

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11960

研究課題名(和文) 脊椎胸郭異骨症モデルマウスの原因遺伝子探索

研究課題名(英文) Identification of the responsible genes for a novel mouse model of spondylothoracic dysostosis

研究代表者

藤川 順司 (FUJIKAWA, JUNJI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40760377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨系統疾患である脊椎胸郭異骨症の表現型と酷似する系統(FRマウス)を野生型マウスコロニーより認めており、脊椎胸郭異骨症の原因、正常な骨格系形成機構の解明を目指し研究を開始した。まず、エクソーム解析とサンガーシーケンス解析によりDnajc19、Lrrc31等の複数の候補遺伝子に絞った。だが、それらのノックアウトマウスの表現型が体重減少等FRマウスと異なる、FRマウス全てと相関する変異を認めない等により他のアプローチを必要とした。そこで、FRマウス胎仔と同腹の野生型マウス胎仔13腹、74胎仔に対しSNP解析を行った。これらの解析からFRマウスの原因遺伝子が8番染色体の下流にある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎胸郭異骨症は頸椎と肋骨の異常を特徴とする骨系統疾患であり、脊椎・肋骨の癒合、短縮した脊椎等が認められる。このため肺の発達が阻害され呼吸不全のリスクが高い。原因遺伝子は複数明らかになってはいるが治療法の確立に至っていない。以前より脊椎胸郭異骨症の表現型と酷似する系統を野生型マウスコロニーから認めており、新たな原因遺伝子の解明を目指しこのマウス系統の解析を行なったところ、8番染色体の下流にある可能性が示唆された。新たな原因遺伝子の同定までは至らなかったが、存在の可能性は高まった。乳児期までの死亡率が約50%とも言われるこの疾患の治療法確立の一助となるべく研究の継続が必要である。

研究成果の概要(英文)：A strain (FR mouse) that closely resembles the phenotype of spondylothoracic dysostosis, which is a skeletal dysplasias, was found in wild type mouse colonies. We started the study aiming to elucidate the cause of spondylothoracic dysostosis and the normal skeleton formation mechanism. First, we narrowed down multiple candidate genes such as Dnajc19 and Lrrc31 by Exome sequencing and Sanger sequencing. However, another approach was required because the phenotype of these knockout mice was different from that of FR mice, such as weight loss, and there was no mutation that correlated with all FR mice. Therefore, SNP analysis was performed on a total of 74 fetuses (13 pregnant mice) of FR mouse fetuses and wild-type mouse fetuses of the same litter. These analyzes suggested that the responsible gene of FR mouse may be located downstream of chromosome 8.

研究分野：遺伝子

キーワード：骨系統疾患 自然発症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患は骨、軟骨等骨格の形成に関わる組織がそれらの成長や発達の段階で障害をうけることにより発生する疾患である。国際分類では42グループ、461疾患が記載されており非常に多くの疾患が存在する。個々の疾患の発症率は高くはないが、骨系統疾患全体では発症率は高く多くの患者が悩まされている。ほとんどは遺伝性の疾患であり、原因遺伝子が特定されている疾患が多いが、原因遺伝子に変異がなくとも発症する例もあり、今後も継続した研究が必要とされている。今回の研究開始当初、以前より飼育していた野生型マウスコロニーから肋骨癒合、口蓋裂を遺伝性に認めるマウス (FR マウス) を見出していた。また、戻し交配の結果からこのマウス系統は常染色体劣性遺伝であると考えられた。FR マウスの表現型はヒトの脊椎胸郭異骨症 (Spondylothoracic dysostosis:STD) の特徴と酷似していた。STD は頸椎と肋骨の異常を特徴とする骨系統疾患であり、脊椎・肋骨の癒合による短縮した脊椎等が認められる。また、脊椎と肋骨の異常のため肺の発達が阻害され呼吸不全を誘発し心不全のリスクも高くなり、幼児期までの死亡率が約50%といった報告もある。現在までに *DLL3*、*MESP2*、*LFNG*、*HES7* といった遺伝子の関与が解明されているが、治療法の確立には至っておらず、さらなる研究が求められている。一方でこのFRマウスはSTDの特徴と酷似しているものの、脊椎の癒合が軽度である、常に口蓋裂を伴うといった相違も認められた。これらのことから、このFRマウスを解析することがSTD発症に関与する新たな遺伝子の解明や正常な骨系統の形成解明に寄与すると考えた。

新たな遺伝子同定の方法は順遺伝学と逆遺伝学に大きく分けられる。すでに常染色体劣性遺伝と考えられる表現型を示すFRマウス系統を見出していたため今回は順遺伝学にて研究を開始した。順遺伝学での新たな遺伝子同定は大きな流れとしてスクリーニング マッピング クローニングの順に構成されている。FRマウス系統を見出しているためスクリーニングは終えており、マッピングを始めた。まずはエクソーム解析により原因遺伝子の候補を50程度に絞り込んでおりその後から今回の研究を始めた。

2. 研究の目的

マッピングを継続し、FRマウスの解析をすすめることでSTDの新たな原因遺伝子の同定を目指す

3. 研究の方法

1) FRマウスにおける既知のSTD原因遺伝子 (*DLL3*、*MESP2*、*LFNG*、*HES7*) の変異確認

エクソーム解析の結果からFRの表現型にホモの変異が検出され、コントロールサンプルではレファレンスかもしくはヘテロの変異しか見られないものを抽出した。その結果からはSTDや脊椎肋骨異骨症の既知の原因遺伝子の変異は抽出されてこなかったが、念のため Intergrative Genomics Viewer (IGV) を利用し、FRマウスにおいて既知のSTD原因遺伝子に変異がみられるかどうか塩基配列を解析した。

2) FRマウスにおける既知の肋骨癒合に関与する遺伝子 (*MESP1*、*Jagged1*、*Notch1*、*Dvl1*、*Dvl2*、*Dvl3*、*Notch2*、*VANGL2*、*ROR2*、*FLNB*、*TBX6*、*Wnt5a*) の変異確認

さらに、IGVを利用し、既知のノックアウトマウスで肋骨癒合を認める遺伝子変異がFRマウスにおいてみられるかどうか解析した。

3) ダイレクトシーケンスによるFRマウスDNAの塩基配列確認

エクソーム解析で絞り込んだ遺伝子の中から、変異による翻訳産物の異常の度合いが高くなる

遺伝子を抽出し（非同義置換やスプライシングの異常が中心となる）、そのノックアウトマウスの表現型がすでに報告されているか、さらに報告されていればその表現型を調査後、候補遺伝子を絞り込んでいった。また、場合によってはキャプチャーベイトに含まれていない因子の可能性があるので、ホモの変異が長距離にわたってみられる領域を検出し、その遺伝子領域も候補領域として残しておいた。それらの遺伝子を挟むようにプライマーを設計し、PCRによる増幅を行い、得られたバンドを精製、ダイレクトシーケンスにより、まずはFR マウス 8 個体、コントロールマウス 4 個体でそれぞれ解析を行なった。その後、可能性のある領域は、解析する FR マウスとコントロールマウスの個体数をさらに増やしていった。

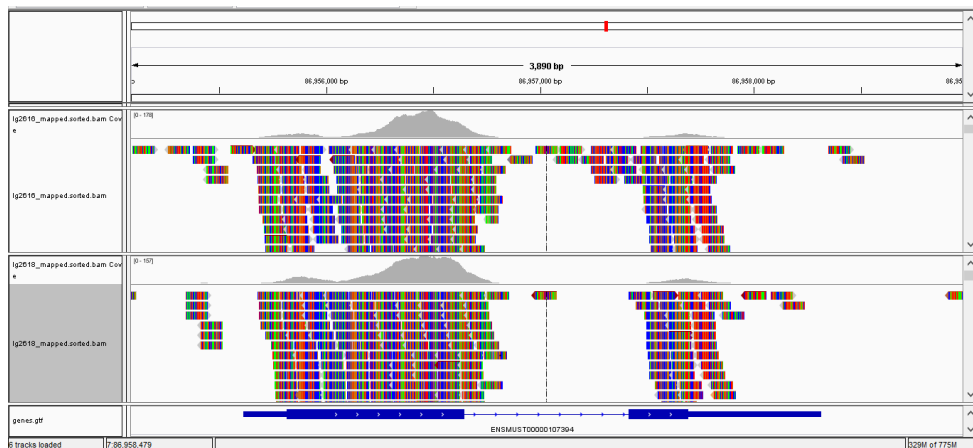
4) TaqMan アッセイ法による FR マウス遺伝子の SNP 解析

これまでの研究で FR マウス特有のホモ変異遺伝子を同定することは困難であったため、TaqMan アッセイ法による SNP 解析を行った。C57B1/6J 系統マウスと MSM マウスの交配を行いさらに戻し交配を行った後に得られたマウス胎仔（表現型を認める胎仔とそれらの同腹仔の 13 腹合計 74 胎仔）を用いた。プローブ中央付近に各 SNP を設定、5' 末端を異なる蛍光色素、3' 末端を消光物質で標識した 2 種類の TaqMan プローブを用いた。このプローブ存在下で SNP を含むゲノム領域を増幅すると SNP に対応した蛍光色素が遊離し蛍光を発する。この蛍光を測定することで SNP を同定した。

4 . 研究成果

1) FR マウスにおける既知の STD 原因遺伝子 (*DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *HES7*) の変異確認

すべての原因遺伝子 (*DLL3*, *MESP2*, *LFNG*, *HES7*) において FR マウス、野生型マウスともに変異は認められなかった。(例として *MESP2* に関するマッピングデータを示す。上段が FR マウス、下段が野生型マウスを示す)



2) FR マウスにおける既知の肋骨癒合に関与する遺伝子 (*MESP1 Jagged1 Notch1 Dvl1 Dvl2 Dvl3 Notch2 VANGL2 ROR2 FLNB TBX6 Wnt5a*) の変異確認

すべての遺伝子 (*MESP1 Jagged1 Notch1 Dvl1 Dvl2 Dvl3 Notch2 VANGL2 ROR2 FLNB TBX6 Wnt5a*) において FR マウスにホモの変異は認めなかった。(例として *Hes7* に関するマッピングデータを示す。上段が FR マウス、下段が野生型マウスを示す。)

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeuchi Yuto, Kito Akiyoshi, Itoh Shousaku, Naruse Haruna, Fujikawa Junji, Sadek Kadry Mahamed, Akiyama Shigehisa, Yamashiro Takashi, Wakisaka Satoshi, Abe Makoto	4. 巻 371
2. 論文標題 Kruppel-Like Factor 4 represses osteoblast differentiation via ciliary Hedgehog signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 417 ~ 425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2018.09.002	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 Fujikawa Junji, Takeuchi Yuto, Kanazawa Satoshi, Nomir Ahmed G., Kito Akiyoshi, Elkhashab Eman, Ghaleb Amr M., Yang Vincent W., Akiyama Shigehisa, Morisaki Ichijiro, Yamashiro Takashi, Wakisaka Satoshi, Abe Makoto	4. 巻 370
2. 論文標題 Kruppel-like factor 4 regulates matrix metalloproteinase and aggrecanase gene expression in chondrocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 441 ~ 449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-017-2674-0	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤川 順司, 佐伯 直哉, 笠川 あや, 下田 麻央, 赤松 由佳子, 安藤 早礎, 和田 真美, 安田 美貴子, 玉田 明英, 秋山 茂久
2. 発表標題 転写抑制因子Trps1における歯・骨格形成発現制御エンハンサーの探索
3. 学会等名 第36回日本障害者歯科学会総会および学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐伯 直哉, 藤川 順司, 赤松 由佳子, 下田 麻央, 笠川 あや, 関根 伸一, 秋山 茂久
2. 発表標題 核内レセプターNr1i2が骨芽細胞遺伝子を制御する
3. 学会等名 第36回日本障害者歯科学会総会および学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤川 順司, 玉田 明英, 永田 篤, 牧野 仁志, 村上 旬平, 秋山 茂久.
2. 発表標題 2p23欠失症候群の歯科的所見
3. 学会等名 第35回日本障害者歯科学会総会および学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鬼頭 昭吉, 藤川 順司, 田中 健司, 谷口 あや, 木多 佑歌, 下田 麻央, 関根 伸一, 村上 旬平, 秋山 茂久
2. 発表標題 KLF4は一次線毛の形成・維持に寄与し骨芽細胞の分化を抑制する
3. 学会等名 第34回日本障害者歯科学会総会および学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	秋山 茂久 (AKIYAMA Shigehisa) (00283797)	大阪大学・歯学部附属病院・准教授 (14401)	
研究分担者	村上 旬平 (MURAKAMI Jumpei) (70362689)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	
研究分担者	三浦 郁生 (MIURA Ikuo) (70624948)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発技師 (82401)	