1918) The ossification centers of the fetal pelvis. *Transactions of the American Gynecological Society* 43(89): 516–517
- [27] Freedman E. (1934) Os acetabuli. *AJR Am J Roentgenol* 492–495
- [28] Stevenson PH. (1924) Age order of epiphyseal union in man. *Am J Phys Anthropol* 7: 53–93
- [29] Kopydlowski NJ, Tannenbaum EP, Smith MV, Sekiya JK. (2014) Characterization of human Anterosuperior Acetabular depression in correlation with Labral tears. *Orthop J Sports Med* 2(10): 2325967114551328
- [30] Domb BG, Shindle MK, McArthur B, Voos JE, Magennis EM, Kelly BT. (2011) Iliopsoas impingement: a newly identified cause of labral pathology in the hip. *HSS J* 7:145–150
- [31] Andronic O, Nakano N, Daivajna S, Board TN, Khanduja V. (2019) Non-arthroplasty iliopsoas

impingement in athletes: a narrative literature review. *Hip Int* 29:460–467

[32] Lüdecke H-J, Schaper J, Meinecke P, Momeni P, Groß S, Holtum D, Hirche H, Abramowicz MJ, Albrecht B, Apacik C, Christen H-J, Claussen U, Devriendt K, Fastnacht E, Forderer A, Friedrich U, Goodship THJ, Greiwe M, Hamm H, Hennekam RCM, Hinkel GK, Hoeltzenbein M, Kayserili H, Majewski F, Mathieu M, McLeod R, Midro AT, Moog U, Nagai T, Niikawa N, Ørstavik KH, Plöchl C, Seitz C, Schmidtke J, Tranebjærg L, Tsukahara M, Wittwer B, Zabel B, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B. (2001) Genotypic and Phenotypic Spectrum in Tricho-Rhino-Phalangeal Syndrome Types I and III. *Am J Hum Genet* 68(1):81-91

[33] Howell CJ, Wynne-Davies R. (1986) The tricho-rhino-phalangeal syndrome. A report of 14 cases in 7 kindreds. *J Bone Joint Surg Br* 68(2):311-314

[34] Beals PK. (1973) Tricho-rhino-phalangeal dysplasia. Report of a kindred. *J Bone Joint Surg Am* 55(4):821-826

[35] Giedion A, Burdea M, Fruchter Z, Meloni T, Trosch V. (1973) Autosomal- dominant transmission of the tricho-rhino-phalangeal syndrome. report of 4 unrelated families. review of 60 cases. *Helv Paediatr Acta*. 28(3):249-259

[36] McLeod MJ. (1980) Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology* 22(3): 299-301

[37] Kuroda Y, Rai A, Saito M, Khanduja V. (2020) Anatomical variation of the Psoas Valley: a scoping review. *BMC Musculoskelet Disord* 21: 219

[38] Jason D Buenrostro, Paul G Giresi, Lisa C Zaba, Howard Y Chang, William J Greenleaf. (2013) Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. *Nat protoc* 10: 1213–1218

[39] Gosset M, Berenbaum F, Sylvie Thirion, Claire Jacques. (2008) Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat Protoc* 3:1253–1260



- [40] Ahmed GN, Takeuchi Y, Fujikawa, Sharaby, JAAE Wakisaka S, Abe M. (2016) Fate mapping of Trps1 daughter cells during cardiac development using novel Trps1-Cre mice. *Genesis* 54(7):379-388
- [41] Elefteriou F, Couasnay G. (2020) Advantages and Limitations of Cre Mouse Lines Used in Skeletal Research. *Methods Mol Biol* 2230:39-59
- [42] Logan M, Martin JF, Nagy A, Lobe C, Olson EN, Tabin CJ. (2002) Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prx1 enhancer. *Genesis* 33(2):77-80
- [43] Schoenfelder S, Fraser P. (2019) Long-range enhancer–promoter contacts in gene expression control. *Nat Rev Genet* 20:437-455
- [44] Weisz-Hubshman M, Egunsula AT, Dawson B, Castellon A, Jiang MM, Chen-Evenson Y, Zhiyin Y, Lee B, Bae Y. (2022) DDRGK1 is required for the proper development and maintenance of the growth plate cartilage. *Hum Mol Genet* 31(16):2820-2830
- [45] Dubail J, Huber C, Chantepie S, Sonntag S, Tüysüz B, Mihci E, Gordon CT, Steichen-Gersdorf E, Amiel J, Nur B, Stolte-Dijkstra I, Eerde AM, Gassen KL, Breugem CC, Stegmann A, Lekszas C, Maroofian R, Karimiani EG, Bruneel A, Seta N, Munnich A, Papy-Garcia D, Dure-Molla MDL, Cormier-Daire V. (2018) SLC10A7 mutations cause a skeletal dysplasia with amelogenesis imperfecta mediated by GAG biosynthesis defects. *Nat Commun* 9(1):3087
- [46] Lamuedra A, Gratal P, Calatrava L, Ruiz-Perez VL, Largo R, Herrero-Beaumont G. (2020) Disorganization of chondrocyte columns in the growth plate does not aggravate experimental osteoarthritis in mice. *Sci Rep* 10:10745
- [47] James CS, Miocevic M, Malara F, Pike J, Young D, Connell D. (2006) MR imaging findings of acetabular dysplasia in adults. *Skeletal Radiol* 35:378-384,
- [48] Tan V, Seldes RM, Katz MA, Freedhand AM, Klimkiewicz JJ, Fitzgerald Jr RH. (2001) Contribution of acetabular labrum to articulating surface area and femoral head coverage in adult hip joints: An anatomic study in cadaver. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 30:809-812

- [49] Jiang Z, Byers S, Casal ML, Smith LJ. (2020) Failures of Endochondral Ossification in the Mucopolysaccharidoses. *Curr Osteoporos Rep* 18(6):759-773
- [50] Chagin AS, Newton PT. (2020) Postnatal skeletal growth is driven by the epiphyseal stem cell niche: potential implications to pediatrics. *Pediatr Res* 87(6):986-990
- [51] Xie M, Gol'din P, Herdina AN, Estefa J, Medvedeva EV, Li L, Newton PT, Kotova S, Shavkuta B, Saxena A, Shumate LT, Metscher BD, Großschmidt K, Nishimori S, Akovantseva A, Usanova AP, Kurenkova AD, Kumar A, Arregui IL, Tafforeau P, Fried K, Carlström M, Simon A, Gasser, Kronenberg HM, Bastepe M, Cooper KL, Timashev P, Sanchez S, Adameyko I, Eriksson A, Chagin AS. (2020) Secondary ossification center induces and protects growth plate structure. *eLife* e55212
- [52] Naselli A, Vignolo M, Di Battista E, Papale V, Aicardi G, Becchetti S, Toma P. (1998) Trichorhinophalangeal syndrome type I in monozygotic twins discordant for hip pathology. Report on the morphological evolution of coneshaped epiphyses and the unusual pattern of skeletal maturation. *Pediatr Radiol* 28(11):851–855
- [53] Sohn YB, Ki CS, Park SW, Cho SY, Ko AR, Kwon MJ, Kim JY, Park HD, Kim OH, Jin DK. (2012) Clinical, biochemical, and genetic analysis of two korean patients with trichorhinophalangeal syndrome type I and growth hormone deficiency. *Ann Clin Lab Sci* 42(3):307–312
- [54] Stagi S, Bindi G, Galluzzi F, Lapi E, Salti R, Chiarelli F. (2008, 2009) Partial growth hormone deficiency and changed bone quality and mass in type I trichorhinophalangeal syndrome. *Am J Med Genet A*. 146A(12):1598–1604. Erratum in: *Am J Med Genet A* 149A (2): 296
- [55] Sarafoglou K, Moassesfar S, Miller BS. (2010) Improved growth and bone mineral density in type I trichorhinophalangeal syndrome in response to growth hormone therapy. *Clin Genet*. 78:591–593
- [56] Merjaneh I, Parks JS, Muir AB, Fadoju D. (2014) A novel TRPS1 gene mutation causing trichorhinophalangeal syndrome with growth hormone responsive short stature: a case report and

review of the literature. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2014(1): 16

[57] Hsu H, Siwiec RM. (2022) Patellar Tendon Rupture. *StatPearls* [Internet].

[58] Andrikoula S, Tokis A, Vasiliadis HS, Georgoulis A. (2006) The extensor mechanism of the knee joint: An anatomical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 14:214–220.

[59] Miller PR, Klein RM, Teitge RA. (1991) Medial dislocation of the patella. *Skeletal Radiol* 20(6):429-31

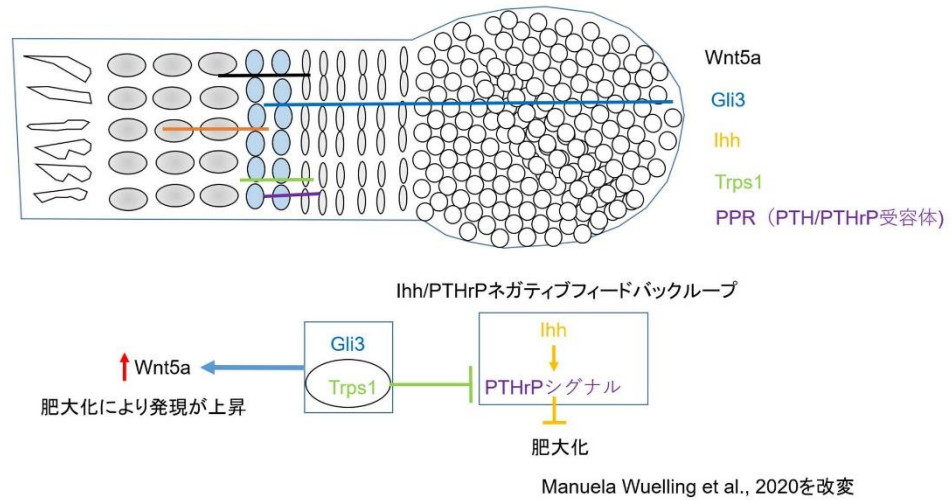
Table 1 :ジェノタイピングで使したプライマー

<i>Trps1-KO</i> で野生型判定のために使したプライマー	5'-TAG TAA AGC AGG CCG TGA AG-3' 5'-ACC CAA AGG TCA CTT ACT GG-3'
<i>Trps1-KO</i> でノックアウトマウスの判定のために使したプライマー	5'-CCA CAC ACT ATT TTC CAT GGG-3' 5'-CCC CTT CTA TCG CCT TCT TGA-3'
<i>Enh1</i> で野生型判定のために使したプライマー	5'-AAT CAG TGA AAA ATA TTT GAG-3' 5'-TGA GGT TGC TAT GGT TTT CTG-3'
<i>Enh1</i> で <i>Enh1</i> 欠失の判定のために使したプライマー	5'-TGA GGT TGC TAT GGT TTT CTG-3' 5'-TTG CCT GAT ACT GCA GAG T-3'
<i>Enh2</i> で野生型判定のために使したプライマー	5'-ACT CCC CCC AAT TCC TCT TTT CTC-3' 5'-GAC GGG TAT ACC AGG AGA GGA TG-3'
<i>Enh2</i> で <i>Enh2</i> 欠失の判定のために使したプライマー	5'-GCA AGC TCA TAC AAC TTG CCT GT-3' 5'-ACT CCC CCC AAT TCC TCT TTT CTC-3'
<i>Enh3</i> で野生型判定のために使したプライマー	5'-ACA CGA TGG AAG GTA GTC ATG GA-3' 5'-AGG ACT TCC ACT TGT ACG GAG C-3'
<i>Enh3</i> で <i>Enh3</i> 欠失の判定のために使したプライマー	5'-AGG ACT TCC ACT TGT ACG GAG C-3' 5'-ACA CGA TGG AAG GTA GTC ATG GA-3'
<i>Enh2/3</i> で野生型判定のために使したプライマー	5'-GAA AAT GGA CCC TGA GGC TTA TG-3 5'-AAA ATG CAA GCT TGG TTT GGT TT-3'
<i>Enh2/3</i> で <i>Enh2/3</i> 欠失の判定のために使したプライマー	5'-TAG TCA AGT CCA CAG GTG GGA AA-3' 5'-ATA GAA CAA GTG GCT CCC AGC TC-3'

Table 2: リアルタイム PCR で使用したプライマー

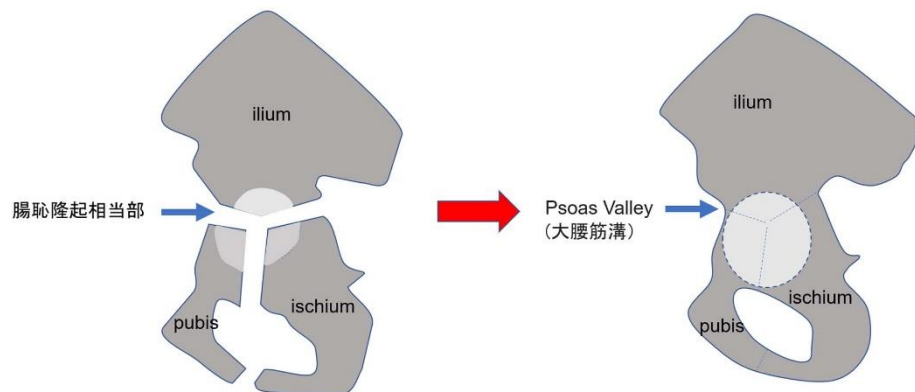
Trps1	5'-CAG CTC CCA AGA GCA GAC AAA-3' 5'-GTC AGG CAA TTG GCA CAA AAA-3'
Hprt1	5'-GCA GTA CAG CCC CAA AATGG-3' 5'-AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA-3'

A



B

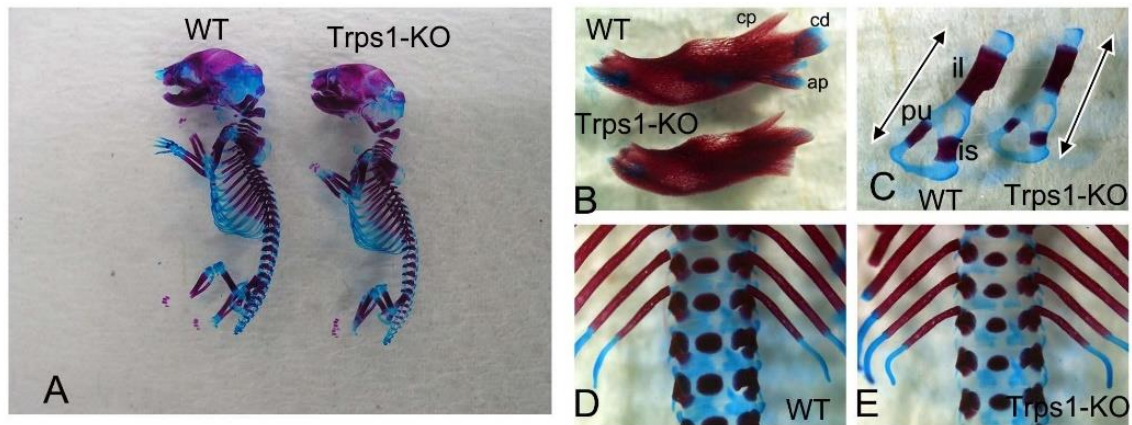
### 股関節の構成



**Fig. 1. 大腿骨骨端部での Trps1 に関連する遺伝子の発現と股関節の構造**

(A) 大腿骨骨端部における Trps1 と関連する遺伝子の発現部位と関係性の模式図。

(B) 股関節の寛骨は ilium (腸骨)、pubis (恥骨)、ischium (座骨) の 3 つの骨から構成されており、成熟すると癒合部分が骨化して 1 つの集合体 (寛骨) となる。腸骨と恥骨の癒合部分の外側面で大腰筋が走行する部分の溝 (右図青矢印) を大腰筋溝 (psoas valley) と呼ぶ。



**Fig. 2. *Trps1*-KO の骨格染色像**

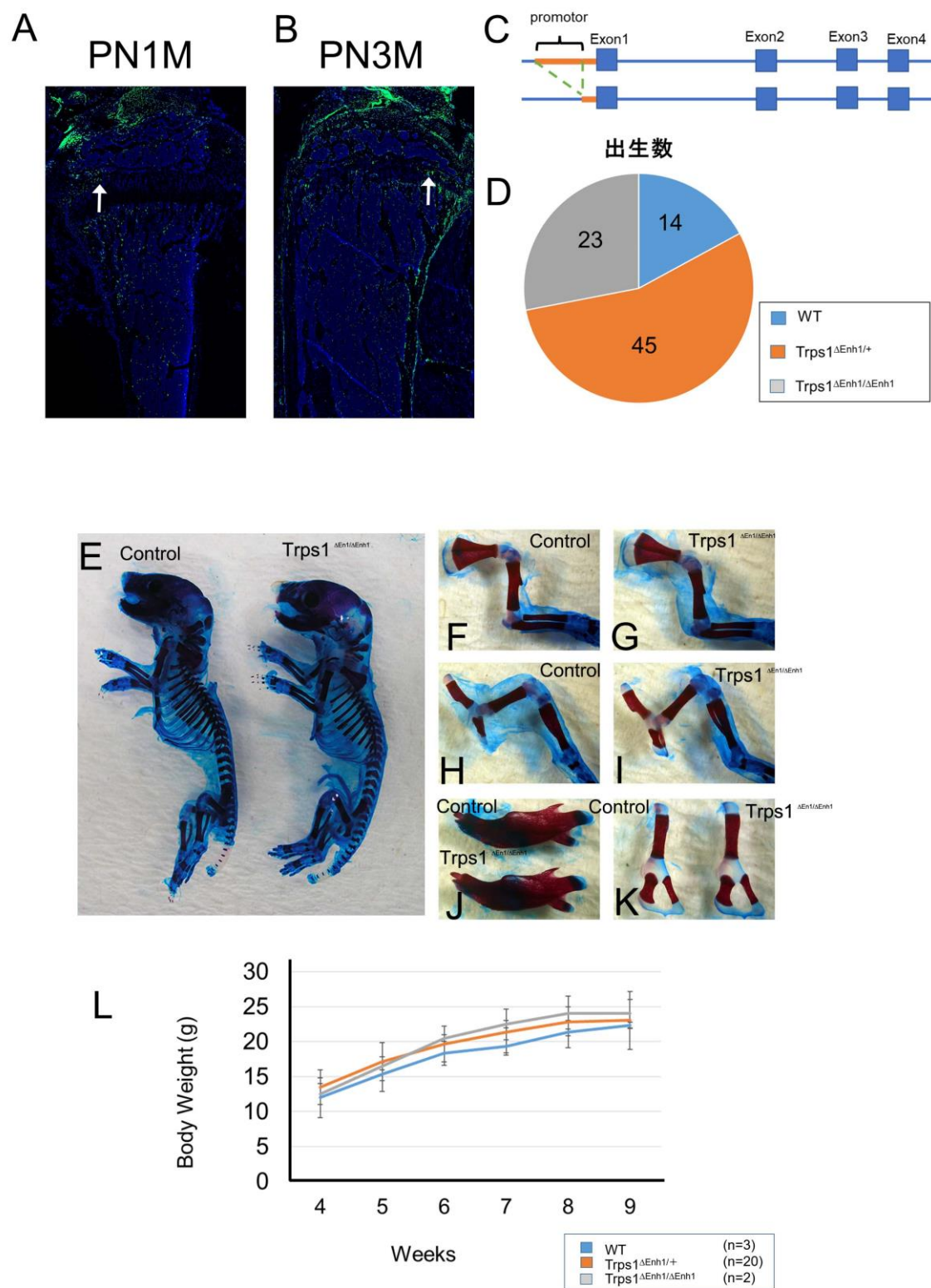
(A) 野生型 (WT) と *Trps1*-KO マウスの全身骨格染色像。

(B) 下顎骨の外側面観。

(C) 寛骨の内側面観。

(D, E) 野生型 (D) と *Trps1*-KO マウス (E) の椎骨腹側観。

ap : 下顎角 ; cd : 下顎頭 ; cp : 筋突起 ; il : 腸骨 ; is : 坐骨 ; pu : 恥骨



**Fig. 3. *Trps1* 転写開始部位上流配列 (Enh1) の欠失がマウス個体に与える影響の検討**

(A, B) *Trps1-Cre* 活性マウスの生後 1 か月 (左) と 3 か月 (右) の大腿骨骨端での Cre 活



性の確認。*Trps1-Cre* マウスと ZsGreen 蛍光 Cre レポーターマウスを交配し、得られたダブルトランスジェニックマウスの下肢を解析に用いた。白矢印は成長板での Cre 活性を示す。

(C)  $\Delta$ Enh1 マウス作製のためのゲノム削除部分の模式図。最小プロモーター (約 0.7 kb) を残して転写開始部位より上流の約 4 kb を削除。

(D) Enh1 のヘテロ接合マウス (*Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/+</sup>) どうしを交配させた際に出生した野生型 (WT)、ヘテロ接合型、ホモ KO の各遺伝子型マウスの匹数を示す。

(E) 胎生 17.5 日齢の野生型 (Control) と *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/ $\Delta$ Enh1</sup> マウスの全身骨格染色像。

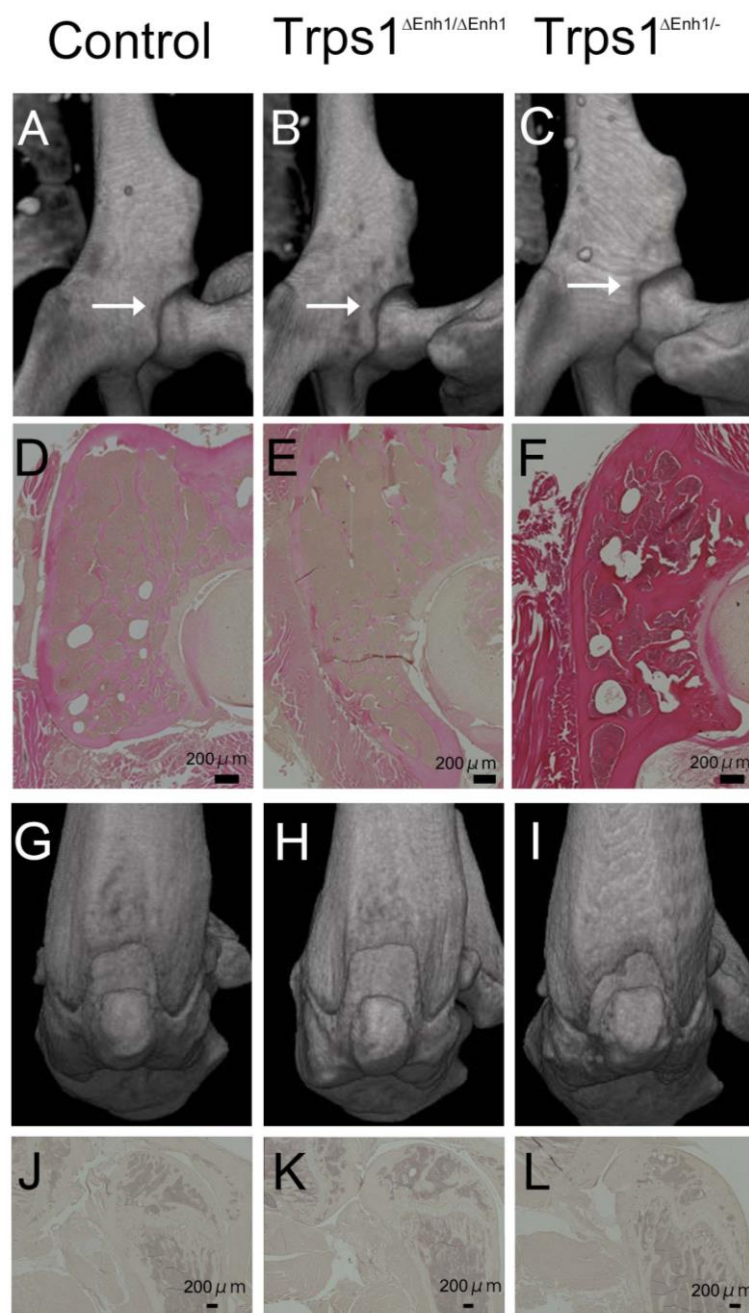
(F, G) 野生型 (F) と *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/ $\Delta$ Enh1</sup> (G) マウスの上肢骨格染色像。

(H, I) 野生型 (H) と *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/ $\Delta$ Enh1</sup> (I) マウスの下肢骨格染色像。

(J) 野生型 (Control) と *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/ $\Delta$ Enh1</sup> マウスの下顎骨骨格染色像外側面観。

(K) 野生型 (Control) と *Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/ $\Delta$ Enh1</sup> マウスの寛骨骨格染色像内側面観。

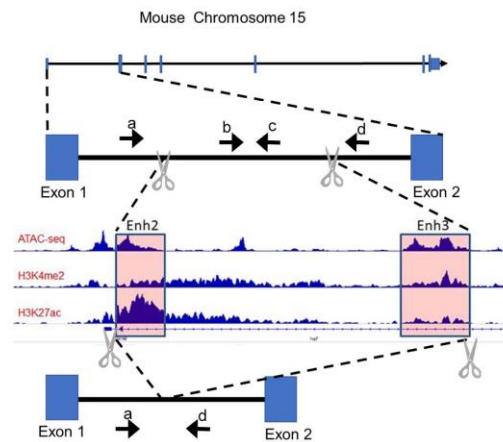
(L) コントロール、Enh1 のヘテロ接合マウス (*Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/+</sup>) とホモ KO マウス (*Trps1* <sup>$\Delta$ Enh1/ $\Delta$ Enh1</sup>) の生後 4 週目から 9 週目までの体重変化。



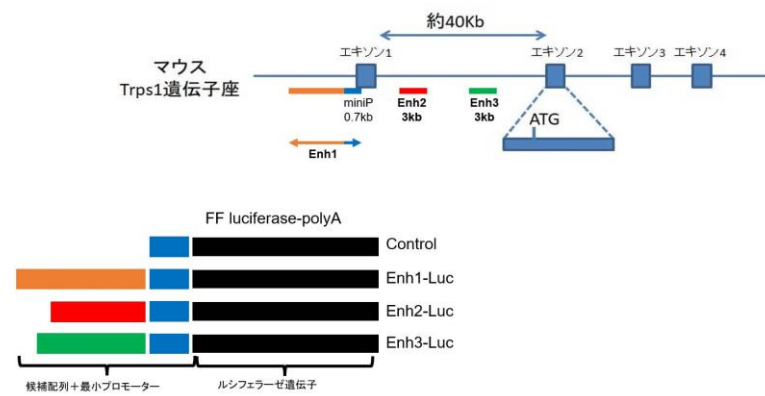
**Fig. 4.3** か月齢 *Trps1*-Enh1 変異マウスの股関節と膝関節部の解析

コントロール (A, D, G, J)、*Trps1*<sup>ΔEnh1/ΔEnh1</sup> (B, E, H, K) と *Trps1*<sup>ΔEnh1/-</sup>マウス (片アリルは ΔEnh1、もう一方のアリルで *Trps1* 遺伝子を欠失させたもの ; C, F, I, L) の股関節正面観 (A, D, B, E, C, F) と大腿骨骨端正面観および矢状断 (G, J, H, K, I, L) のマイクロ CT 像と HE 染色像。白矢印は Psoas valley を示す。

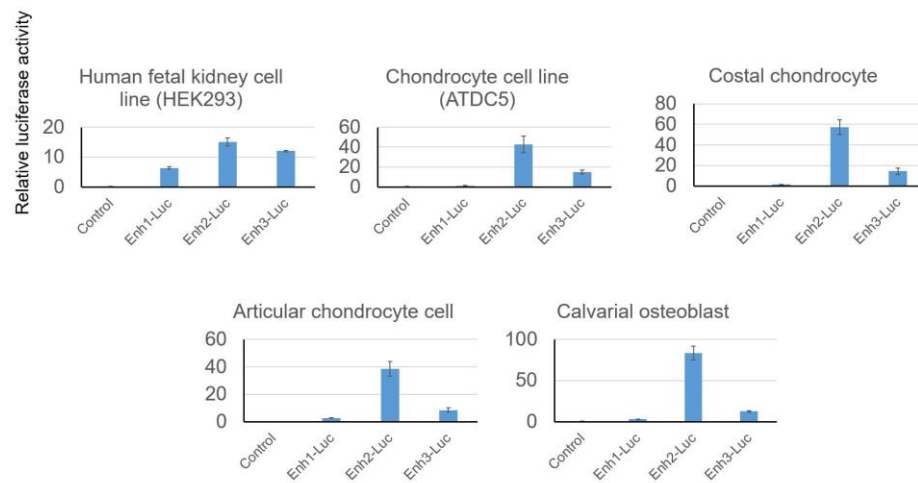
A



B



C

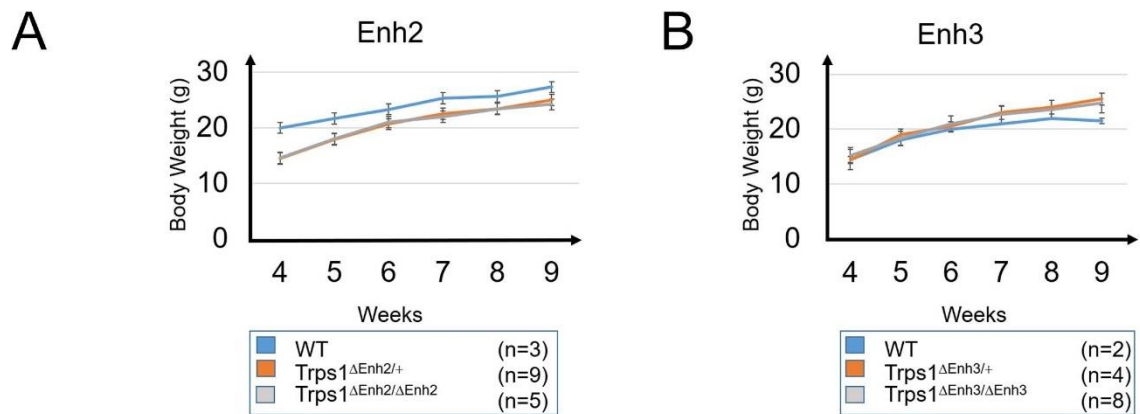


**Fig. 5. *Trps1* 転写制御候補領域の検討**

(A) マウス肋軟骨細胞の *Trps1* 遺伝子領域における ATAC-seq および ChIP-seq (H3K4me2、H3K27ac) のピークデータを示す。*Trps1* 遺伝子の第一イントロン内に、ATAC-seq、H3K4me2 ChIP-seq、H3K27ac ChIP-seq のピークが重複する領域が 2 か所検出され、それぞれを *Trps1* enhancer 2 (Enh2)、*Trps1* enhancer 3 (Enh3) 転写制御候補領域とした。野生型 (b, c)、 $\Delta$ Enh2/3 (a, d) のジェノタイピング時に使用したプライマーの設計を a-d で示す。

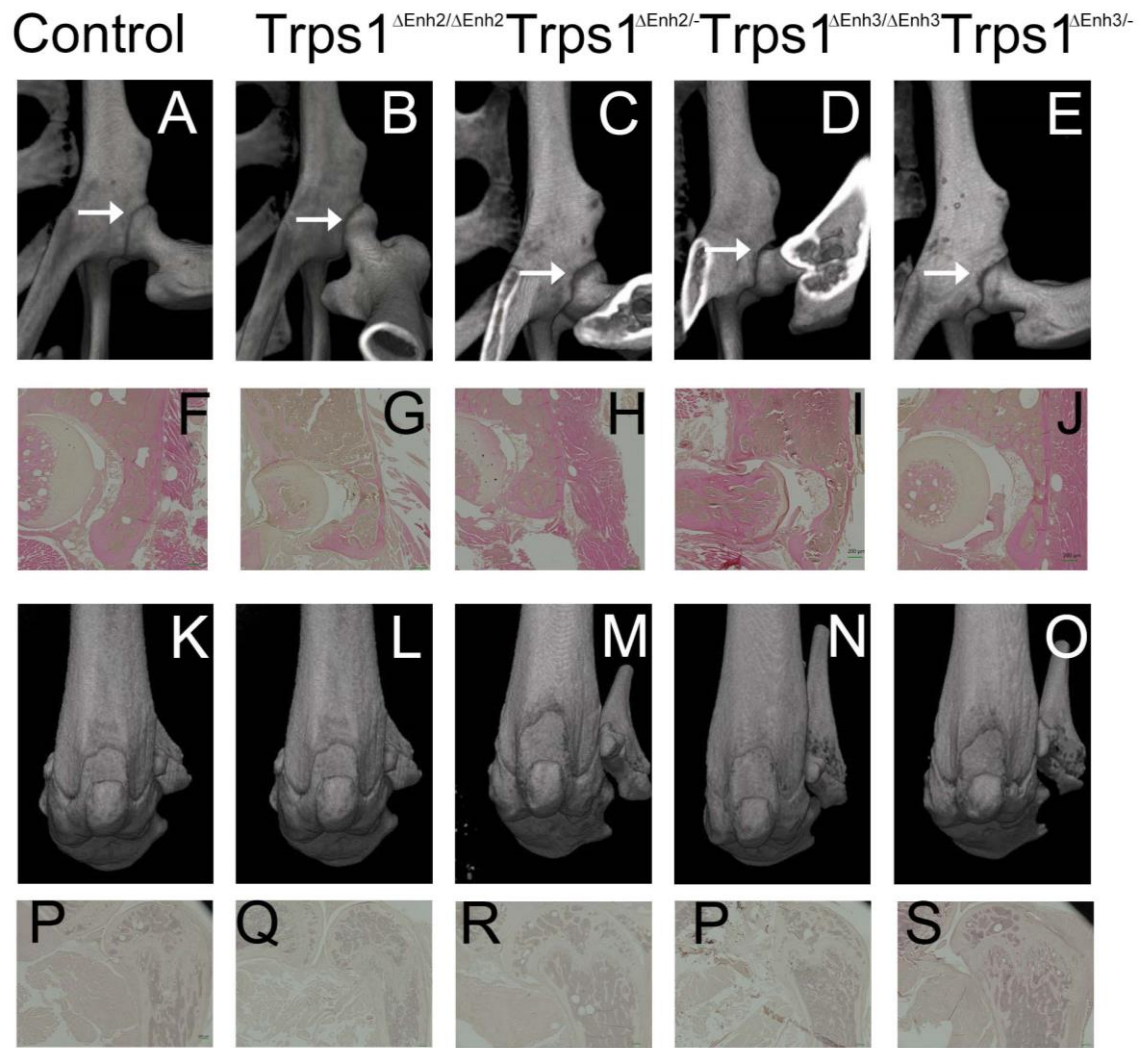
(B) ルシフェラーゼアッセイによる *Trps1* 転写制御候補領域の転写活性の検討。使用したレポーターコンストラクトの概略図を示す。最小プロモーターのみ (Control)、最小プロモーター+Enh1 (Enh1-Luc ; 黄色)、最小プロモーター+Enh2 (Enh2-Luc ; 赤色)、最小プロモーター+Enh3 (Enh3-Luc ; 緑) によってホタルルシフェラーゼ遺伝子 (FF ; Firefly) の発現が制御されるレポーターコンストラクトを作製した。

(C) ヒト胎児腎細胞株 (HEK293)、軟骨様細胞株 (ATDC5)、初代肋軟骨細胞 (Costal chondrocyte)、初代膝軟骨細胞 (Articular chondrocyte)、初代頭蓋冠骨芽細胞 (Calvarial osteoblast) に B で示したホタルルシフェラーゼベクターと導入効率標準化用ベクターを遺伝子導入した。Dual Luciferase Assay Kit (Promega) を用いたルシフェラーゼアッセイの結果を示す。



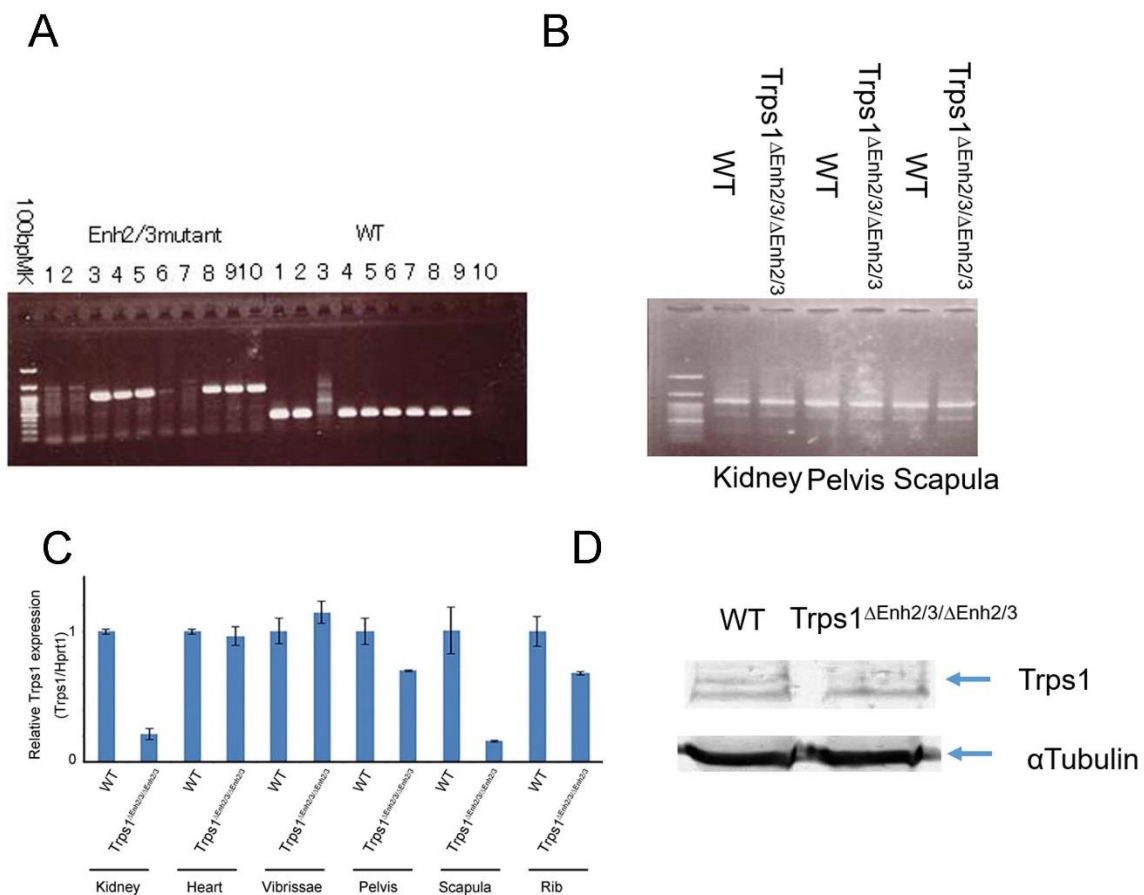
**Fig. 6. Enh2 および Enh3 を個々に欠失させたマウスの体重変化**

(A, B) コントロール、Enh2 ヘテロ接合マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/+</sup>) とホモ KO マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>)、Enh3 ヘテロ接合マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh3/+</sup>) とホモ KO マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>) の生後 4 週目から 9 週目までの体重変化。



**Fig. 7. Enh2 および Enh3 を個々に欠失させた生後 3 か月齢マウスの解析**

コントロール (A, F, K, P)、Enh2 ホモ KO マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2ΔEnh2</sup>; B, G, L, Q)、Enh2 ヘテロ欠失; *Trps1* ヘテロ欠失マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/-</sup>; C, H, M, R)、Enh3 ホモ欠失マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh3ΔEnh3</sup>; D, I, N, P)、Enh3 ヘテロ欠失; *Trps1* ヘテロ欠失マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh3/-</sup>; E, J, O, S) の股関節 (A-J) と大腿骨遠位端 (K-S) のマイクロ CT 像と HE 染色像。白矢印は Psoas valley を示す。



**Fig. 8. Enh2、Enh3 を同時に欠失させたマウスの作出 (Trps1Enh2/3-KO ; ストラテジーは Fig. 5 (A) を参照)**

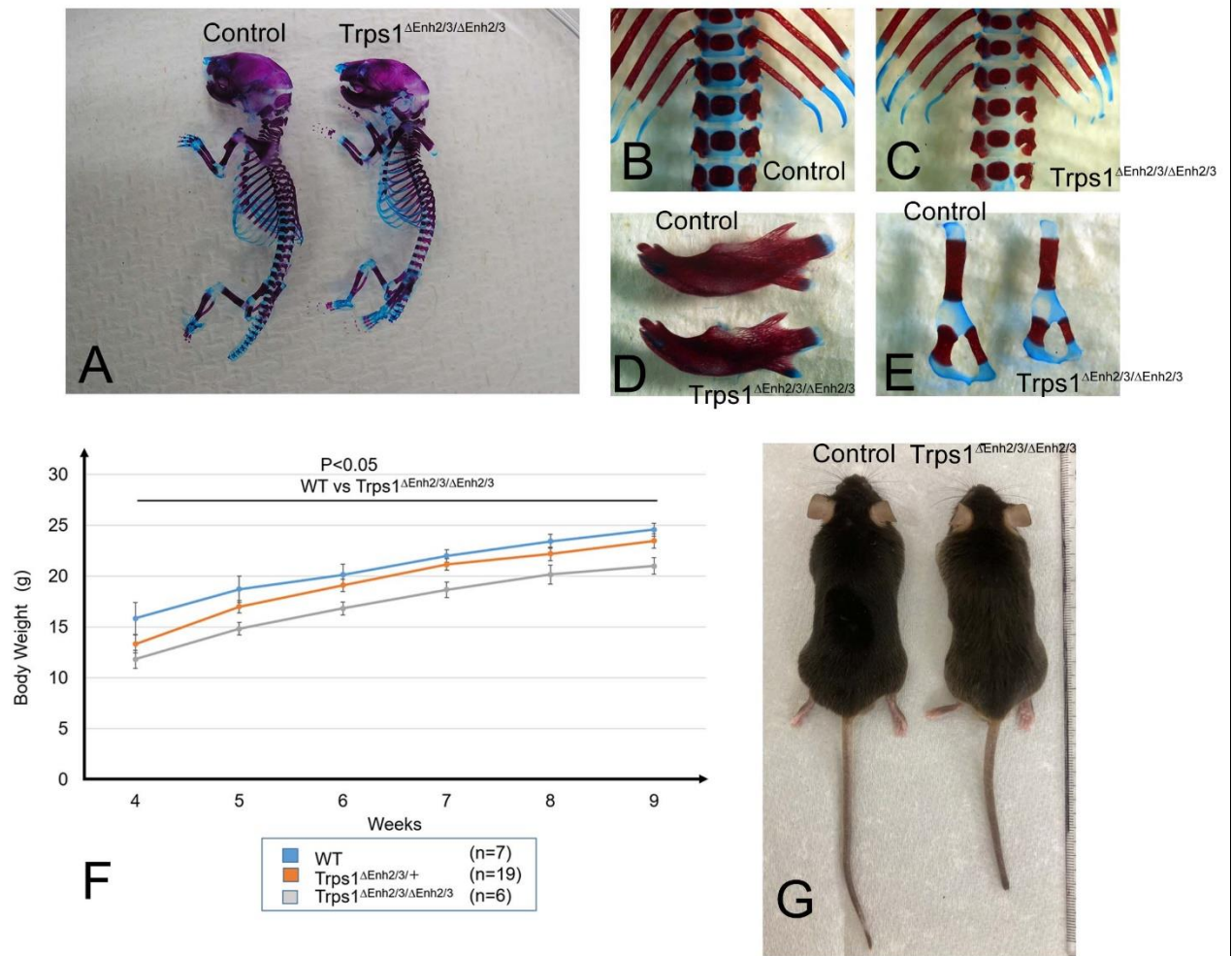
(A) ジェノタイプング PCR による Enh2/3 の欠失の判定。同腹仔 10 匹の遺伝子型判定結果を例として示す。変異型遺伝子型判定用プライマーの設計は、ゲノム編集により削除される遺伝子領域をはさむように設計した (図 5A にプライマー a および d と記載)。削除されていないアレルでは 20 kb 以上プライマーの位置が離れているため、通常の伸長反応では増幅されない。一方、変異型アレルはプライマー間の距離が約 1 kb と近接し、バンドの増幅がみられる。野生型アレルの有無は 3 種類のプライマーペアで確認した。すなわち、5'側と 3'側それぞれでゲノム編集により削除される部位をはさむように増幅用プライマーを設計 (図 5A には記載せず)、もしくは削除される配列内に増幅用プライマー (図 5A にプライマー b および c と記載) を設計した。左側のレーン 1~10 は Enh2/3 ミュータントプライマーで増幅させたとき、欠失アレルで約 1 kb の断片が増幅される。右側レーン 1~10 は野生型アレル確認用プライマーを用いた反応で約 300 bp の断片が増幅される。

(B) 野生型マウスと Enh2/3 欠失マウスから採取した腎臓 (左 2 レーン)、寛骨 (中央 2 レーン)、肩甲骨 (右 2 レーン) から調整した total RNA を用いて RT-PCR を行い、Trps1 mRNA を確認。プライマーはエキソン 1 とエキソン 2 にフォワードとリバースプライマーが位置するように設計した。

(C) 生後すぐのマウスより腎臓、心臓、毛包（鼻震毛）、寛骨、肩甲骨、肋軟骨を採取し、各組織より total RNA を調整し、*Trps1* 遺伝子発現レベルを RT-qPCR で確認した。レファレンス遺伝子は *Hprt1* を用い、 $\Delta\Delta Ct$  法にて相対発現量を算出した。

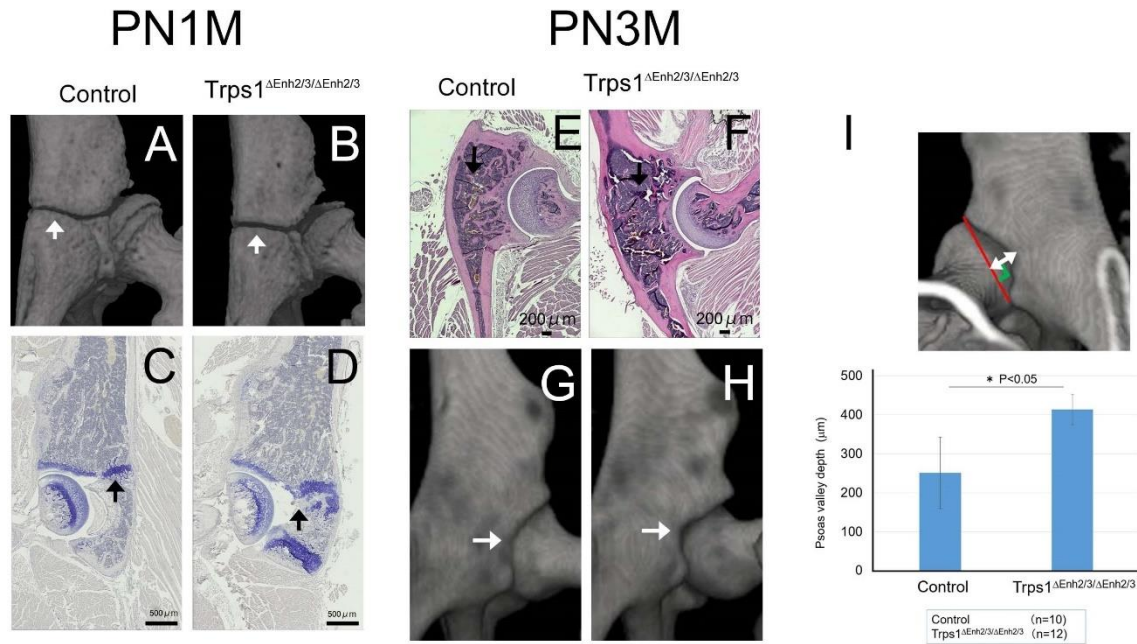
(D) 野生型マウスと *Enh2/3-KO* マウスから調整した膝関節軟骨細胞を培養しコンフルエントになった細胞からライセートを調整し、ウェスタンブロットにて *Trps1* および  $\alpha$ Tubulin を検出した。





**Fig. 9. *Trps1* Enh2/3-KO (*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>) マウスの解析**

- (A) 野生型 (Control) と *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> マウスの全身骨格染色像。
- (B, C) 野生型 (B) と *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> (C) マウスの椎骨骨格染色像。
- (D) 野生型 (Control) と *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> マウスの下顎骨骨格染色像。
- (E) 野生型 (Control) と *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> マウスの寛骨骨格染色像内側面観。
- (F) コントロール、Enh2/3 のヘテロ接合マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/+</sup>) と Enh2/3 のホモ KO マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>) の生後 4 週目から 9 週目までの体重変化。
- (G) 生後 10 週目での体格差を示す。

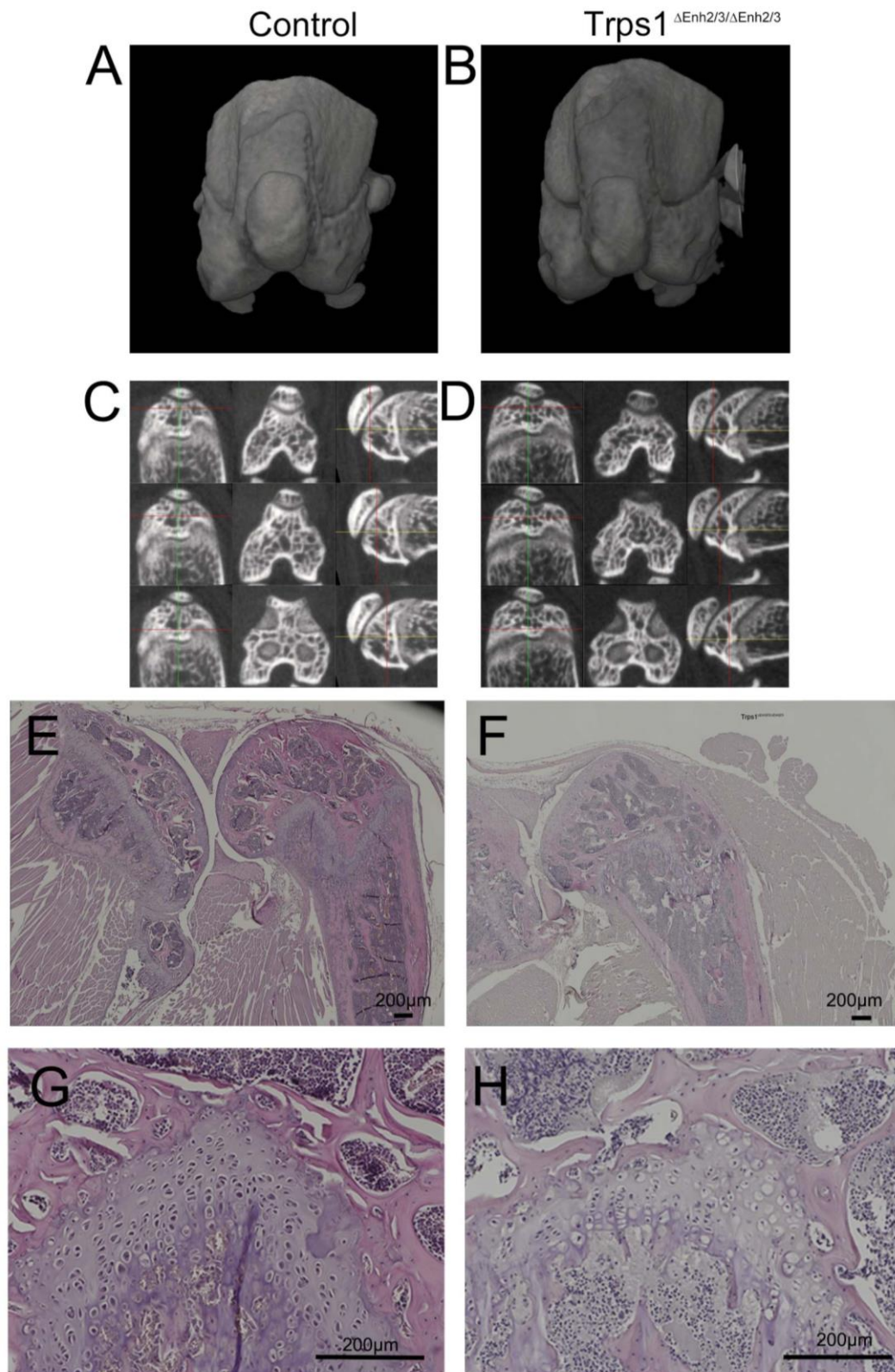


**Fig. 10. *Trps1* $\Delta$ Enh2/3-KO マウスの股関節の解析**

(A-H) 生後 1 か月 (A-D) と 3 か月 (E-F) のコントロールと *Enh2/3* のホモ KO マウス (*Trps1* $\Delta$ Enh2/3) の股関節のマイクロ CT 像(A, B, G, H)、トルイジンブルー染色像 (C, D)、HE 染色像 (E, F)。白黒矢印は腸恥隆起部から Psoas valley を示す。

(I) Psoas valley depth の測定部位 (上図の白矢印) と測定結果 (下)。

# PN3M

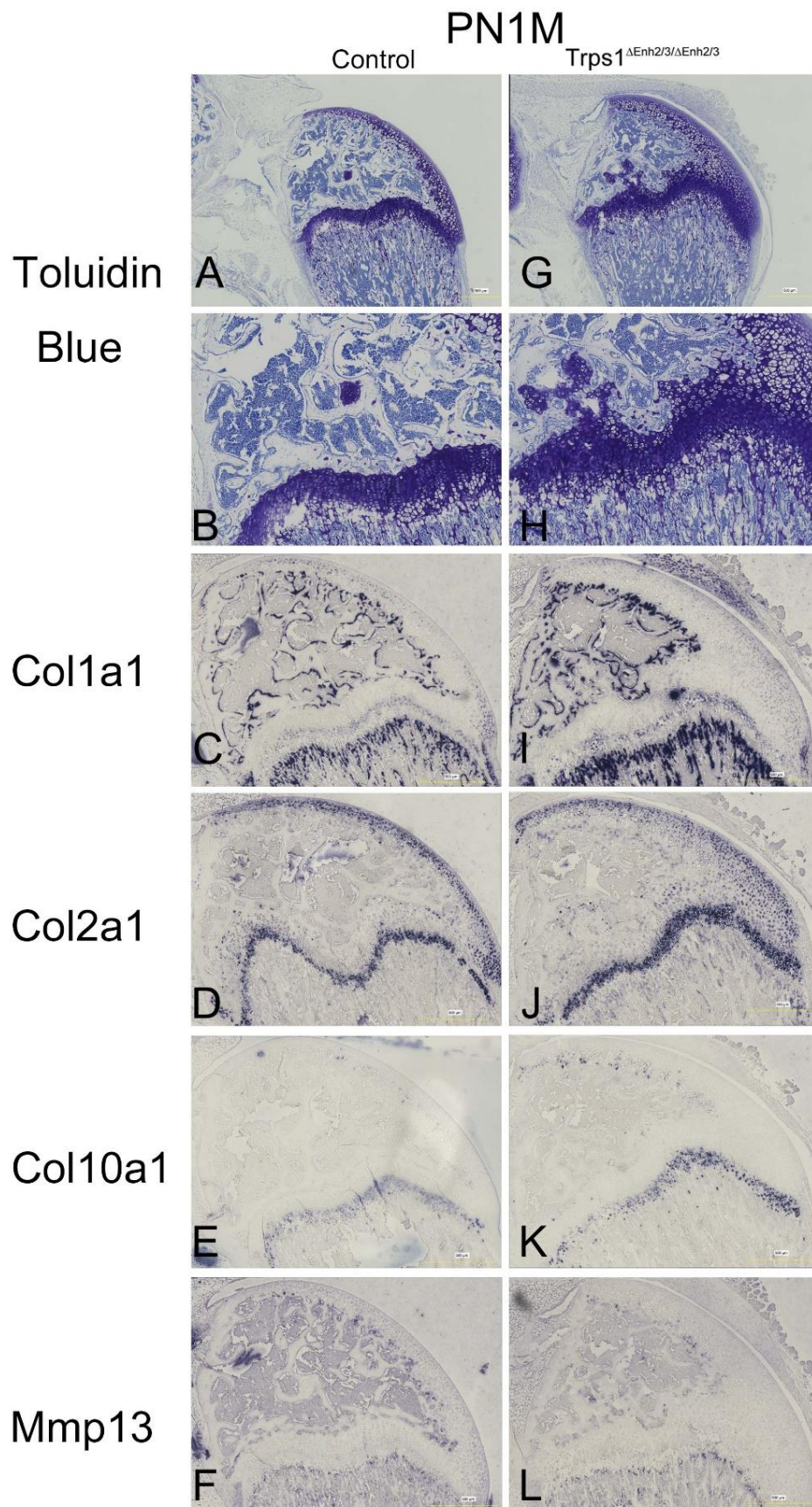


**Fig. 11. 生後 3 か月 齢 *Trps1* Enh2/3-KO マウスの大腿骨の解析**

(A-D) コントロール (A, C) と Enh2/3 のホモ KO マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>; B, D) の大腿骨遠位端のマイクロ CT 像。C および D は膝蓋骨を含む断層画像を示す。

(E-H) コントロール (E, G) と Enh2/3 のホモ KO マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>; F, H) の大腿骨遠位端の HE 染色像。G、H は E、F それぞれの成長板軟骨部の拡大像を示す。

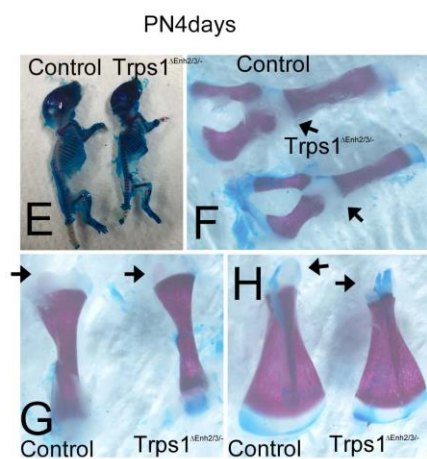
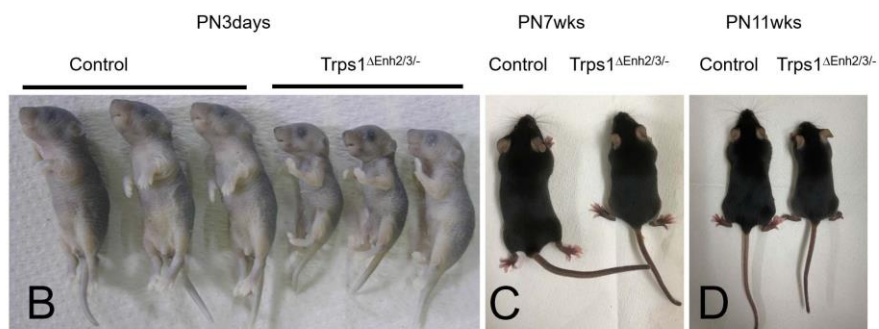
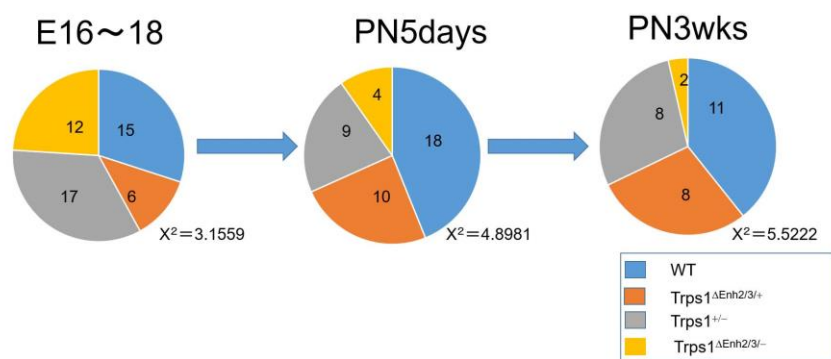




**Fig. 12. 生後 1 か月 齢の *Trps1* Enh2/3-KO マウスの大腿骨の解析**

コントロールと Enh2/3 のホモ KO マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup>) の大腿骨遠位部のトルイジンブルー染色像 (A, B, G, H) と *Colla1* (C, I)、*Col2a1* (D, J)、*Coll0a1* (E, K)、*Mmp13* (F, L) の in situ hybridization 染色像。

A



**Fig. 13. Enh2/3 ヘテロ欠失 ; Trps1 ヘテロ欠失 ( $Trps1^{\Delta Enh2/3/-}$ ) マウスの解析**

(A)  $Trps1^{\Delta Enh2/3/+}$  と  $Trps1^{+/-}$  の交配により生まれたマウスの胎生期、生後 5 日、生後 3 週間での生存匹数。

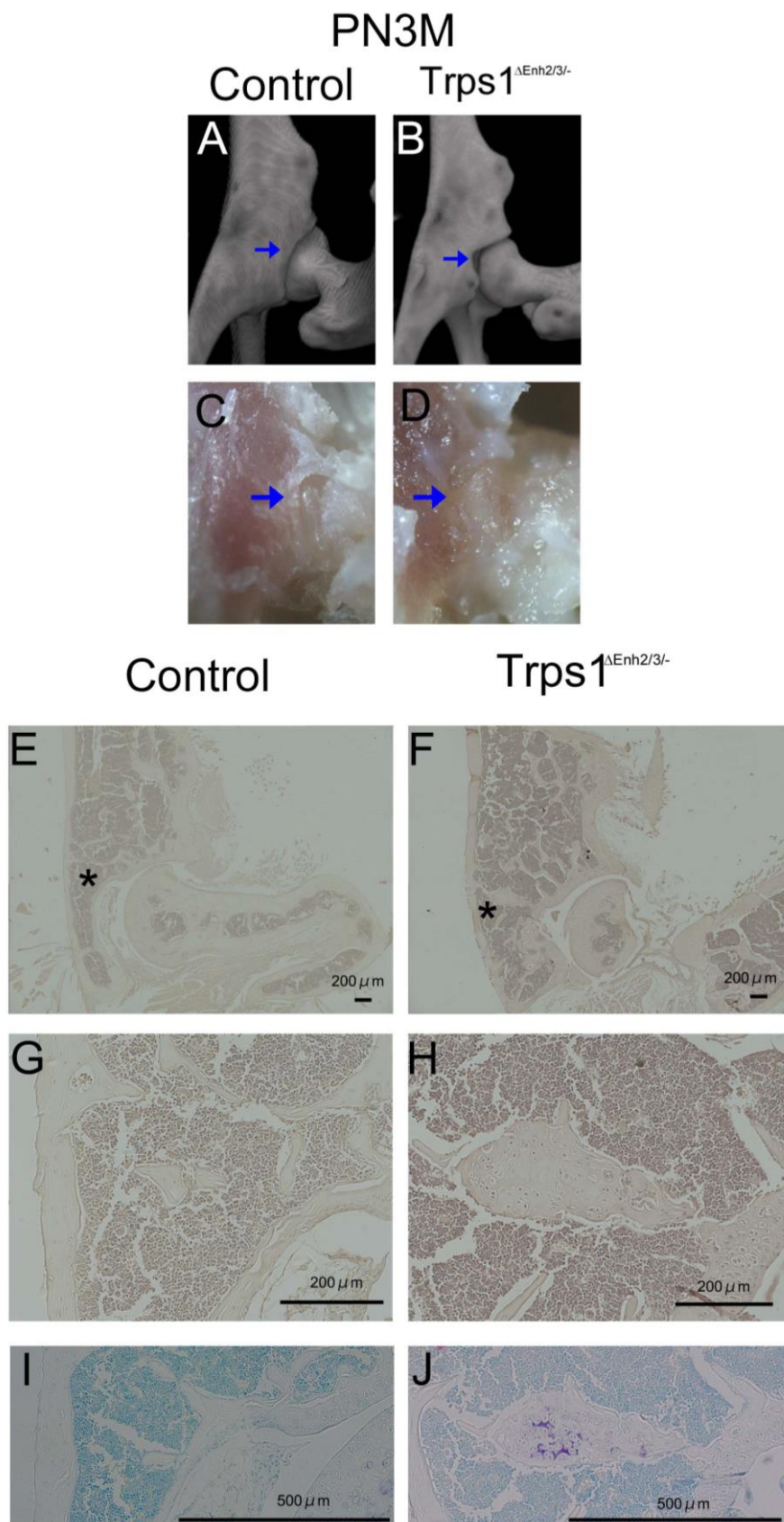
(B) 生後 3 日齢同腹仔の全身像。画像の全てのマウス新生仔は生存している状態である。

(C) 生後 7 週の全身像。

(D) 生後 11 週の全身像。

(E-H) 生後 4 加齢の野生型 (Control) と  $Trps1^{\Delta Enh2/3/-}$  マウスの骨格染色像。全身骨格 (E)、寛骨 (F)、上腕骨 (G)、肩甲骨 (H) の染色像を示す。黒矢印は二次骨化中心形成予定領域を示す。

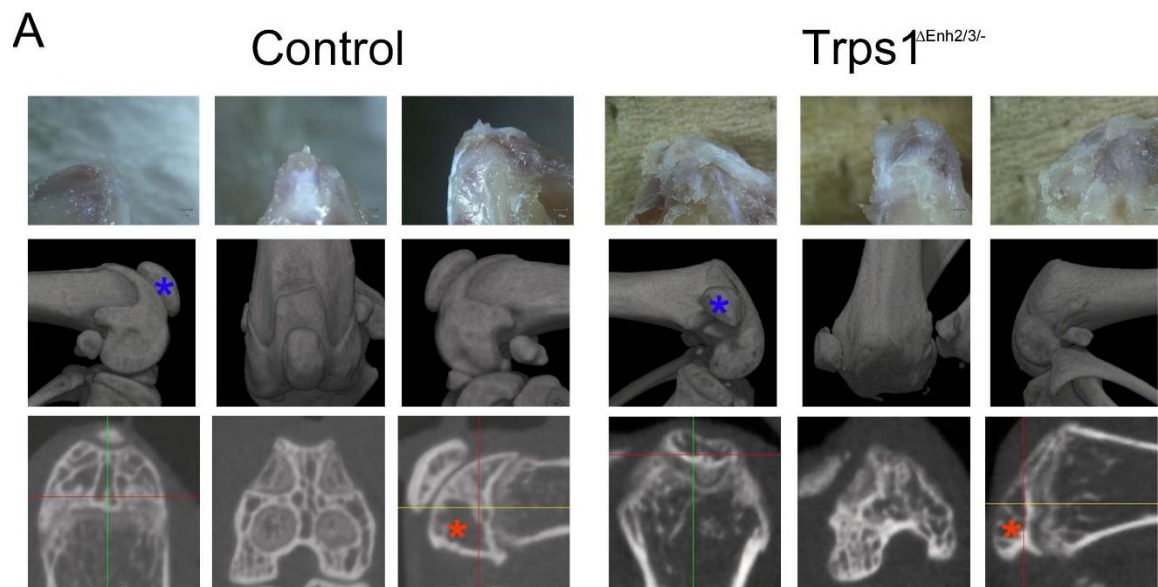




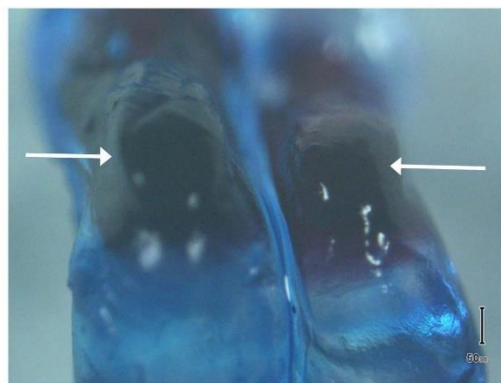
**Fig. 14. Enh2/3 ヘテロ欠失 ; Trps1 ヘテロ欠失マウス ( $Trps1^{\Delta Enh2/3/-}$ ) の股関節の解析**

(A-D) 生後 3 か月齢の野生型 (Control) と  $Trps1^{\Delta Enh2/3/-}$  (B, D) マウスの股関節マイクロ CT 像 (A, B) と組織解剖写真 (C, D)。青矢印は psoas valley に相当する部位を示す。

(E-J) 生後 3 か月齢野生型 (E, G, I) と  $Trps1^{\Delta Enh2/3/-}$  (F, H, J) マウスの股関節腸恥隆起相当部の HE 染色像 (E-H) とトリイジンブルー染色像 (I, J)。G, H は E, F の\*部分の拡大画像を示す。



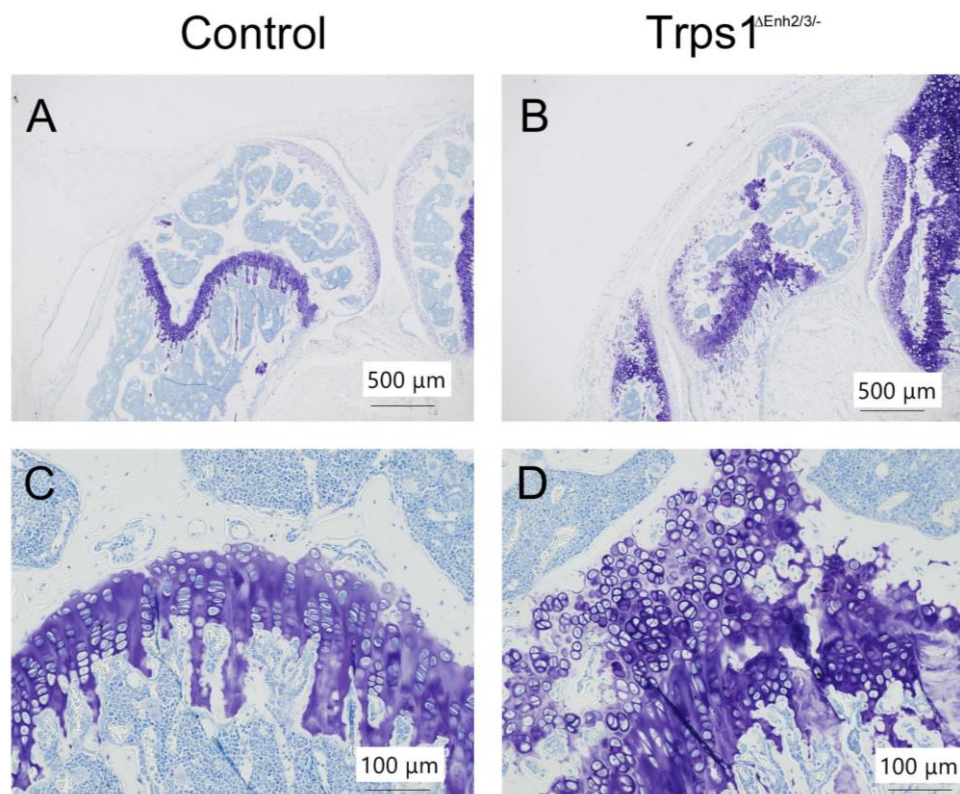
**B**      Control       $Trps1^{\Delta Enh2/3/-}$



**Fig. 15. *Enh2/3* ヘテロ欠失 ; *Trps1* ヘテロ欠失マウス ( $Trps1^{\Delta Enh2/3/-}$ ) の大腿骨の解析**

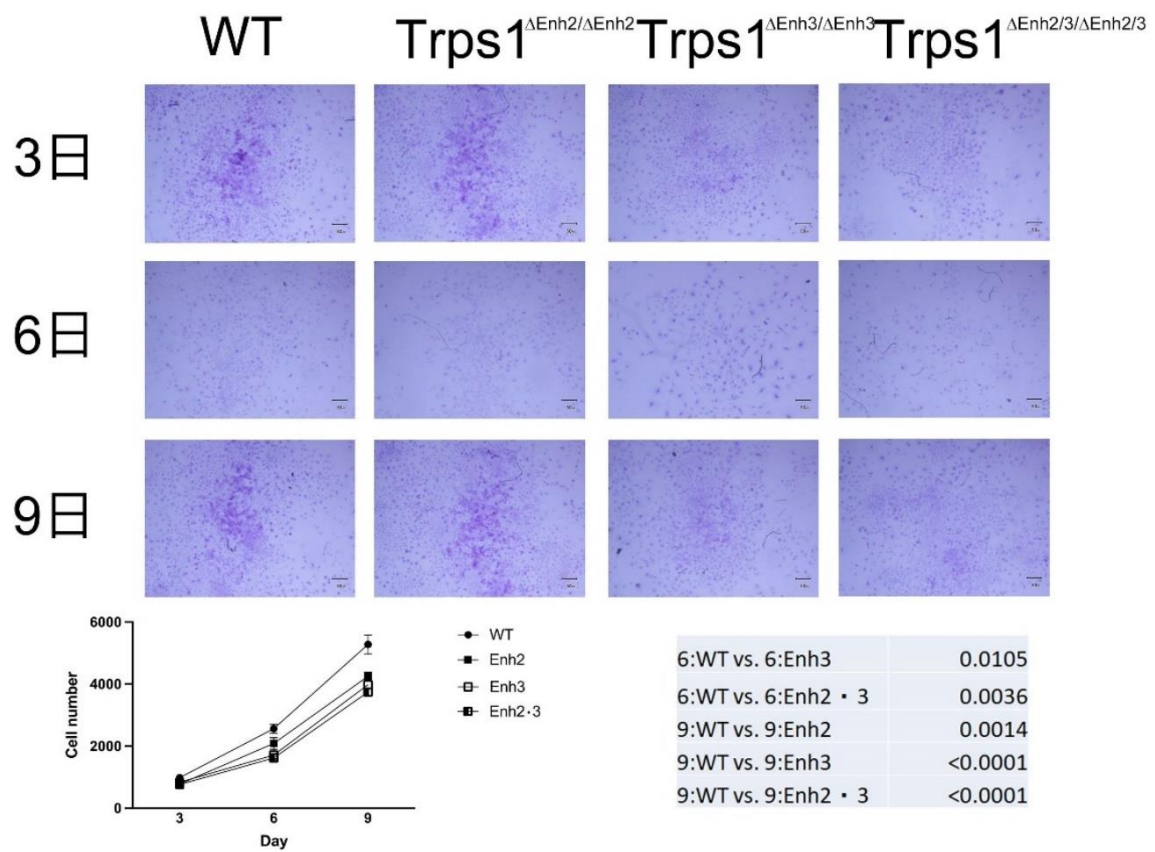
(A) 生後 3 か月齢の野生型 (Control) と  $Trps1^{\Delta Enh2/3/-}$  マウスの大腿骨遠位骨端部の組織解剖写真 (上段) とマイクロ CT 像 (下 2 段)。青\*は膝蓋骨、赤\*は骨端海綿骨を示す。

(B) 出生直後の大腿骨骨端部の骨格染色像。前面の濃染色分 (白矢印) が膝蓋骨を示す。



**Fig. 16** 生後 3 か月齢の *Enh2/3* ヘテロ欠失 ; *Trps1* ヘテロ欠失マウス (*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup>) の大腿骨の解析

生後 3 か月の野生型 (Control ; A, C) と *Trps1*<sup>ΔEnh2/3/-</sup> (B, D) マウスの大腿骨遠位骨端部のトルイジンブルー染色像。C、D は A、B それぞれの軟骨成長板領域の拡大図を示す。



**Fig. 17. 培養軟骨細胞増殖アッセイ**

野生型 (WT)、*Trps1*<sup>ΔEnh2/ΔEnh2</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh3/ΔEnh3</sup>、*Trps1*<sup>ΔEnh2/3/ΔEnh2/3</sup> の新生仔マウス膝軟骨より軟骨細胞を回収し、培養 3 日目、6 日目、9 日目で全細胞数を計測した結果を示す。