

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10485

研究課題名(和文)骨系統疾患モデルマウス候補Lbrトラップマウスの表現型解析

研究課題名(英文)Analysis of Lbr trap mice which is the candidate of genetic skeletal disorders

研究代表者

船元 太郎 (Funamoto, Taro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20404452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Lamin B Receptor (LBR) の変異は重篤な骨系統疾患であるGreenberg骨異形成症を引き起こすことが知られている。そこでLbrトラップマウスの表現型解析、および骨軟骨代謝におけるLbrの機能解析を行った。Lbrトラップマウスは成長障害を認め、発毛の低下、魚鱗癬様の皮膚所見を認めた。骨格系の表現型として癒合指が観察された。Greenberg骨異形成症でみられる明らかな短肢症は観察されなかった。骨表現型解析では骨強度、骨密度の低下を認めた。Lamin B Receptorは骨代謝に関与していると考えられ、またLbrトラップマウスは合趾症のモデルマウスとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mutation in Lamin B Receptor (LBR) is known to cause severe bone disorders disease, Greenberg dysplasia. Therefore, phenotypic analysis of Lbr trap mice and function analysis of Lbr in osteochondral metabolism were performed. Lbr trap mice showed growth disorder, decreased hair growth, and ichthyosis. Syndactyly were observed as a characteristic phenotype of the skeletal system. No obvious short limb symptoms observed in Greenberg dysplasia were observed. Bone phenotype analysis showed decreased bone strength and bone density. Lamin B Receptor is likely to be involved in bone metabolism, and Lbr trap mice are potential to be model mice of syndactyly.

研究分野：整形外科学

キーワード：ラミンBレセプター 癒合指 骨芽細胞 グリーンバーグ骨異形成症

1. 研究開始当初の背景

『ロコモティブシンドローム』という新しい概念が提唱され一般社会にも浸透しつつある。これは「運動器の障害」によって「要介護」になるリスクの高い状態であるが、本邦で 4700 万人以上とも推計されている (Yoshimura, 2009)。ロコモティブシンドロームは変形性関節症 (OA) や骨粗鬆症などの疾患も包含する概念である。これらの病因には多数の因子が複合的に関与していることが推察されるが、その因子の一つと考えられている遺伝子について様々な研究が行われているにもかかわらず、素因遺伝子として確立されたものはいまだ見いだされていない。ロコモティブシンドロームを放置すると骨折や痛みなどから運動器全般の機能低下を来とし寝たきりの状態を余儀なくされ、結果的に医療経済にも多大な影響を及ぼしている。

近年の分子生物学のめざましい発展により、多くの疾患に遺伝子が関与していることが明らかになってきた。それは骨関節疾患においても例外ではない。過去にはマウス挿入突然変異の解析により老化抑制遺伝子の *Klotho* 遺伝子が同定され、老化に伴う骨粗鬆化に関与していることが発見されたのは画期的であった (Kuro-o M, Nature 1997)。また遺伝子ターゲティングにより、それまで免疫系の異常が推測された *Cbfa1* の変異が鎖骨頭蓋異形成症の原因であることが明らかになったが、同時にこの転写因子が骨芽細胞分化を支配するマスター遺伝子であることが解明された (Komori T, Cell 1997)。この様にミュータジェネシスは新規遺伝子の発見、および既知遺伝子のそれまで知られていなかった機能の解明において非常に有力な手段である。

「遺伝子トラップ法」はプロモーターを持たないレポーター遺伝子を ES 細胞に導入し、それがゲノム上の遺伝子内に入るとレポーター遺伝子が発現することを指標に新規遺伝子を単離同定する方法である。効率良く挿入変異体を作製でき、挿入部位の遺伝子の同定、および機能を解析できる手法である。トラップクローンからマウス個体を作製し個体の表現型解析も可能となる。そこで我々は『可変型遺伝子トラップ法』によって樹立されたトラップクローンを用いて骨・軟骨代謝に関与する遺伝子の効率的なスクリーニングに取り組んでいる。

2. 研究の目的

Lbr 遺伝子は Lamin B receptor をコードしている。Lamin B receptor は核膜内膜に存在しており、その変異により好中球の低分葉核異常である Pelger-Huet 核異常や魚鱗症を引き起こすことが知られている。また重篤な骨系統疾患のひとつである Greenberg 骨異形成症は *Lbr* 遺伝子の変異が原因とされ、胎児水腫や短肢症をきた

す致死性の疾患である (Greenberg et al. 1988; Chitayat et al. 1993; Horn et al. 2000)。X 線像では短肢の他虫食い様の像を呈し、異所性石灰化が見られ、組織評価では骨、軟骨など組織分化が未熟で細胞も疎であると報告されている (Konstantinidou et al. 2008)。そこで本研究は *Lbr* トラップマウスを用いて *Lbr* 遺伝子の骨軟骨代謝における機能を解析すること、そして本マウスが Greenberg 骨異形成症のモデルマウスとなりうるかを評価することを目的とする。

3. 研究の方法

Lbr トラップマウスを用いて実験を行った。

(1) トラップベクターの挿入部位の同定、および *Lbr* 遺伝子発現欠損の確認

挿入したトラップベクターの遺伝子配列中と挿入が予想される周囲の遺伝子配列に対しプライマーを作製し PCR 法で遺伝子断片を増幅、シーケンサーで遺伝子配列を解読し挿入部位の同定を行った。遺伝子発現解析は mRNA を回収し、RT-PCR 法で解析を行った。

(2) *Lbr* 遺伝子の発現臓器解析

各種臓器を切除し、トラップベクターのレポーター遺伝子である β -ガラクトシダーゼ活性で評価を行った。

(3) *Lbr* トラップマウスの飼育、表現型解析

通常のマウス飼育環境下で飼育を行い表現型の解析を行った。また透明骨格標本作製した。

(4) *Lbr* トラップマウスの骨表現型解析

3 点曲げ試験による大腿骨強度試験、 μ CT データを用いた骨形態計測を行った。骨組織から mRNA を抽出し骨代謝関連遺伝子の発現を評価した。組織標本作製し HE 染色などで評価を行った。また、胚組織から mRNA を抽出し、マイクアレイ検査を行った。

(5) 骨芽細胞培養実験

4 日齢マウス頭蓋冠から骨芽細胞を分離、骨芽細胞用選択培地で培養実験を行った。固定後アルカリフォスファターゼ染色、アリザリンレッド染色を行った。培養細胞から mRNA を回収し遺伝子発現解析を行った。また、この培養細胞と野生型マウス、*Lbr* トラップマウスの骨髓細胞と共培養実験を行い、TRAP 染色を行い破骨細胞誘導能および骨髓からの破骨細胞形成能を評価した。

4. 研究成果

(1) トラップベクターの挿入部位の同定、および *Lbr* 遺伝子発現欠損の確認

Lbr 遺伝子は 14 のエクソンからなるが、第 4 エクソン中にトラップベクターが挿入され

ていた。挿入部位の遺伝子の欠損は 10 塩基対であった。RT-PCR では *Lbr* トラップマウス由来のサンプルでは遺伝子産物は検出されず、mRNA レベルでの *Lbr* 遺伝子発現の欠損を確認した。

(2) *Lbr* 遺伝子の発現臓器解析

レポーター遺伝子の β -ガラクトシダーゼ活性では骨組織を含む多くの臓器で *Lbr* 遺伝子の発現が認められた(図1)。



図1. 各種臓器の β -ガラクトシダーゼ染色

(3) *Lbr* トラップマウスの表現型解析

Lbr トラップマウスは成長障害を認め、発毛の低下、魚鱗癬様の皮膚所見を認めた。骨格系の表現型として皮膚性、骨性の癒合指が多く観察された。*Lbr* トラップマウスの生存期間中央値はオス23日、メス25日であった。Greenberg骨異形成症でみられる明らかな短肢症は観察されなかった(図2)。

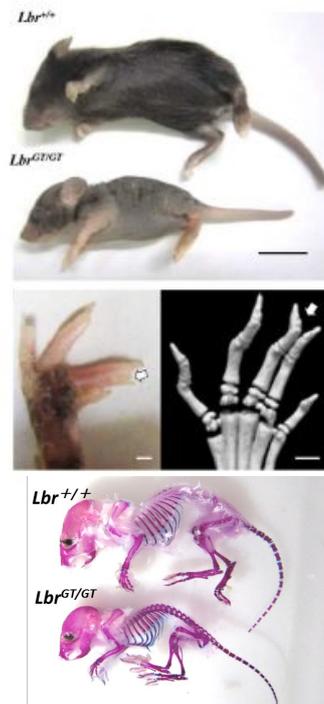


図2. マウス全身像と癒合趾、骨格標本

(4) *Lbr* トラップマウスの骨表現型解析

3点曲げ試験の結果では骨強度の低下、破断エネルギーに有意な差を認めた(図3)。

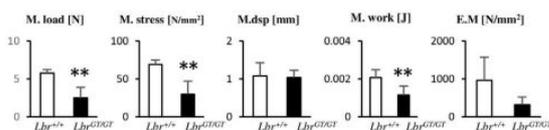


図3. 骨強度試験

骨形態計測では骨ミネラル量、骨体積、骨密度、海綿骨骨梁数など複数の項目で低下を認めた。

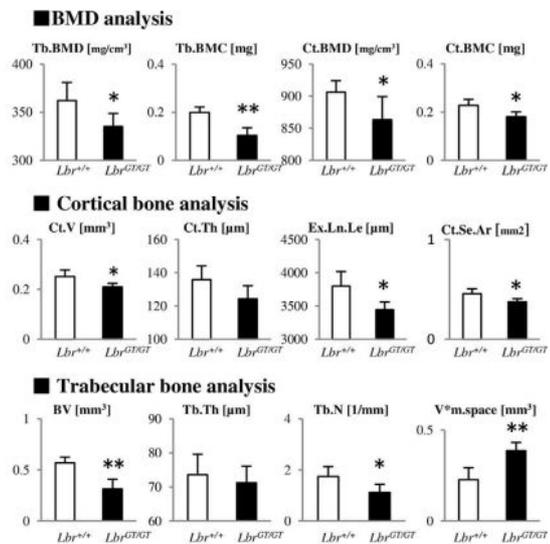


図4. 骨形態計測

骨組織の骨代謝関連遺伝子の発現解析では BMP2、Runx2、Osterix、アルカリフォスファターゼ、I 型コラーゲン、オステオカルシンなど骨芽細胞関連遺伝子の発現が低下していた。一方骨芽細胞や骨細胞で発現し破骨細胞を誘導する RANKL や破骨細胞分化、機能の指標となる TRAP や NFATc 1 には明らかな差は認められなかった。

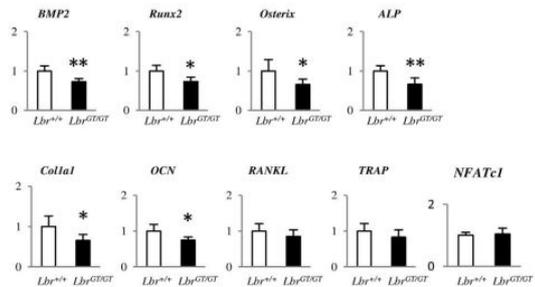


図5. mRNA 発現解析

骨組織標本では骨端線の軟骨細胞の増殖細胞では核周囲のエオジン好性領域が少なく軟骨基質産生に差がある可能性が示唆された。また肥大軟骨細胞層が厚い傾向があり個々の細胞は不均一な様子が観察された(図6)。

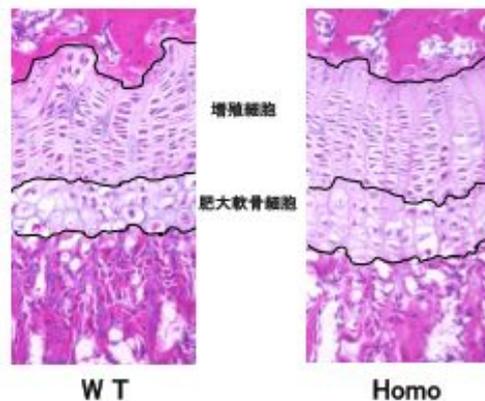


図6. 組織標本の HE 像

胚組織から抽出した mRNA のマイクロアレイ解析を行った。肢芽の発生で必須とされる

HOX 遺伝子の発現レベルに差が見られ、胎生期の成長に Lamin B receptor が関与している可能性が示唆されるとともに癒合趾にも関与している可能性が示唆された。

(5) 骨芽細胞の分離培養実験

ALP 染色では ALP 活性の低下を認めた。アリザリンレッド染色では *Lbr* トラップマウスでは低下していた(図7)。骨代謝関連遺伝子の mRNA の発現解析では Runx2, Osterix, Col1a1, ALP, オステオカルシンに明らかな発現量の差は認めなかった。

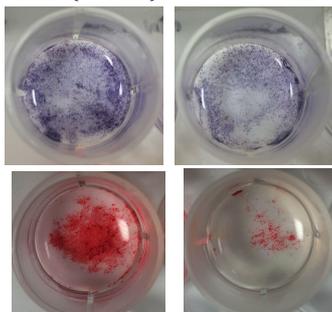


図7. 培養骨芽細胞の ALP 染色とアリザリンレッド染色

培養骨芽細胞と、骨髄との共培養実験を行い、骨芽細胞の破骨細胞誘導能と骨髄からの破骨細胞分化能を評価した。共培養後 TRAP 染色陽性細胞数を集計したところ、野生型由来の骨芽細胞-骨髄の培養では 1 視野平均 32.6 個、*Lbr* トラップマウス由来の骨芽細胞-骨髄の培養では 42.8 個で有意な差は認めなかった。

以上の結果から *Lbr* トラップマウスには短肢症はみられずヒトでみられる Greenberg 骨異形成症と同じ表現型はみられなかった。しかしながら Lamin B receptor は骨代謝に影響を与える因子のひとつであると考えられる。また、合趾症がみられ HOX 遺伝子発現に差異がみられることから Lamin B receptor は肢芽形成に関与している可能性があり、*Lbr* トラップマウスは合趾症の原因解明のためのモデルマウスとなりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kurogi S, Sekimoto T, Funamoto T, Ota T, Nakamura S, Nagai T, Nakahara M, Yoshinobu K, Araki K, Araki M, Chosa E. Development of an efficient screening system to identify novel bone metabolism-related genes using the exchangeable gene trap mutagenesis mouse models. Sci Rep. 2017 Jan 20;7:40692. doi: 10.1038/srep40692 査読あり

[学会発表](計 11 件)

関本 朝久 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた骨に影響を及ぼす新規遺伝子群の網羅的機能解析、第 91 回日本整形外科学会

学術集会 2018 年

関本 朝久 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた効率的な新規骨代謝関連遺伝子の探索、第 32 回日本整形外科基礎学術集会、2017 年

船元 太郎 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた Lamin B receptor 変異マウスの解析、第 32 回日本整形外科基礎学術集会、2017 年

船元 太郎 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた lamin B receptor 変異マウスは成長障害を来す、第 31 回日本整形外科基礎学術集会、2016 年

黒木 修司 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨異常を来す新規遺伝子変異マウスライブラリー構築、第 31 回日本整形外科基礎学術集会、2016 年

関本 朝久 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾患に関与する新規遺伝子群のライブラリー構築、第 89 回日本整形外科学会学術集会、2016 年

Nakamura Shihoko、Construction of a novel gene library related to osteogenic disorder using exchangeable gene trap mutagenesis, Australian New Zealand Bone & Mineral Society Annual Scientific Meeting 2015.

永井 琢哉 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝異常をきたす新規遺伝子群のライブラリー構築、第 30 回日本整形外科基礎学術集会、2015 年

船元 太郎 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた lamin B receptor の骨代謝における機能解析、第 30 回日本整形外科基礎学術集会、2015 年

船元 太郎 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた lamin B receptor の骨代謝における機能解析、第 33 回日本骨代謝学会学術集会、2015 年

中村 志保子 他、可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝異常をきたす新規遺伝子群のライブラリー構築、第 33 回日本骨代謝学会学術集会、2015 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

船元 太郎 (Funamoto Taro)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：20404452

(2)研究分担者

帖佐 悦男 (Chosa Etsuo)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：00236837

黒木 修司 (Kurogi Syuji)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：40418843

関本 朝久 (Sekimoto Tomohisa)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号：60305000

荒木 正健 (Araki Masatake)
熊本大学・生命資源研究・
支援センター・准教授
研究者番号：80271609

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()