

平成22年 10月18日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19500370
研究課題名（和文） 新規炎症性関節炎モデルマウス、Ali18の原因遺伝子の探索
研究課題名（英文） Identification and characterization of the Ali18 mutation, which causes inflammatory arthritis in mice

研究代表者

阿部 幸一郎（ABE KOICHIRO）

東海大学・医学部・講師

研究者番号：900294123

研究成果の概要（和文）：マウスでランダムに突然変異を誘発させることで、炎症性関節炎を引き起こす Ali18 系統が確立された。Ali18 変異を同定するために、遺伝的解析及び候補遺伝子の DNA 配列の決定を行った。その結果、第4番染色体に位置するリン酸化酵素のコード領域に突然変異が検出された。リン酸化は細胞のシグナル伝達に関係があり、Ali18 変異による増殖シグナルの増幅が関節炎発症に関与すると考えられた。また、Ali18 シグナルを阻害すれば炎症を抑制できる効果が期待された。

研究成果の概要（英文）：In a large-scale random mutagenesis project in mice, the Ali18 mutant strain was isolated because of inflammatory arthritis. To characterize the Ali18 mutation, we employed genetic mapping and positional candidate cloning. Subsequently, the Ali18 mutation was found in the coding region of a protein kinase on chromosome 4. Because protein kinases play an important role in signal transduction, the Ali18 mutation was thought to amplify cell proliferation signals. In this context, inhibitory drugs for the Ali18 signal cascade may silence aggressive inflammation in humans.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：病態モデル

1. 研究開始当初の背景

65歳以上では全体の50%が何らかの関節への痛みを伴った問題を抱えているとされており、これからの高齢者社会において

その医療費は社会を強く圧迫すると予想される。しかしながら、ほとんどの関節炎は環境因子と遺伝的因子が複雑に絡み合った多因子性疾患であり、その効果的な治療は研究開始当初も現在も困難である。

2. 研究の目的

人間では遺伝的均一で環境をコントロールしたサンプルを得ることは不可能であるので、炎症性関節炎を引き起こす単一遺伝子を同定することは困難である。本研究では均一な遺伝的背景で飼育環境を厳密にコントロールが可能な実験モデル動物を利用して炎症性関節炎の病態を解明し、新規治療薬や治療法の開発を目的とする。具体的には、化学変異原 *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU)によって誘導された新規炎症性関節炎モデルマウス、*Ali18* (写真) の原因遺伝子同定を当面の到達点と設定し、さらにその分子病態メカニズムを解明することによって治療薬、治療法の開発へと結びつける事を目標とする。そのために本研究では、遺伝学的手法によって *Ali18* 位置するゲノム上の候補領域を特定するとともに、その範囲内のゲノム構造と遺伝子群を詳細に解析し、さらに候補遺伝子の塩基配列決定とポジショナルクローニングを並行して行うことによって原因遺伝子の同定を試みた。



3. 研究の方法

(1) マウス系統

Ali18 変異マウス系統は、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において単離された (Abe et al., *Mammalian Genome* 2006, 17, 915-926)。*Ali18* 系統のオリジナルな遺伝的背景は C3HeB/FeJ (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) で、*Ali18/+*マウスを C3H $+/+$ マウスに 20 回以上戻し交配することによって維持された。*Ali18/Ali18* マウスは、*Ali18/+*の異系交配に得られた。その後は *Ali18/Ali18* マウスの異系交配によって維持された。遺伝的マッピングには、*Ali18/Ali18*マウスを野生型 C57BL/6J マウス (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) と外交配させ、得られた F1-*Ali18/+*マウスをさらに異系交配して F2 マウスを得た。

(2) *Ali18* 変異の遺伝的地図作製

遺伝的背景が C3H の *Ali18* ホモマウス (C3H-*Ali18/Ali18*) を B6 の野生型 (B6 $+/+$) と交配させ、その産仔 (C3B6-*Ali18/+*) を同系交配した F2 で関節炎を発症したマウスのみで連鎖解析を行った。F2 マウスは 3 ヶ月齢以降に関節炎の強度を肉眼で点数化し、1 以上のスコアの個体を遺伝型解析に用いた。該当する個体の尾より、標準的なプロテアーゼ K を用いた方法によってゲノム DNA を抽出した (Manipulating mouse embryo, ISBN 0-87969-384-3)。マイクロサテライト配列を利用した Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) の解析における PCR の条件は以前に記載した (Abe et al., *Mammalian Genome* 2006, 17, 915-926)。用いたマーカーはほとんどが公開されたものである (Dietrich et al., *Genetics* 1992, 131, 423-447)。

(3) Positional Candidate Cloning

PosMed (Kobayashi and Toyoda, *Bioinformatics* 2008, 24, 1002-10) を用いて、arthritis や bone marrow などのキーワードにより候補遺伝子を選出した。*Ali18/Ali18* と C3HeB/FeJ マウスよりゲノム DNA を抽出し、それぞれ 3 匹程度をプールして PCR の鋳型とした。候補遺伝子のタンパク質をコードするエクソンの領域の配列を決定するためのプライマー配列は、ExonPrimer

(<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/ExonPrimer.html>) を用いて設定された。PCR 産物は Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製され、通常のサンガー法によりシーケンサー (ABI3100 Genetic Analyzer) を用いて決定された。得られた配列データは GENETYX MAC version 12.2.7 (GENETYX cooperation) および SNP Spot (DYNACOM) ソフトウェアによって、配列解析が行われた。

4. 研究成果

Ali18 変異マウスは、化学変異原である *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) により誘発され 表現型を指標として単離された突然変異系統である。ENU は、雄マウスに腹腔内投与することにより生殖細胞に高率で点突然変異を誘発することが知られている。*Ali18* 変異マウスの病態メカニズムを解明するためには、ポジショナルクローニング法により原因となる突然変異を検出することが最も重要で効果的である。マウスにおけるポジショナルクローニングでは、まず遺伝的背景の異なる野生型系統に変異系統

を交配させ、その産仔について系統特異的な DNA 多型マーカーを用いて遺伝的マッピングを行う。これにより、原因遺伝子の近傍に位置する多型マーカーが明らかになり、大まかな染色体上の位置が判明する。原因となる突然変異を検出するためには、さらにその突然変異が位置するゲノム上の領域を遺伝的マッピングおよび物理的地図作製などにより詳細に解析する必要がある。しかしながら、Ali18 変異のポジショナルクローニングを進めるには大きな障害があった。Ali18 マウスは C3HeB/FeJ (C3H) 系統由来であるが、これを C57BL/6J (B6) 系統などの別な系統と交配させると次世代の Ali18 ヘテロマウス (Ali18/+) の表現型が完全に消えてしまうのである。幸い Ali18 ホモマウス (Ali18/Ali18) の表現型は抑制されない個体がいることから、大まかな遺伝的マッピングは可能であった。しかし、さらなる領域の限定には大きな問題となった。つまり突然変異を限定しようとした場合にはその境界を規定する多型マーカーが重要になるのだが、その境界を決める組み換えが表現型と呼応するかどうか不明になってしまうのである。このような遺伝的背景による表現型の変化は、他の変異マウスあるいはトランスジェニックマウスにおいても多数知られている。その原因として考えられるのは、遺伝的背景における塩基配列の多型が原因遺伝子のシグナル経路にはたらいっているために表現型のアウトプットが変化することである。そのような遺伝的背景に存在し、表現型を変化させる原因となる遺伝子は修飾遺伝子 (modifier gene) と呼ばれる。修飾遺伝子は、逆に考えると未知の遺伝子の伝達経路の解析には非常に有用である。Ali18 の修飾遺伝子の染色体上の位置を決定することにより、Ali18 原因遺伝子の存在する領域を限定するために用いるとともに、その伝達経路に存在する遺伝子群の候補の絞り込みに用いることが可能である。

F2 マウスの連鎖解析の結果、Ali18 原因遺伝子は染色体 4 番にマップされた。しかしながら、Ali18 の最も近傍に位置するマーカーでタイピングを行っても、全体の約 90%の個体はホモで残りの 10%はヘテロであった。このことから、B6 ゲノムには Ali18 を抑制するような修飾遺伝子群が存在し、これらの遺伝子群が存在する領域が C3H だった場合に Ali18/+の関節炎が現れるという仮説が考えられた。この仮説を検証するため、22 匹の関節炎となった F2 の Ali18/+マウスのゲノム DNA を 66 の常染色体に散在するマイクロサテライトマーカーを用いて遺伝子型を決定した。その結果、興味深いことに第 1 染色体と第 3 染色体に

位置する複数のマーカーで、C3H の遺伝子型と有意に相関が認められた (χ 自乗検定、P 値 0.0001 以下)。また、コントロールに用いた表現型陽性の Ali18/Ali18 個体では同じマーカーで有意差はこのことから、B6 に存在する Ali18 の修飾遺伝子群はごく少数のゲノム領域に存在することが示唆された。そこでさらに規模を拡張して、267 匹の F2 マウスと Ali18/Ali18 への戻し交配を行った 174 匹の N2 マウスについて、ゲノムワイドな 153 の SNP マーカーについて遺伝子型を決定するとともに関節炎の表現型を解析した。その結果、N2 マウスの集団では第 1 番と第 15 番染色体に位置するマーカーにおいて優位な相関が認められた (Permutation test, P 値 0.05 以下)。F2 マウスの集団では有意な相関は認められなかったが、第 3 番染色体のマーカーにおいて示唆的な相関が認められた。先の F2Ali18 マウスにおける結果と第一番染色体と第 3 番染色体については重複した結果が得られた。また、N2 マウスの集団において関節炎を呈しない Ali18/Ali18 マウスと関節炎を呈した Ali18/+マウスの第 1 番と 15 番染色体の遺伝子型を調べたところ、Ali18/Ali18 ではほとんど全てがヘテロ遺伝子型であるのに対して Ali18/+ではほとんどが C3H 由来のホモであった。これらの結果より、第 1 番、3 番、15 番の領域が、Ali18 の修飾遺伝子が存在する候補領域であることが強く示唆された。興味深いことにこれらの領域には、リュウマチなどの関節炎の患者の遺伝子型と相関が認められる MHC 領域が存在する第 17 番染色体は含まれていない。このことは、成熟リンパ球が Ali18 マウスの関節炎の発症には寄与しないという先の報告を指示する結果であり (参考文献 3)、Ali18 は新規の経路によって関節炎を発症することが示唆された。また、これらの候補領域には、指やつま先の皮膚や爪が腐食する疾患である junctional epidermolysis bullosa の原因遺伝子である Laminin gamma-2 (1 番染色体) や破骨細胞で発現して骨代謝に重要なはたらきをする Cathepsin K (3 番染色体) が含まれる。第 15 番染色体には、顆粒球の分化に重要な Neutrophil cytosolic factor 4 や Colony stimulating factor 2 receptor、T 細胞で重要な機能を持つ Interleukin 2 receptor beta chain などが存在する。これらの候補遺伝子については、これらの領域のコンジェニック系統の作製やマイクロアレイ解析によってさらに Ali18 マウスの関節炎発症における機能を詳細に解析する予定である。また、Ali18 の修飾遺伝子の領域が特定されたことで、原因遺伝子探索について大きく貢献することが期待される。

*Ali18*変異は第4番染色体の遠位にマップされた (Abe et al., Mammalian Genome 2006, 17, 915-926)。さらに減数分裂を700程度まで増やす過程で、候補領域付近のマイクロサテライトマーカを新た *Ali18* に加えることにより、候補領域は *D4Neu21* と *D4Neu26* の間の領域 200 kb 程度まで縮小された。そこで、このゲノム領域をカバーする BAC (Bacterial Artificial Chromosome) クローンにより物理的地図を作製し、さらにそのゲノム領域によってマウスの炎症性関節炎を回復することが可能かどうかを知るために、BAC トランスジェニックレスキューを行った。これは目的の BAC DNA よりトランスジェニックマウス系統を作出し、それを *Ali18* 系統と交配させて機能回復が生じるかを確認する。もし、BAC DNA が原因遺伝子を含んでいれば *Ali18* の表現型が正常な野生型に戻ることが予想される。しかしながら、この方法では突然変異が機能欠損型の場合は機能するが、機能亢進型はレスキューすることができないという問題点がある。候補領域を含む2つの BAC クローン, RP24-330N3 と RP23-265N18, について BAC トランスジェニック系統を作出した。BAC は C57BL/6 由来の DNA を用い、マイクロインジェクションする受精卵には *Ali18* マウスと同じ遺伝的背景である C3H 系統を用いた。このことにより B6 と C3H を識別するマイクロサテライトマーカである *D4Neu21* と *D4Neu26* によってトランスジーンの有無が確認できた。作出されたトランスジェニック系統と *Ali18* マウスとの交配を行った結果、トランスジーンを持つ *Ali18* マウスを得た。それらのマウスは複数において *Ali18* ヘテロで炎症性関節炎を呈し、表現型の回復は認められなかった。さらに減数分裂の解析を継続する過程で、*D4Neu21* と *D4Neu26* の間の領域を候補領域とするには符号しない組み換え体が複数得られた。これらは *Ali18* の修飾遺伝子群 (Abe et al., Mammalian Genome 2009, 20, 152-161) の影響により候補領域の境界を限定することが困難であることが示唆された。つまり炎症性関節炎を呈する個体には、修飾遺伝子の組み合わせにより *Ali18* の遺伝型がヘテロであるかホモであるかを厳密に特定できない。そのことによって、候補領域の縮小が困難であると考えられた。

Ali18 の候補領域では遺伝的背景からの影響により関節炎の表現型からヘテロとホモマウスの判別ができないために、その境界の決定が困難である。しかしながら、この領域と C3H ゲノムとの相関は明らかかなことから、BL6 がホモとなる領域には突然変異が存在する可能性はない。そこで

BL6 がホモとなっている領域からヘテロとなる境界を確実な候補領域とした。その結果、*D4Neu12* と *D4Mit134* には含まれる約 3 Mb の領域が候補領域として考えられた。そこで、PosMed と呼ばれる文献データベース (<http://omicspace.riken.jp/PosMed/>) によってこの領域内に位置する遺伝子群の文献情報より候補遺伝子の絞り込みを行った。関節炎や骨髄などのキーワードによりサーチした結果、数個の候補遺伝子が検出された。野生型と *Ali18/Ali18* 個体のゲノム DNA を用いて、それらの遺伝子のタンパク質コーディング領域の DNA 配列決定をサンガー法により行った。その結果、*Ali18/Ali18* ではタンパク質リン酸化酵素のコーディング領域においてアデニンよりグアニンへの置換が認められた。この置換により制限酵素 Mbo II の認識部位が消失することが予想されたので、PCR 生成物を Mbo II で切断してゲル電気泳動を行った。その結果、予想通り C3H と B6 の野生型では切断が生じるが、*Ali18* 系統の交配より得られたヘテロやホモマウスにおいては切断されないバンドパターンが認められた。Mbo II 切断による遺伝子型決定は、交配のパターンと関節炎の表現型に完全に一致した。

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 9 件)

- ① 阿部幸一郎, Matthias Klawns, Akira Narita, Tetsuaki Kimura, Kenji Imai, Minoru Kimura, Isabel Rubio-Aliaga, Sibylle Wagner, Thilo Jakob, Martin Hrabé de Angelis, Genome-wide search for genes that modulate inflammatory arthritis caused by *Ali18* mutation in mice, Mammalian Genome、査読有、Vol. 20、2009、pp. 152-161
- ② Chikarra Kokubu, Kyoji Horie, 阿部幸一郎, Ryoji Ikeda, Sumi Mizuno, Yoshihiro Uno, Sanae Ogiwara, Masato Ohtsuka, Ayako Isotani, Masaru Okabe, Kenji Imai, Junji Takeda, A transposon-based chromosomal engineering method to survey a large cis-landscape in mice, Nature Genetics、査読有、Vol. 41、2009、pp. 946-952
- ③ Katy Everett, Tom D Bunney, Youngdae Yoon, Fernando Rodoriguez Lima, Richard Harris, Paul C Driscoll, 阿部幸一郎, Helmut Fuchs,

- Martin Hrabé de Angelis, Phillip Yu, Wohnwa Cho, Matilda Katan, Characterization of phospholipase gamma C enzymes with gain-of-mutations, Journal of Biological Chemistry, 査読有、Vol.284, 2009, pp.2083-2093
- ④ 阿部幸一郎, Philipp Yu, Mammalian mutant resources for therapeutic challenges, Current Pharmaceutical Biotechnology, 査読有(総説), Vol.10, 2009, pp.252-260
- ⑤ 阿部幸一郎, Minoru Kimura, Ken-ichi Yamamura, Mammalian mutant resources for therapeutic challenges, Current Pharmaceutical Biotechnology, 査読無(Editorial), Vol.10, 2009, pp.197
- ⑥ 阿部幸一郎, S. Wechs, S. Kalaydjiev, T. J. Franz, D. H. Busch, H. Fuchs, D. Soewarto, H. Behrendt, S. Wagner, T. Jakob, M. Hrabé de Angelis, Novel lymphocyte-independent mechanisms to initiate inflammatory arthritis via bone marrow-derived cells of *Ali18* mutant mice, Rheumatology, 査読有、Vol.47, 2008, pp.292-300
- ⑦ Thomas S. Lisse, Frank Thiele, Helmut Fuchs, Wolfgang Hans, Gerhard K. H. Przemeck, 阿部幸一郎, Birgit Rathkolb, Leticia Quintanilla-Martinez, Gabriele Holzwimmer, Miep Helfrich, Eckhard Wolf, Stuart H. Ralston, Martin Hrabé de Angelis, ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfecta, PLoS Genetics, 査読有、Vol.4, 2008, e7
- ⑧ Thomas Lisse, 阿部幸一郎, Helmut Fuchs, Martin Hrabé de Angelis, Isolation and characterization of the AGA2 mouse: A new murine model for osteogenesis imperfecta, Calcified Tissue International, 査読有、Vol.78, Suppl.1, 2006, S166-167
- ⑨ Isabel Rubio-Aliaga, Dian Soewarto, Sibylle Wagner, Mathias Klaften, Helmut Fuchs, Svetoslav Kalaydjiev, Dirk Busch, Martina Klempt, Birgit Rathkolb, Eckhard Wolf, 阿部幸一郎, Stefan Zeiser, Gerhard K. H. Przemeck, Johannes Beckers, and Martin Hrabé de Angelis, A genetic screen for modifiers of the Delta1-dependent Notch signaling function in the mouse, Genetics,

査読有、Vol.175, 2007, pp.1451-1463

[学会発表] (計5件)

- ① 阿部幸一郎, Fuchs H, Lisse T, Hans W, Imai K, Hrabé de Angelis M, ENUにより誘発された新規炎症性疾患モデルAli18変異マウスの解析、第54回日本実験動物学会総会、2007、東京
- ② 阿部幸一郎, Klaften M, Jakob T, 成田暁, 今井賢治, Rubio-Aliaga I, Wagner S, Hrabé de Angelis M, Genome-wide search for genes which modulate inflammatory arthritis caused by Ali18 mutation in mice, 21st International Mammalian Genome Conference, Kyoto Japan, 2007
- ③ 阿部幸一郎, Sabine Wechs, Svetoslav Kalaydjiev, Tobias Franz, Dirk Busch, Helmut Fuchs, Dian Soewarto, Sibylle Wagner, Thilo Jakob, Martin Hrabé de Angelis, 炎症性関節炎を呈するAli18変異マウスにおけるリンパ球非依存的病態発症機構、第55回日本実験動物学会総会、2008、仙台
- ④ 阿部幸一郎, Mathias Klaften, 成田暁, 木村哲晃, 木村穰, Isabel Rubio-Aliaga, Sibylle Wagner, Thilo Jakob, Martin Hrabé de Angelis, Ali18変異マウスの炎症性関節炎を修飾する遺伝子群のゲノムワイドな探索、第56回日本実験動物学会総会、2009、大宮
- ⑤ 阿部幸一郎, Helmut Fuchs, Auke Boersma, Philipp Yu, Svetoslav Kalaydjiev, Matthias Klaften, Thure Adler, Wolfgang Hans, Birgit Rathkolb, Cornelia Prehn, Jurek Adamski, Dirk Busch, Eckhard Wolf, Valerie Gailus Durner, Matilda Katan, Susan Marschall, Sibylle Wagner, Martin Hrabé de Angelis, A novel ENU-induced mutation in phospholipase C gamma 2 causes inflammatory arthritis, metabolic defects, and in vitro infertility in the mouse, 23rd International Mammalian Genome Conference, La Jolla, California, 2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：炎症性疾患又は骨粗鬆症のスクリーニング方法

発明者：阿部幸一郎、マーティン フラベ
デ アンゲリス、ヘルムット フックス

権利者：学校法人東海大学

種類：特許

番号：特願 2010 - 165551

出願年月日：2010年7月23日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://abe.med.u-tokai.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部幸一郎 (KOICHIRO ABE)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：90294123

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：