

論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 TP63 遺伝子の四肢発生および軟骨内骨化における機能解析

氏名 谷口 優樹

【要旨】

近年の急速な社会の高齢化に伴い、寝たきりの原因となりうる運動器変性疾患は大きな社会的関心となっている。主要な運動器変性疾患のひとつである変形性関節症は国内に 2500 万人程度の患者がいると推測されており、本疾患の克服は整形外科に課せられた喫緊の課題であると言える。変形性関節症は軟骨細胞の変性を主体とする疾患であり、変性の進行予防および軟骨再生による治療の実現には軟骨細胞の発生・分化に関与するシグナルネットワーク群を解明することが必須であると考えられている。

TP63 遺伝子（以下：p63）は癌抑制遺伝子として知られている p53 遺伝子のファミリー遺伝子として 1998 年にクローニングされた転写因子である。しかし p53 と異なり、p63 のノックアウトマウスは上皮の完全な欠損および上肢の著明な短縮と下肢の欠損という四肢のパターニングの異常を呈することが報告され、p63 は発生学的観点から重要な機能を有する遺伝子と考えられている。そこで本研究では転写因子 p63 の四肢発生および軟骨内骨化過程における機能を解明することを目的として前半部で cre / loxP システムによる肢芽間葉細胞および肢芽外胚葉性頂堤（apical ectodermal ridge=AER）のそれぞれにおける特異的なコンディショナルノックアウトマウスを作成することで p63 の四肢発生に関する研究を主に *in vivo* の系を中心に行った。また後半部では p63 遺伝子が軟骨内骨化過程において果たす機能を明らかにすべく、p63 の isoform ごとの発現解析を行い、発現 isoform ごとの軟骨特異的トランスジェニックマウスを作成し、解析した。続いて軟骨特異的ノックアウトマウスを作成し、解析することで p63 の軟骨内骨化過程における機能を解析した。

マウス肢芽間葉細胞内での p63 が四肢のパターニングに及ぼす影響を検討するため、肢芽間葉細胞で特異的に cre を発現する Prx1-cre マウスと p63^{flox/flox} マウスを用いて、Prx1-cre; p63^{flox/flox} マウスを作成・解析したが四肢は正常のパターンで発生し、明らかな表現型を呈さなかった。

次に肢芽の AER における p63 の機能を明らかにするために肢芽 AER において特異的に cre を発現する Msx2-cre マウスを用いて、Msx2-cre; p63^{flox/flox} マウスを作成し、解析した。Msx2-cre; p63^{flox/flox} マウスは上肢の裂手および下肢の著しい短縮と足趾数の減少を呈し、骨格二重染色標本において、脛骨の欠損（tibial hemimelia）を認め、SHFM with long bone deficiency（SHFLD）と呼ばれる表現型を示した。以上の事実より、四肢骨格形成のパターニングの制御において重要なのは肢芽の AER

における p63 の発現であることが *in vivo* にて明らかとなり、*Msx2* の発現のタイミングから少なくとも p63 は正常な AER の成熟・維持には必要であることが明らかとなった。

続いて、軟骨内骨化過程における p63 の機能を解析すべく、まず成長板軟骨細胞における p63 の発現確認を行った。p63 は休止層・増殖層から肥大層に至るまで、軟骨細胞の各段階において広く発現していたが、主に肥大層での発現が強く、増殖層での発現は比較的弱いことを確認した。RT-qPCR 法により、発現している isoform が TAp63 α と TAp63 γ であることを同定した。そこで軟骨細胞における p63 の機能を解析するために TAp63 α および TAp63 γ の Cre 誘導性コンディショナルトランスジェニックマウスを作成し、軟骨細胞に特異的に Cre を発現する *Col2a1-cre* マウスと交配することで軟骨細胞特異的 TAp63 α および TAp63 γ コンディショナルトランスジェニックマウスを作成し、解析した。

Col2a1-cre; TAp63 α ^{Tg/+} マウスの骨格標本ではごく軽度の骨長の短縮と中手骨・中足骨の骨化核形成の遅延が見られる傾向があったが明らかな表現型は示さず、組織切片においても *Col2a1-cre; TAp63 α ^{Tg/+}* マウスで明らかな成長軟骨板のカラム構造の異常をみとめなかった。

一方、*Col2a1-cre; TAp63 γ ^{Tg/+}* マウスは著しい胸郭形成不全と長管骨・脊椎の短縮を認め、中手骨・中足骨の骨化核形成も遅延しており、軟骨内骨化過程の異常が示唆された。成長障害は出産時まで持続し、*Col2a1-cre; TAp63 γ ^{Tg/+}* マウスは生直後に呼吸障害によりまもなく死亡した。*Col2a1-cre; TAp63 γ ^{Tg/+}* マウスでは組織切片において MMP13 が肥大層の後半部に入り込んで早期に発現が始まっているのが確認され、TUNEL 染色にて成長板軟骨細胞が異所性のアポトーシスを生じていることをつきとめた。

Col2a1-cre; TAp63 γ ^{Tg/+} マウス軟骨細胞では p63 の直接の転写標的である p21 とともに p63 のアポトーシス関連下流シグナルとして報告されている *Bax*、*Noxa*、*Puma*、*CD95 (Fas)* の発現が上昇しており、*Col2a1-cre; TAp63 γ ^{Tg/+}* マウス軟骨細胞における異所性のアポトーシスの亢進はこれらのアポトーシス関連遺伝子の発現亢進を介している可能性が考えられた。以上の解析から p63 は軟骨内骨化過程において軟骨細胞のアポトーシス制御に関与していることが示唆された。

そこで最後に p63^{flox} マウスを用いて、軟骨細胞特異的 p63 コンディショナルノックマウスを作成し、解析を行った。*Col2a1-cre* マウスと p63^{flox} マウスを用いて、*Col2a1-cre; p63^{flox/flox}* マウスを作成しようと試みたが、*Col2a1-cre; p63^{flox/+}* マウスと *p63^{flox/flox}* マウスの交配をしたところ、*Col2a1-cre; p63^{flox/flox}* という遺伝子型のマウスが Mendel の法則に反し、生後・胎仔含めて 60 匹中 1 匹しか得られず、なんらかの原因により遺伝子組み換えが生じにくいものと判断し、やや特異性は劣るが骨・軟骨前駆細胞において cre を発現し、軟骨細胞におけるコンディショナルノックアウトを実現できる *Sox9-cre* マウスを用いて p63 コンディショナルノックアウトマウスを作成・解析した。

Sox9-cre; p63^{flox/flox} マウスの骨格標本を作成し軟骨内骨化過程の評価を行ったが、予想に反して *Sox9-cre; p63^{flox/flox}* マウスはコントロールマウスと比較して明らかな軟骨内骨化の異常を示さず、何らかの代償性機構が働いているものと推察した。*Sox9-cre; p63^{flox/flox}* マウスは全例、生後 1-2 日後に死亡してしまい、p63 のグローバルノックアウトマウス (*p63^{-/-}*) でみられる口蓋裂による授乳障害の可能性を考えたが、骨格標本では骨性成分の口蓋癒合は正常であった。

TAp63 は p53、p73 とともに同様の転写標的を共有し、proapoptotic に作用しうるファミリー遺伝

子群を構成していることから、p53 と p73 が *Sox9-cre; p63^{flx/flx}* マウスにおいて代償性に機能している可能性に着目し、最後に検討した。p73 は軟骨細胞において発現が認められなかったが、p53 はマウス成長板軟骨組織切片において肥大層部に発現していることが確認され、p63 が強く発現している部位と一致していた。さらに *in vitro* の系において p53 が軟骨系細胞で TAp63 γ と同様のアポトーシス関連遺伝子の発現を上昇させ、p53 がアポトーシスに関して TAp63 γ と同様の機能を軟骨細胞にて有していることが判明した。最後に軟骨細胞において p63 の機能を p53 が代償しているかを検討するために *Sox9-cre; p63^{flx/flx}* マウスより採取した肋軟骨細胞にて RNAi による p53 のノックダウンを行い、アポトーシス関連遺伝子の発現変化を解析したところ、*Bax*、*Noxa*、*Puma* の発現が有意に低下していた。以上の結果から軟骨内骨化過程においては p53 と p63 がお互いに代償性に機能している可能性が示唆された。