

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09035

研究課題名(和文)骨・軟骨代謝制御に関する新規遺伝子群の網羅的機能解析

研究課題名(英文)Comprehensive functional analyses of novel genes involved in bone and cartilage metabolism

研究代表者

永井 琢哉 (Nagai, Takuya)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60768167

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)：我々は、骨粗鬆症などのロコモティブシンドロームの病因・病態解明のために、『可変型遺伝子トラップ法』により樹立した変異マウス系統を用いて、骨軟骨代謝に関する新規遺伝子探索の効率的なスクリーニングを実施している。EGTCデータベースから52の候補マウスラインにおいてX-gal染色、3D-CTによる骨形態計測や骨力学試験、血液生化学的検査などの解析を行い、42ライン(80.8%)に何らかの表現型異常を認めた。現在Lbr、Lima1、Tmem161aについて各種組織学的評価や骨軟骨代謝関連の遺伝子発現解析などより詳細な解析を行い、新規骨軟骨代謝関連遺伝子として同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が開発した可変型遺伝子トラップマウスを用いた骨軟骨に異常を来す新規遺伝子群のスクリーニングシステムは非常に効率的で、このスクリーニングで異常を認めたマウスラインは骨軟骨代謝における重要な遺伝子をトラップしている可能性が非常に高い。今後これらのトラップマウスはバイオリソースとして様々な骨軟骨代謝研究での有効活用が可能で、さらに、我々の対象としている遺伝子は過去にin vivoで骨軟骨代謝に関する十分な報告がない遺伝子ばかりを選別しているため、新たな骨軟骨代謝制御機序を解明できる可能性があり、今後新規骨粗鬆症薬の創薬にも貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：We have been conducting an efficient screening for novel genes involved in bone metabolism using mutant mouse lines established by the exchangeable gene trap method to elucidate the etiology and pathogenesis of locomotive syndrome such as osteoporosis. We analyzed 52 candidate mouse lines selected from the EGTC database by X-gal staining, 3D-CT bone morphometric analysis, biomechanical strength analysis, and blood biochemical tests, and found some phenotypic abnormalities in 42 lines (80.8%). Currently, Lbr, Lima1, and Tmem161a have been identified as novel genes related to bone metabolism through detailed analysis including various histological evaluations and gene expression analysis.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 骨粗鬆症 可変型遺伝子トラップ法 ロコモティブシンドローム 骨芽細胞 Lbr遺伝子 Lima1遺伝子 Tmem161a遺伝子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2007年に日本整形外科学会では、運動器の障害による「要介護の状態」や「要介護リスクの高い状態」を表す『ロコモティブシンドローム(運動器症候群:ロコモ)』という新しい疾患概念を提唱した。ロコモは本邦では現在4700万人以上の罹患が推定されており、その中で骨粗鬆症は1280万人を超え、超高齢社会が進むにつれてその数は増加の一途をたどると予想される。骨粗鬆症などの疾患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膨大な研究が行われているにも関わらず、その発症原因はいまだに十分な説明はされていない。骨粗鬆症の進行により、骨折や疼痛を伴い、寝たきり状態となることは患者本人の生活の質のみならず、医療経済面にも多大な影響を及ぼしている。高齢化社会の現代において、健康寿命を延伸の為に骨粗鬆症などのロコモの病因・病態説明が急務となっている。

2. 研究の目的

ヒト遺伝子の全ゲノム情報が解読・公開され、さらに種々の遺伝子ノックアウトマウスなどモデル生物が作製され、様々な疾患の病因・病態の解明に役立てられている。骨軟骨疾患の病因病態の解明においても例外ではなく、モデル生物の作製およびその解析は有用である。近年CRISPR/Cas9システムの開発により、ゲノム編集技術は大きく発展したが、我々が使用している可変型遺伝子トラップ法(Araki K, 1999, Taniwaki, 2005, Araki M, 2014)の最大の利点は「未知遺伝子の発見および機能解析」にある。我々はこの可変型遺伝子トラップマウスを用いた骨軟骨に異常を来す新規遺伝子群のスクリーニングシステムを開発してきた。詳細は、過去に *in vivo* で骨軟骨代謝に関する十分な報告がない遺伝子を選別し、かつ骨軟骨に発現のあるトラップマウスを作製し、 μ CTや骨形態計測、骨力学試験、組織学的評価を行うことである(Kurogi, 2017)。このスクリーニングで異常を認めたマウスラインは骨軟骨代謝における重要な遺伝子をトラップしている可能性が非常に高い。我々の対象としている遺伝子は、新たな骨軟骨代謝制御機序を解明できる可能性があり、有意な骨軟骨表現型異常を認めた遺伝子群について詳細な解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

EGTC(Exchangeable Gene Trap Clones)データベース内の1278トラップクローンから骨軟骨代謝に関与する報告のある既知遺伝子をトラップしたラインを除外し、1次スクリーニングにおいて「EST profile」:骨軟骨において発現が強いラインを選出、「X-gal 染色」:トラップベクターは β geo 遺伝子を含み X-gal 染色にてトラップした遺伝子の発現時期や組織特異性を確認でき、骨軟骨に発現が強いラインを選出、「Related article」:骨軟骨代謝に間接的に影響を及ぼしそうな既知遺伝子、および「Novel gene」:これまでに報告のない遺伝子をトラップしたラインを選出、の4つの基準から決定された52の候補ラインを選択した。さらに2次スクリーニングでは、骨形態計測、骨力学試験、骨 X-gal 染色などを実施した。

・成長曲線/血液検査: 生後定期的に体重測定を行い、トラップした遺伝子の成長に与える影響を評価する。また血液検査にて Ca・IP・ALP など骨代謝関連因子の定量を行った。

・3D-CT(マイクロフォーカス X線 CT システム L090H, Comscan): サンプル大腿骨を撮影し、奇形や成長障害の評価を行う。また BMD 値に変換した画像で、全体的な骨表現型を評価した。

- ・骨形態計測(3D-Bon, Ratoc):BMD 解析 9 項目、皮質骨解析 11 項目、海綿骨解析 18 項目の合計 38 項目について統計学的解析を行い評価した。
- ・骨力学試験(小型卓上試験機 EZ Test-S, SHIMADZU): サンプル大腿骨を試験台に設置し 3 点曲げ試験を行い、試験力や応力、エネルギーなどを最大点と破断点で評価した。
- ・組織学的解析:HE 染色、X-gal 染色、ALP 染色、トルイジンブルー染色、骨軟骨関連の免疫染色などの各種染色を行い、骨軟骨組織の形態観察を行った。
- ・骨軟骨代謝関連遺伝子の解析:マウスの骨軟骨組織から mRNA を抽出し、骨軟骨代謝に関連する遺伝子群の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。
- ・骨芽細胞培養および機能解析: マウス P4-5 の頭蓋骨から初代骨芽細胞培養を行い、この培養細胞を用いて細胞形態の観察、ALP 染色を用いた骨形成能の評価を行った。また骨代謝関連遺伝子群をリアルタイム PCR にて定量し、培養細胞の機能を解析した。
- ・遺伝子ノックダウン、ノックアウト:骨芽細胞様株 MC3T3-e1 を用いて siRNA によるノックダウン実験や CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックアウトを行い、この培養細胞を用いて細胞形態の観察、ALP 染色を用いた骨形成能の評価を行った。また骨代謝関連遺伝子群をリアルタイム PCR にて定量し、培養細胞の機能を解析した。

4. 研究成果

1 次スクリーニングで選択した 52 トラップラインのうちオスでは 42 トラップライン (80.8%) において骨形態計測または骨力学試験のいずれかで異常を示した。これらのトラップラインのうち Lbr、Lima1、Tmem161a トラップラインについて詳細な解析を行った。

(1)Lamin B receptor(Lbr)

Lbr は胎児水腫や短肢を特徴とする Greenberg 骨異形成症の原因遺伝子ともされている。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、骨性の癒合趾が見られた(図 1)。

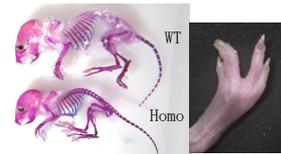


図1 マウス骨格標本と癒合趾

Greenberg 骨異形成症で見られるような明らかな短肢症は観察されなかつた。

二次スクリーニングの結果では Homo マウスにおいて、明らかな骨量減少、骨強度低下を呈していた(図 2)。大腿骨を用いた骨代謝関連遺伝子の発現解析では BMP2、Runx2、Osterix、ALP、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(図 3)。

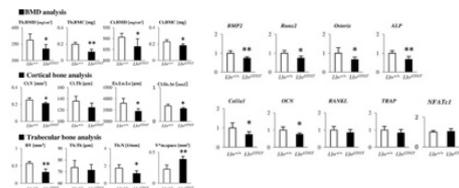


図2 骨形態計測

図3 大腿骨の骨関連遺伝子発現

一方 RANKL や TRAP や NFATc1 などの破骨細胞関連遺伝子には明らかな差は認められなかつた。初代骨芽細胞培養では Homo において ALP 染色やアリザリンレッド染色での染色性の低下を認めた(図 4)。

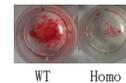


図4 初代骨芽細胞培養のアリザリンレッド染色

以上のことから Lbr が骨代謝に影響を与える因子であると考えられ、また多数癒合趾が見られることから、癒合趾のモデルマウスとなる可能性が示唆された。

(2) LIM domain and actin-binding protein1(Lima1)/Epithelial protein lost in neoplasm β (EPLIN β)

EPLIN は、細胞接着に関与し、カドヘリン-カテニン複合体とアクチン線維の両方に結合することで細胞骨格を安定化させることから、細胞の移動を調節し、腫瘍の進行や転移に関係していると報告されている。二次スクリーニングの結果では Homo マウスにおいて、明らかな骨量減少、骨強度低下を呈していた(図 5)。また Homo マウスにおいて ALP 染色が薄く、骨形成能が低下していた。OB カドヘリンは骨芽細胞を含む線維芽細胞を含む間葉系細胞で発現しているが、Homo マウスの骨組織での OB カドヘリンの発現低下を認め、電子顕微鏡では骨芽細胞間の距離が開いていた。これらの結果から *EPLIN* が欠損することにより OB カドヘリン-カテニン複合体を連結できず、細胞接着に異常を来し、骨形成低下が生じたと考えられた。

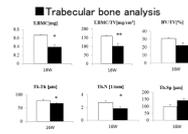


図5 骨形態計測

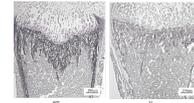


図6 ALP染色

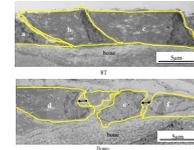


図7 骨芽細胞の電子顕微鏡

(3) Transmembrane161a(Tmem161a)

Tmem161a は酸化ストレスやアポトーシスに関与する遺伝子として報告されているが、骨軟骨代謝に対する報告はない。成長曲線では 2-4 週で大きな傾向があったが、有意差はなかった。骨形態計測では Homo マウスで皮質骨骨密度や皮質骨幅が大きく、骨力学試験でも骨強度増大を認めた(図 8)。初代骨芽細胞培養では Homo マウスの培養細胞で Osterix の発現亢進を認め、ALP 活性や石灰化が亢進していた。さらに siRNA のノックダウンも同様に ALP 活性が亢進している一方、Tmem161a の一過性過剰発現では ALP 活性が低下した。CRISP/Cas9 による MC3T3-e1 のノックアウト細胞株を作製し、同様に骨分化させると osterix は発現亢進し、ALP 活性も高値を示した(図 9)。過酸化水素による酸化ストレス付加に対しても骨分化能が維持され(図 10)、Tmem161a は骨芽細胞の機能制御に関与し、酸化ストレスへの影響も示唆された。

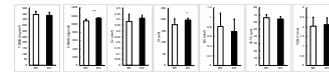


図8 骨形態計測

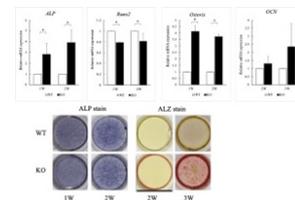


図9 KO細胞(CRISP/Cas9)での骨分化培養

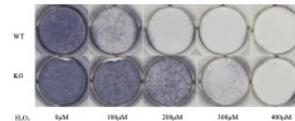


図10 過酸化水素投与後ALP stain

上記の様に EGTC データベースを用いた骨軟骨表現型スクリーニングは非常に効率的で、今までに骨軟骨代謝で十分な報告のない遺伝子を対象としているため、骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子の同定に有効である。本スクリーニングで異常を認めたマウスラインの詳細な解析を行うことで今後さらなる骨軟骨代謝研究への貢献が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永井 琢哉
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a 欠損トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井 琢哉
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a 欠損トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井 琢哉
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a 欠損トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関本 朝久
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いた新規骨代謝関連遺伝子探索の効率的なスクリーニングシステムの開発
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 洋一朗
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法で作製した Itp1 遺伝子欠損マウスは著明な骨量減少を呈する
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井琢哉
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161a 欠損トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第91回日本整形外科学術集会総会（神戸コンベンションセンター）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関本朝久、永井琢哉
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第91回日本整形外科学術集会総会（神戸コンベンションセンター）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口洋一郎、関本朝久、永井琢哉
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いた新規骨代謝関連遺伝子群の網羅的機能解析
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会（奈良春日野国際フォーラム）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井琢哉
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別した transmembrane protein 161A 遺伝子トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会(奈良春日野国際フォーラム)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永井琢哉
2. 発表標題 骨表現型スクリーニングで選別したTmem161A 遺伝子トラップマウスは明らかな骨量増加を呈する
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会(長崎ブリックホール)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口洋一郎、関本朝久、永井琢哉
2. 発表標題 可変型遺伝子トラップ法を用いた新規骨代謝関連遺伝子群の網羅的機能解析
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会(長崎ブリックホール)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Nagai
2. 発表標題 Analyses of Tmem161a function in bone metabolism using the exchangeable gene trap mutagenesis show significant bone ingrowth
3. 学会等名 29th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting(QueensTown NZ) (国際学会)
4. 発表年 2018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	帖佐 悦男 (Chosa Etsuo) (00236837)	宮崎大学・医学部・教授 (17601)	
研究分担者	船元 太郎 (Funamoto Taro) (20404452)	宮崎大学・医学部・講師 (17601)	
研究分担者	関本 朝久 (Sekimoto Tomohisa) (60305000)	宮崎大学・医学部・講師 (17601)	
研究分担者	荒木 正健 (Araki Masatake) (80271609)	熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授 (17401)	
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
---------	---------