

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06041

研究課題名(和文)慢性再発性多発性骨髄炎のヒト化マウス作製と分子標的薬開発

研究課題名(英文)Production of humanized mouse models for chronic recurrent multifocal osteomyelitis and antiinflammatory drug development

研究代表者

阿部 幸一郎(Abe, Koichiro)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90294123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：自己炎症による骨痛や発熱を伴う慢性再発性多発性骨髄炎は、指定難病であり、現在も原因については不明な点が多い。四肢末端に自己炎症を発するAli18変異マウス系統の解析より、我々はその原因遺伝子であるFgrを同定した。Fgrは、Srcファミリーに属するチロシンキナーゼで、リンパ球やミエロイド系細胞で機能する。本研究では、患者で見つかったFgrミスセンス変異がマウスに導入し、自己炎症性関節炎を誘発するかを解析した。ヒト変異をホモに持つマウスを1年以上飼育して観察を行ったが、四肢抹消に関節炎は発症しなかった。しかし、脾臓が肥大するマウスが見つかったので、何らかの疾患との関連が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性再発性多発性骨髄炎(CRMO)は指定難病であり、現在までに確立された診断方法や治療法が少ない。このCRMOの原因遺伝子のひとつとして、マウス変異系統の解析よりSrcファミリーのFgrチロシンキナーゼが同定された。それと同時にCRMOの患者において、FGRタンパクのアミノ酸置換を起こす2つの多型も見つかった。これらのFGRで見つかった多型(変異)の機能を探るため、変異型FGRをマウスFgr遺伝子座に導入したマウスを作製して解析を行った。その結果、これらのマウスは自己炎症性の骨病態を示さなかったことから、CRMOで見つかった変異は自己炎症の修飾効果を担い、直接の原因ではないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic recurrent multifocal osteomyelitis (CRMO) is an autoinflammatory bone disorder that presents with bone pain and localized swelling. In analysis of murine Ali18 mutant strain which shows autoinflammatory arthritis in peripheral limb, we identified a missense mutation in Fgr, a member of Src family kinases. Fgr plays an important role in lymphocyte and myeloid cell lineages. Here we introduced human FGR missense mutations identified in CRMO into the murine Fgr locus in ES cells, and ES cell-derived mutant strain were established. Although these FGR homozygous mutant do not show peripheral arthritis for one year after their birth, enlarged spleens were observed in some of mutant mice. Therefore, we concluded the human FGR mutations do not contribute to autoinflammation in bone but do to develop lymphoma, which may modify or control autoinflammation strength.

研究分野：実験動物学

キーワード：自己炎症性症候群 疾患モデルマウス Srcファミリーキナーゼ Ali18マウス 自己炎症性骨疾患

## 1. 研究開始当初の背景

自己抗体価の上昇や自己反応性 T 細胞などの獲得免疫系の異常による自己免疫疾患と異なり、自己炎症性症候群では、自然免疫系の異常による周期性発熱や皮疹、紅斑、蕁麻疹、関節炎などの臨床症状を特徴とする。自己炎症性症候群は、微生物の感染や化学物質などの環境要因ではなく、遺伝的要因などの内的要因によって自己炎症を発症することが知られているが、現在においても未知な点が多い。慢性再発性多発性骨髄炎 (chronic recurrent multifocal osteomyelitis, CRMO と略す) は、複数の骨に長期的に起こる炎症によって骨痛や骨破壊を発症する自己炎症性骨疾患である。CRMO は指定難病であり、診断方法や治療法も十分に確立されていない。当時、我々の研究グループでは自己炎症性疾患のモデルとなる変異マウスの解析を行っていて、その原因となる変異を同定していた。そのタイミングで、CRMO 患者のゲノム解析を行っている米国アイオワ大学のポーリー・ファーガソンの申し出により共同研究を開始した。我々がマウスで同定した Src ファミリーキナーゼ (SFK) の Fgr 遺伝子を、CRMO 患者のゲノム配列で解析したところ、複数の非常に稀な多型が存在することがわかった。その中には 2 つのミスセンス変異も含まれた。

## 2. 研究の目的

*Ali18* マウスは、ドイツにおける大規模 ENU ミュータジェネシスプロジェクトで、四肢に浮腫や紅斑を自然発症する表現型として同定された変異系統である。この変異マウスの原因遺伝子として同定された SFK の Fgr 遺伝子における変異が、CRMO 患者においても非常に稀な多型として同定されたことから、ヒトにおいても自己炎症の発生機序に重要な役割を担っている可能性が高い。よって本研究では、CRMO 患者ゲノムで同定された FGR のミスセンス変異をマウスに導入したヒト化マウスを作製し、*Ali18* マウスと同様の自己炎症性関節炎を発症するかを検証することを目的とした。このことにより、新たなヒト疾患モデルとなる実験動物の開発と CRMO の自己炎症発生機序を分子レベルで解析することができる可能性がある。

## 3. 研究の方法

CRMO 患者において見つかったミスセンス変異を含む FGR 遺伝子を、以下の 2 つのステップを経てマウスに導入した。最初に、マウス Fgr 遺伝子座の ATG を含むエキソン 3 近傍のゲノム領域を、pU15 プラスミドにクローニングした。このプラスミドを用いて ES 細胞で相同組換えクローンを得た。これよりキメラマウスを経てクローン由来の変異型 Fgr レポーターマウスを作製した。3 つの異なる ES 細胞クローンからキメラマウスを得て、それぞれについて系統化を行った。次に、ヒト FGR の cDNA クローンを購入し、CRMO で見つかったミスセンス変異 (それぞれ RW および PS とする) を有するプライマーを設計し、これらを用いた PCR により全長の cDNA クローンに導入した。それらの FGR コーディング領域を pKSA stop vec プラスミドにクローニングして、コンストラクトとした。また、コントロールとして変異を導入していない野生型 cDNA を導入したものを WT とした。各々 RW、PS、WT のコンストラクトを Fgr レポーターの ES 細胞株に導入し、変異 lox サイトを利用してレポーターより FGR 遺伝子へと置換した。これらの ES 細胞株より、それぞれキメラマウスを作製し、C3HeB/FeJ 系統 (*Ali18* マウスと同じ遺伝的背景) と交配させて系統化を行った。それらのマウスに対し、組織の X-gal 染色や末梢四肢の関節炎のクリニカルスコア測定、骨髄の組織切片作製、脾臓での Fgr の発現解析などを行った。

## 4. 研究成果

研究分担者によって開発された変異型遺伝子トラップシステムを、ランダムな挿入変異でなく、目的部位の相同組換えによって変異 lox とレポーター遺伝子 b-geo を、マウス ES 細胞の Fgr 遺伝子座に導入し、さらに変異 lox 部位を利用してレポーター遺伝子をヒト型 FGR へ置換させる二段階のステップで行うことを計画した。

はじめに、変異 lox+レポーター系統の作出であるが、研究分担者によって開発された pU15 プラスミドは、lox 配列では含まれたレポーター遺伝子 (lox71-geo-loxP) の 5' と 3' の両側にそれぞれクローニングサイトがあるので、これを用いてコンストラクションを行った。Fgr 遺伝子のイントロン 2 と ATG を含むエキソン 3 を含む領域を 5' アームとし、イントロン 3 の領域を 3' アームとして、それぞれクローニングを行った。このコンストラクトを用いて、相同組換えを起

こした ES 細胞クローンを単離した。レポーター遺伝子には *geo* を用いたが、これは ガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合タンパクであり、G418 によって選別することができる。ES 細胞では *Fgr* が発現しているため、*Fgr* 遺伝子座に正しく相同組換えを起こした細胞は *geo* を発現し、選択培地で選別することができる。このようにしてコンストラクションは研究代表者が行い、研究分担者に送付した。クローン単離は研究分担者が行い、クローンのゲノム DNA 抽出と PCR スクリーニングは研究代表者が行った。プライマーをそれぞれのアームの外側のゲノム領域とレポーター遺伝子に設定し、相同組換えを起こした場合のみ適切な大きさの PCR 産物を検出できるようにした。クローンのゲノム DNA を鋳型とし、PCR 陽性かどうかで判定した結果、64 クローン中 51 クローンが陽性であった。これらの陽性クローンのうち、3 クローンよりキメラマウスを作製し、その精子を用いて体外受精を行って 2 細胞胚を採取して凍結保存した。それらを液体窒素輸送器により、研究分担者より研究代表者の実験動物施設へ移送した。それらの凍結胚を融解し、胚移植によりマウス個体を得て、交配により系統化を行った。レポーター系統においては、レポーター発現が *Fgr* 遺伝子発現を反映すると考えられるので、X-gal 染色を行って  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*geo*) の組織特異的活性を解析した。しかし、*Fgr* が高発現する脾臓などを用いても染色像は認められなかった。これらの組織より RNA を抽出して、*geo* のプライマーを用いて RT-PCR を行うと陽性シグナルが認められた。よってレポーターの発現は認められたが、組織染色で検出するには発現が微弱であることが考えられた。これらの系統は、レポーター遺伝子への特異的抗体を用いて免疫染色を行うことで感度を上げれば、シグナルを検出される可能性を考えて解析を継続している。現在までに *Fgr* に対する抗体を用いた組織切片上での免疫組織染色の報告はないことから、レポーター発現を標的とする方法が機能する可能性が考えられる。*Fgr* の組織特異的な発現解析は、CRMO 患者における骨痛や骨破壊と関連する可能性が考えられるので、現在、これらのレポーターマウス系統の骨髄におけるレポーター発現と感覚神経マーカーを用いて自己炎症との関連を解析している。

次に、各種ヒト型 FGR 系統の作出であるが、これは先に得られた変異 *lox* 及びレポーター遺伝子を *Fgr* 遺伝子座に相同組換えで挿入した ES 細胞株を用いた。用いたレポーター ES 細胞クローンは、*geo* のネオマイシン耐性遺伝子活性を利用して選択を行っているため、ピューロマイシン耐性遺伝子を持つ pKSA stop vec プラスミドに、ヒト型 FGR のコーディング領域をクローニングした。このプラスミドの作製は研究代表者が行い、プラスミドを研究分担者へ送付して二段階目の遺伝子導入を行った。この場合は、変異 *lox* 配列を用いての置換であるため、高率でピューロマイシン耐性のコロニーが得られた。レポーター系統作出と同様に、研究代表者がクローンのゲノム DNA より PCR により陽性クローンをスクリーニングし、研究分担者が該当する ES 細胞クローンよりキメラマウス作製を行った。これらのキメラマウスより体外受精を行い、凍結 2 細胞胚を研究代表者に送付して系統化を行った。コンストラクトとして、野生型 FGR 配列を持つ WT 及び CRMO で見つかった 2 つのタイプのミスセンス変異を持つ RW と PS について、それぞれ複数の系統を樹立して解析を行った (RW, PS の各変異であるが、配列情報や *in vitro* 実験結果も含めて Abe *et al.*, PNAS 116, 11872-11877, 2019 に詳述されている)。現在までの研究で、マウスにおける自己炎症性関節炎の表現型は、遺伝的背景で非常に異なることがわかっている。つまり、*Ali18* マウスにおける関節炎はオリジナルの遺伝的背景である C3HeB/FeJ では自然発生するが、C57BL/6 などの他の系統と交配させると抑制される傾向にある。我々が用いた ES 細胞株は TT2 で、これは CBA と C57BL/6 の F1 マウスより樹立された ES 細胞である。よって、変異 FGR による自己炎症の表現型は抑制される可能性が高い。実際、キメラマウスより ES 細胞由来のマウスが得られたが、それらのマウスにおいて自己炎症の表現型は認められなかった。この段階のマウスでは変異 FGR はヘテロ型であったため、ヘテロ型どうしの交配でホモ型を得るとともに、ヘテロ型マウスを野生型 C3HeB/FeJ マウスと交配を行って、順次、戻し交配によって遺伝的背景を C3HeB/FeJ に置換することを開始した。まず、ES 細胞由来の遺伝的背景におけるホモ型マウスであるが、野生型 FGR の WT 系統で炎症性関節炎は認められず、変異を含む RW 系統、PS 系統においても末梢四肢の形態的变化は認められなかった。よって、遺伝的背景の影響が大きいことを予想して C3HeB/FeJ への戻し交配を行った。戻し交配の回数であるが、一般的には 6 回程度行うとほぼ遺伝的背景が置換されると考えられている。しかし、本研究の場合は、研究実施期間を 1 年間延長して 3 回の戻し交配を行って解析を行うように実施計画を変更して対応した。したがって、以下のような交配を行った。ES 細胞由来のヘテロ型マウスに野生型 C3HeB/FeJ マウスを交配させ、次世代のマウスの遺伝子型をスクリーニングして F1 ヘテロマウスを同定した。このヘテロマウスに、さらに C3HeB/FeJ マウスを交配させて、次世代のマウスを得て同様にスクリーニングを行って N1 ヘテロマウスを得た。この交配を再度繰り返して N2 ヘテロマウスを得て表現型の解析を行った。この段階においても、ヘテロ型では四肢末梢の関節炎は認められなかった。よって、ホモ型を解析するために N2 マウスどうしを交配させて次世代を得て、遺伝子型をスクリーニングすることによってホモ型を同定した。しかし、このホモ型マウスにおいても関節炎の表現型は確認できなかった。よって、少なくともここまで行った遺伝的背景においては関節炎には至らない可能性が考えられた。さらに PS のいくつかの系統においては、*Ali18* マウスと交配させて、*Ali18*/FGR 変異型マウスの表現型を解析したが、特に *Ali18*/+ マウスより激しい関節炎は認められなかった。よって、これまでの結果ではヒト型 FGR 変異は自己炎症性関節炎の発症には微弱な効果であると考えられる。しかし、該当する FGR マウスの解析において、肥大した脾臓が複数の個体で認められた。

この表現型は *Ali18* マウスでも認められる表現型であるが、頻度があまり高くないために発表データとしては至っていない。Fgr は B 細胞で高く発現しており、その発現量が B 細胞リンパ腫と関連していることが知られている。しかし、これまでの研究では、*Ali18* マウスの関節炎の発症とリンパ球系の表現型は関連がないことがわかっている。よって、本研究で解析を行った CRMO で見つかった変異は、リンパ球系での異常と関連していて骨髄炎の表現型への関与は小さいと考えられる。しかし、ヒトの集団において遺伝的にも環境的にもヘテロな状況において、様々な素因を増強するモディファイア（修飾効果因子）であると結論できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshikawa Ryo, Abe Koichiro	4. 巻 on line
2. 論文標題 The multi kinase inhibitor dasatinib suppresses autoinflammation and increases bone density in a mouse model for chronic recurrent multifocal osteomyelitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Function	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbf.3617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe et al.	4. 巻 116
2. 論文標題 Gain-of-function mutations in a member of the Src family kinases cause autoinflammatory bone disease in mice and humans	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PNAS	6. 最初と最後の頁 11872-11877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1819825116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部幸一郎
2. 発表標題 慢性再発性多発性骨髄炎の原因遺伝子同定と疾患モデル動物の有用性
3. 学会等名 日本骨・関節感染症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部幸一郎
2. 発表標題 マウス順遺伝学、ゲノム編集、疾患ゲノム解析による慢性再発性多発性骨髄炎の分子機構解明
3. 学会等名 日本遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部幸一郎、高松信彦
2. 発表標題 Srcファミリーキナーゼにおける機能過剰変異は自己炎症性骨疾患を引き起こす
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

RESEARCH ARTICLE: <https://doi.org/10.1002/cbf.3617>  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbf.3617>  
 第43回 日本骨・関節感染症学会学術集会2020、プログラム  
[https://web.apollon.nta.co.jp/jssbji43/program\\_nittei.html](https://web.apollon.nta.co.jp/jssbji43/program_nittei.html)

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荒木 喜美  (Araki Kimi)  (90211705)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授    (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------