

論文の内容の要旨

論文題目 「TRAF6 遺伝子欠損マウスを用いた TRAF6 生理機能の解析」

氏名 内藤 明日香

TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)は TNF 受容体スーパーファミリーの CD40 に会合する分子として当研究部で同定されされたアダプター蛋白質であり、現在では IL-1R /TLR ファミリーからのシグナル伝達にも関与することが知られている。N 末端側から RING finger、zinc finger、coiled-coil モチーフを持ち、C 末端には TRAF-C と呼ばれる TRAF ファミリー蛋白質間で保存された領域を有する。TRAF6 を培養細胞に過剰発現させると AP-1 や NF κ B といった転写因子の活性化が起こることから、TRAF6 は免疫応答や炎症反応の場面において細胞の刺激応答を制御する分子であると考えられてきた。しかしながら培養細胞を用いた解析は生理的条件の再現、個体機能の検証という点で限界がある。そこで本研究では遺伝子欠損マウスを用いることにより、TRAF6 の生理機能を個体レベルで検討することを目的とした。

TRAF6 遺伝子欠損マウスの作製 TRAF6 の遺伝子破壊は、下流へのシグナル伝達に重要と考えられる RING finger の一部を含むエクソンと、ネオマイシン耐性遺伝子との置換により行われた。TRAF6 遺伝子型ヘテロマウスは正常に発育し繁殖した。これらマウスの掛け合わせにより TRAF6 欠損マウスを得た。TRAF6 遺伝子の破壊をゲノム DNA のサザンブロットィングで確認し、ウェスタンブロットィングにより TRAF6 遺伝子産物が完全長、変異体

のどちらの形でも発現していないことを確認した。

TRAF6 欠損マウスは一部胎生致死でありその原因は脳神経発生の異常であると考えられた。出生した個体も徐々に発育障害を示し、生後 3 週間以内に死亡した。また、免疫系の異常としてリンパ節の欠損、B220⁺/IgM⁺の未熟 B 細胞分化異常を示した。加えて、TRAF6 欠損マウスは骨形成、体毛の発生に異常を示し、その分子メカニズムを明らかにするため、つぎに詳細な解析を行った。

大理石骨病 TRAF6 欠損マウスでは切歯萌出が見られないことから硬骨化の異常亢進を示す、大理石骨病が疑われたが、X 線断層画像 (図 1) および骨組織切片から海綿骨の異常造成が確認された。硬骨化亢進の原因としては破骨細胞の機能障害あるいは骨芽細胞の機能亢進が考えられる。そこで骨組織切片を破骨細胞マーカーである TRAP で染色すると、TRAF6 欠損マウスでは破骨細胞が観察されなかった。従って大理石骨病の原因は破骨細胞の分化障害であると考えられた。破骨細胞の分化成熟には骨芽細胞による誘導シグナルが必要であることから、新生仔頭蓋冠由来骨芽細胞と破骨細胞プロジェニターを含む脾臓細胞を用いて、共存培養法による破骨細胞の誘導実験を行った。その結果、TRAF6 欠損マウスの骨芽細胞は野性型脾臓細胞の分化を誘導することができるのに対し、TRAF6 遺伝子欠損脾臓細胞は野性型骨芽細胞の分化誘導に応答できないことが分かった。さらに、骨芽細胞由来の破骨細胞誘導因子 RANK ligand (RANKL) と M-CSF の共刺激による破骨細胞の誘導系でも遺伝子欠損マウスの脾臓細胞は分化しなかった。一方 M-CSF 刺激のみでは野生型と同程度のマクロファージが誘導されたことから、TRAF6 欠損マウスでは RANKL 刺激応答性が失われているものと考えられる。

近年、RANKL 受容体で TNFR スーパーファミリーのメンバーである RANK に TRAF6 が会合し、転写因子 NF κ B の活性化を引き起こすことが報告された。NF κ B はサブユニットの p50/p52 のダブルロックアウトマウスで、破骨細胞が分化出来ず大理石骨病になることが知られている。これらの事実より TRAF6 欠損マウスでは RANK シグナルが遮断され NF κ B の活性化がおこらないため、破骨細胞が分化出来ず大理石骨病に至ると考えられる。

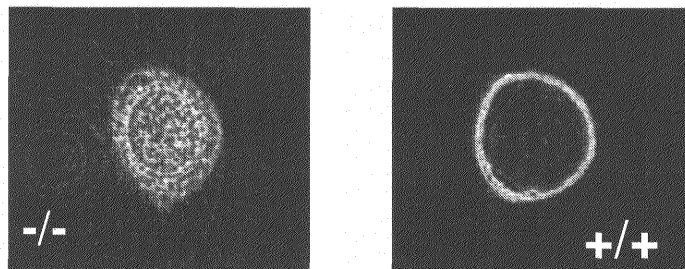


図 1. TRAF6 遺伝子欠損マウスと野生型マウス脛骨骨幹部の X 線断層画像。

無汗性外胚葉形成不全症 TRAF6 欠損マウスは、外胚葉形成不全症 (Hypohidrotic ectodermal dysplasia, HED) のモデルマウスである downles (dl)、tabby (ta)、crinkled (cr) と酷似した耳の裏、尾の体毛欠損を示す。HED は毛包、汗腺、歯の形成不全を伴う遺伝性疾患で、ヒトでは X 染色体遺伝型と常染色体遺伝型が知られている。

TRAF6 欠損マウスの表現型と HED との類似性を確認するため、毛包の組織学的な観察を行った。生後 11 日の TRAF6 ヘテロおよび遺伝子欠損マウスの尾部組織切片を観察した所、TRAF6 欠損マウスでは完全に毛包が欠失していた (図 2)。一方 TRAF6 欠損マウスの背部皮膚組織切片においては、太い毛包のみが欠損していた。マウスの体毛は、形態と発生時期の違いにより guard hair、awl、auchen、zigzag の 4 種類に分類される。dl、ta、cr マウスでは、guard hair、zigzag の体毛が欠損しており、残った awl の形態も異常である事が知られている。一方 TRAF6 欠損マウスでは、その表現型から guard hair の発生に異常を来していると考えられる。そこで、発生時期に遡って guard hair 分子マーカーの β -カテニン、MAdCAM-1 の免疫染色を行った。野生型胎仔の皮膚組織では、表皮全体に加え hair plug で強い β -カテニンの発現が確認されたが、TRAF6 欠損マウスの皮膚では β -カテニンの発現は見られず、hair plug の形成も確認されなかった。また野生型胎仔のホールマウント免疫染色では体全体にドット状の MAdCAM-1 の発現が見られるのに対し、TRAF6 欠損マウスでは完全に消失していた。従って、TRAF6 欠損マウスでは guard hair が毛包形成の最初期段階である plug 形成期から阻害されている事が明らかとなった。

さらに TRAF6 欠損マウスの毛幹形態を顕微鏡観察したが、14日齢の野生型同腹仔の体毛では guard hair、awl、zigzag の特徴を有する毛が認められたのに対し、TRAF6 欠損マウスでは dl マウスより更に変型した awl 様の体毛が観察された。

また、体毛以外に HED で異常の見られる表皮付属器官においても TRAF6 欠損マウスは顕著な異常を示した。手掌の汗腺と汗管は完全に欠損しており、眼瞼のマイボーム腺、雄の包皮腺、雌生殖腺近傍の脂腺といった独立脂腺も欠損、あるいは痕跡程度に萎縮していた。さらに興味深いことに dl、ta、cr マウスにおいては異常の見られない、毛包に附随する皮脂腺も TRAF6 欠損マウスでは極端な萎縮を示した。

近年、ヒト X 染色体遺伝型 HED の原因遺伝子として TNF スーパーファミリーに属する ectodysplasin-A (EDA-A) が、常染色体遺伝型については EDA の受容体である ectodermal dysplasia receptor (EDAR) が同定された。さらに tabby は EDA-A の、downles は EDAR、のマウスホモログであることが報告され、cr については death domain を介して EDAR に会合するアダプター蛋白質 EDARADD である事が明らかとなった。加えて、毛包に発現が局在する新規 TNFR スーパーファミリーメンバーとして、XEDAR、TROY が同定された。そこで、これらの受容体のシグナル伝達と TRAF6 の相互作用を検討した。

EDAR、XEDAR、TROY の細胞質内領域と TRAF6 を培養細胞に強制発現させ、その会合を確認した所、TRAF6 は XEDAR と強く、TROY とは弱い結合を示した。EDAR とは EDARADD を共発現させた場合にのみ会合が見られた。さらに最も強い相互作用を示した XEDAR について、CD40 の細胞外領域とキメラ受容体を作成した。これをマウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) に発現させ、抗 CD40 抗体で刺激すると、野生型 MEF では NF κ B の活性化が見られたのに対し、TRAF6 遺伝子欠損 MEF では全く見られなかった。皮膚特異的に NF κ B の活性化を抑えたトランスジェニックマウスが HED を示すことから、毛包、汗腺、独立脂腺の形成には EDA-EDAR-EDARADD-NF κ B のシグナルが必要であると考えられている。TRAF6 欠損マウスを示す HED と EDARADD を介した EDAR との会合は、このシグナル伝達経路と TRAF6 の密接な関わりを示唆するものである。さらに TRAF6 欠損マウスは dl マウス等では見られない、毛幹形態の異常、皮脂腺の萎縮を示すことから、XEDAR や TROY、あるいは未知の受容体のシグナル伝達を介して多様な表皮付属器官の形成を担っている可能性が示された。

本研究により TRAF6 が骨形成や表皮付属器官の発生に極めて重要な役割を担っていることが見いだされた。マウス個体を用いることにより初めて、個体の発生や恒常性の維持といった複雑な生命現象における TRAF6 の新たな機能が明らかとなったといえる。また、様々な受容体の下で TRAF6 という一つの分子が担うシグナルが、各々異なったアウトプットを見せる事実は非常に興味深い。TRAF6 遺伝子欠損マウスには、本研究では分子メカニズムの解明に至らなかった表現型も残されており、今後の課題であると同時に、TRAF6 を通した新たな生命現象解明の入り口となることが期待される。

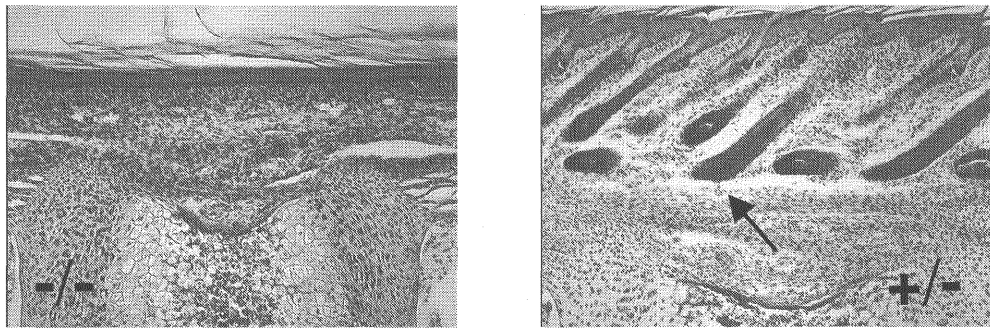


図 2. 尾部皮膚組織のヘマトキシリン・エオシン染色象。矢印は毛包を示す。