

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21220010

研究課題名(和文) MSM/Msマウスのユニークな表現型の遺伝学的解析

研究課題名(英文) Genetic studies on unique phenotypes in MSM/Ms mouse strain

研究代表者

山村 研一 (Yamamura, Ken-ichi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授

研究者番号：90115197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,300,000円、(間接経費) 49,590,000円

研究成果の概要(和文)：MSM/Msマウスのユニークな表現型のうち「活発な自発運動」については、視床、中脳、橋、延髄が互いに関連して関与することを明らかにした。疾患抵抗性のうち「膵炎」については、高度に発現誘導されるSpink3が、その抵抗性に関与すること、炎症に関わる遺伝子群はほとんど関与しないことを明らかにした。「糖尿病」については、MODY(Maturity-onset diabetes of the young)の原因遺伝子であるHNF1 α 、HNF1 β 、HNF4 α 、Pdx1、NeuroD、Gckについて、貴重な研究リソースとなるノックアウト及びヒト化マウスを作製することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In MSM/Ms mouse, we showed that coordinate function of thalamus, midbrain, pons, and medulla was essential for its agility. In addition, high induction of Spink3 was involved in resistance to cerulein-induced pancreatitis. Furthermore, we succeeded to create knock out and knock-in mice in MODY associated genes including HNF1 α , HNF1 β , HNF4 α , Pdx1, NeuroD, Gck, that become valuable resources in research community.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：野生マウス 膵炎 糖尿病 行動パターン ヒト化マウス

1. 研究開始当初の背景

日本産野生マウス由来の MSM/Ms や JF1 マウスは、B6/J マウス等と対比して、きわめてユニークな表現型を示す。例えば、活発な自発運動、ウレタン誘発による肺がん抵抗性(Miyashita et al. Jpn. J. Cancer Res. 78:494-8, 1987)、高脂肪食時の肥満・糖尿病等に対する抵抗性(Kobayashi et al. J Nutr Biochem 15:614-21, 2004)である。ゲノム配列の違いから抵抗性/感受性等の遺伝的メカニズムが、B6/J 等とは異なっていることが推測され、疾患感受性/抵抗性も含むユニークな表現型の遺伝的機序を明らかにする上で、実験動物学的に見てもきわめて貴重な研究対象である。申請者らは、MSM/Ms マウスから ES 細胞の樹立に成功し、きわめて効率よく生殖キメラを作製する方法を確立した。また、マウス遺伝子を完全破壊後に、望みの遺伝子、例えばヒト相同遺伝子、で置換することのできる「可変型相同組換え法」も開発していた。

2. 研究の目的

本研究では、MSM/Ms マウスの特徴的な表現型に着目して、以下のプロジェクトを実施することとした。第1は、このマウスの最大の特徴である「**活発な自発運動の遺伝学的解析**」である。これまでの予備実験から、脳内の MSM 細胞の分布によって行動が規定されていることを示唆している。これを利用し、この自発運動にかかわる脳内の領域をまず絞り、その領域で発現している遺伝子を同定し、最終的にはノックアウトマウスを作製して確定することとした。第2は、「**疾患感受性/抵抗性の遺伝学的解析**」である。ここでは2つの疾患に焦点を当てた。一つは、申請者らの研究室で明らかにした「**膵炎感受性の遺伝学的解析**」である。膵炎に関するファクターとしては、(1)膵炎の直接原因である Prss1、(2)Spink3、(3)炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、(4)抗炎症性サイトカインである TGF- β 、IL-13 等が考えられる。これらの発現パターンを詳細に解析し、関与遺伝子を明らかにする。二つ目は「**糖尿病抵抗性**」に関する研究である。すでに、Kobayashi らにより、MSM/Ms は高脂肪食による肥満及び糖尿病に対して抵抗性であることが示されたが、抵抗性の原因は不明である。本研究ではヒトの糖尿病ですでに原因遺伝子が明らかになっている MODY(Maturity-onset diabetes of the young) に焦点を当てた。

3. 研究の方法

(1)「活発な自発運動の遺伝学的解析」(荒木喜、竹田、若菜)

全体像としては、キメラマウスの作製、脳内の MSM/Ms 由来の細胞の分布と行動パターンの相関関係の解析と関連領域の同定、関連領域での遺伝子探索と絞り込み、絞り込んだ遺伝子破壊マウスの作製と解析、による活発な自発運動に関与する遺伝子の同定である。

CAG-EGFP を導入した MSM ES(MSM ES-EGFP)細胞を、蛍光のない XY 胚盤胞に注入してキメラを作製すれば、MSM 由来の細胞が蛍光を発し区別できるようになる。キメラマウスを用いて、open-field test、light/dark transition test および home-cage activity test を行い、行動パターンと脳における MSM 由来の細胞の分布との相関を解析する。MSM の行動に関与する脳の領域を用いて、マイクロアレイ解析により、関与遺伝子を選別する。そして、これらの遺伝子の破壊マウスを作製し、行動を解析し、活発な行動に関与する領域とその責任遺伝子を同定する。

(2)「疾患の感受性・抵抗性に関する遺伝学的研究」

「膵炎・膵がんの感受性/抵抗性の遺伝学的解析」

MSM/Ms が感受性で B6 が抵抗性である。既述した感受性/抵抗性にかかわる遺伝子に焦点を当てる。セルレイン投与前後におけるこれらの発現パターンの解析を行い、違いのある遺伝子について解析を進める。

「糖尿病の抵抗性の遺伝学的解析」

MODY に着目し、それらの6つの原因遺伝子のノックアウトマウスあるいはヒト正常及び変異遺伝子を導入したマウスを作製し、解析を行う。

4. 研究成果

(1)「活発な自発運動」の遺伝学的解析

MSM/Ms 由来の細胞をマーキングするため、ES 細胞株 MoI/MSM-1 に CAG-NLS-IacZ-IRES-Puro-pA を導入したのち、キメラマウスを作製し、以後の行動解析に用いた。

まず、MSM がコントロールとしての B6/J に対して、どの行動表現型がそれぞれに特徴的なのかについて検討した。その結果、light/dark transition test (LD)において明箱進入潜時が長

く、移動活動量が低く、移動速度も遅いことから情動性および不安が高いと推察された。open-field test (OF)においては移動距離が短く、中心滞在率が低く、注意深い、いったん動き出すと俊敏性に優れていることが推察された。home-cage activity test (HA)においては総活動量には大きな差がないが、暗期の活動性が高く、夜行性の特徴がより強いことが分かった。このような行動パターンの違いを明確に示したのは初めてである。

この基礎データをもとに、それぞれのキメラマウスにおける各解析項目の定量データについて、Z得点化による標準化を行い、測定値の高い低いを色で分けヒートマップを作成した。その結果、4つのグループに分類することができた。グループ1は、MSMとほぼ同じ行動。グループ2は、OFでの移動活動性のみがB6/Jに類似。グループ3は、明期と暗期の切り替わり時のピークを示さないが、夜行性の特徴は強くなくB6/J型。グループ4はB6/J様の行動表現型で、暗期と明期の切り替わり時に高いピークを示し、夜行性の特徴は強くない。この結果から、MSM/Msは、普段の活動において活発な行動パターンを取るのではなく、基本的には動かず、緊急時には迅速に行動することが明らかとなった。

行動解析の終了したキメラ個体は全て灌流固定を行った後、脳組織の採取、切片の作製を行った。切片とした脳組織はlacZ染色を行い、B6胚盤胞由来の細胞とMSM ES細胞由来の組織を鑑別した。そして、MSM様の行動を示すキメラマウスに焦点を当て、脳内でのMSM由来の細胞の分布を解析したところ、視床、中脳、橋、延髄がほとんどMSM由来であったことから(図1)、この方法で領域を特定できることが示唆された。

視床、中脳、橋、延髄の最終的な投射先は視床であるため、視床における遺伝子発現を2系統間で網羅的に比較した。その結果、発現量に2倍以上上昇したのが117遺伝子、低下したのが123遺伝子で、合計240遺伝子であった。2倍以上の差があっ

た遺伝子のパスウェイ解析

(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)を行ったところ、発現が低下していた遺伝子群については、酸化リン酸化(ND1, ND3等)とパーキンソン病関連遺伝子の分子であった。発現が増大していた遺伝子に関してはリボソーム関連遺伝子(L7e, Sae, L37Ae等)の分子であった。

(2)「疾患の感受性・抵抗性に関する遺伝学的研究」

「膵炎・膵がんの感受性/抵抗性の遺伝学的解析」(山村、荒木正、李)

Prss1は感受性であるC3Hで高発現が、Spink3は抵抗性であるMSMで高発現が見られた。しかし、炎症に関与することが分かっている他のファクターは、意外にもほとんど差がなかった。Spink3を除く上記の遺伝子についてB6/JとMSM/Msの塩基配列を比較したが(<http://molossinus.lab.nig.ac.jp/msmdb/index.jsp>)驚いたことに上流3kbおよびコーディング領域をも含めて、ほとんど同じ配列であることが分かった。

そこで、もともと発現に差が認められたPrss1およびSpink3について、再度検証を行った。Prss1については、B6/JとMSM/Msにおいて、発現量に大差なく、MSMでの膵炎抵抗性を説明できるものではなかった。次いで、Spink3の発現量がセルレイン膵炎の感受性に影響を与えるかどうかについて、2つの実験を計画した。一つは、すでにSpink3ノックアウトマウスを得ているので、ノックアウトヘテロマウスでセルレイン膵炎の感受性が亢進するかどうかを解析した。しかしながら、ヘテロとコントロールでは、Spink3量が20%になるにもかかわらず、膵炎感受性に差

Behavioral Group	1		2		2		3		3		4		4			
Region	U2KU_11_02	U2KU_11_04	U2KU_8_01	U2KU_8_02	U2KU_7_08	U2KU_12_02	U2KU_7_07	U2KU_6_11	U2KU_8_08	U2KU_8_14	U2KU_7_03	U2KU_6_10	U2KU_8_13	U2KU_8_03	U2KU_6_09	U2KU_8_04
Isocortex	M/B	M/B	M	M/B	B	B	M	M/B	B	M	M/B	M	B	M/B	M/B	M/B
OLF (olfactory areas)	-	-	M	M/B	B	B	M	M/B	B	M/B	M/B	M/B	M/B	M/B	M/B	M/B
HPF (hippocampal formation)	M/B	M/B	M	M	B	B	M	M	-	M	M/B	M	M/B	-	M/B	M/B
CTXsp (Cortical subplate)	M	B	B	B	B	B	M	M/B	B	M	B	M/B	M/B	M/B	B	B
STR (Striatum)	B	M/B	M/B	M/B	B	B	M	M	B	M	B	M/B	M/B	M/B	B	M
PAL (Pallidum)	M/B	M/B	B	M	B	B	M	M/B	M	B	M/B	M/B	M/B	-	-	M/B
CB (Cerebellum)	M/B	M/B	M/B	M/B	B	B	M	M/B	B	M	M/B	M/B	M/B	B	B	M/B
TH (Thalamus)	M	M/B	M	M	B	B	M	M	M	M	M	M	M/B	M/B	M/B	M/B
HY (Hypothalamus)	M/B	M/B	M	M/B	B	B	M	M	B	M	M/B	M	M/B	M/B	B	M/B
MB (Mid brain)	M	M	M	M	B	B	M	M	B	M	B	M/B	M/B	-	-	M/B
P (Pons)	M	M	M	M	B	B	M	M	M/B	M	M/B	M	B	M/B	M	B
MY (Medulla)	M	M	M	M	B	B	M	M	M/B	M	B	-	B	M/B	M	B
Coat color	Mix	Agouti base	Agouti base	Mix	Black	Black	Agouti base	Agouti base	Black	Agouti base	Black base	Agouti base	Black base	Mix	Agouti base	Mix

図1. グループごとのlacZの発現場所の特定
 例えば、赤線で囲んだように、グループで共通してMSM由来の領域を特定する。
 例えば、MSM由来の細胞の分布を解析したところ、視床、中脳、橋、延髄がほとんどMSM由来である。

がなく、十分抵抗性を維持できることが分かった(図2)(Romac et al. Amer. J. Physiol. 298: G518-G524, 2010)。一方、発現量の増大で抵抗性を示せるかどうかであるが、このことは Nathan ら(Nathan et al. Gastroenterology 128:717-727, 2005)によってデータが示された。彼らは、ラット Prss1 遺伝子導入したトランスジェニックマウスを作製し、セルレイン膵炎の重症度をコントロールマウスと比較した。Tg マウスでは、トリプシンの阻害活性がコントロールの190%となること、

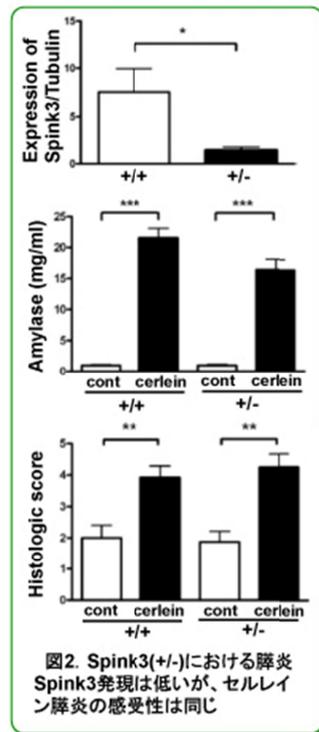


図2. Spink3(+/-)における膵炎
Spink3発現は低い、セルレイン膵炎の感受性は同じ

病理学的スコアも 58%減少することを明らかにした。以上のことを総合すると、MSM/Ms における Spink3 の高発現が、セルレイン膵炎の抵抗性に関与することを示唆している。

「糖尿病の抵抗性の遺伝学的解析」(山縣、吉信)

MODY (maturity-onset diabetes of the young) は、常染色体優性遺伝形式を取る若年発症成人型糖尿病である。現在までに 6 種類の原因遺伝子が同定されており、そのうち 5 種類は転写因子で、1 種類は解糖系の律速酵素であるグルコキナーゼである。

B6/J マウスにおいては、それぞれの遺伝子についてノックアウトマウス、正常ヒト遺伝子置換マウス、変異ヒト遺伝子置換マウスの 3 種類合計 18 系統、それに HNF4a および Gck についてはプロモーターが 2 つあり、5' 上流に膵臓型、30kb ほど下流に肝臓型プロモーターがある。したがって、この 2 つの遺伝子については、膵臓型だけではなく肝型を加え合計 20 種類を作製することとした。結果的に作製したマウス系統は、Hnf4a1a^{-/-}、Hnf4a1a^{hHNF4a1a/-}、Hnf4a1a^{hHNF4a1aGln268X/+}、Hnf4a1b^{-/-}、Gck1a^{-/-}、Gck1a^{hGCK/-}、Gck1a^{hGCKM210K/+}、Gck1b^{-/-}、Hnf1a^{-/-}、Hnf1a^{hHNF1a/-}、Hnf1a^{hHNF1aP291fsinsC/+}、Pdx1^{-/-}、Pdx1^{hPDX1/+}、Pdx1^{hPDX1P63fsdelC/+}、Hnf1b^{-/-}、Hnf1b^{hHNF1b/+}、

Hnf1b^{hHNF1bR177X/+}、NeuroD1^{-/-}、NeuroD1^{hNEUROD1/+}、NeuroD1^{hNEUROD1R111L/+} の 20 系統である。

MSM/Ms については、Hnf4a1a^{-/-}、Hnf4a1b^{-/-}、Gck1a^{-/-}、Hnf1a^{-/-}、Pdx1^{-/-}、Hnf1b^{-/-}、NeuroD1^{-/-} の 6 系統の作製に成功した。現在、全ての系統について順次寄託手続き中で、近いうちに他の研究者も利用可能になる予定である。以下、作製したマウスを用いて得られた成果の要約について記載する。

1) Gck ノックアウトマウス

肝臓特異的 Gck ノックアウトマウスは、肝臓特異的であるにもかかわらず、空腹時のインスリン値の低下を認め、肝における Gck がインスリン分泌に関与している可能性が新たに示された。一方、膵β細胞特異的 GK ノックアウトマウスは出生数日以内にすべての個体が死亡した。

2) HNF1α ノックアウトマウス

C57BL/6 背景の HNF1α ノックアウトマウスは出生 1 週間以内にすべての個体が死亡した。HNF1α ヘテロ欠損マウスは、ヒト MODY3 患者(ヘテロ変異)と異なり、耐糖能は正常であり、インスリン分泌能も野生型と同様であった。ヘテロ欠損マウス膵島における HNF1α 発現は野生型の約 50%に低下しており、ヘテロ欠損マウスを標的遺伝子の探索に用い、hepatocyte growth factor activator (Hgfac) の発現がやはり 50%程度低下しており、これが標的遺伝子であることを明らかにした(図3)(Ohki et al. Biochem Biophys Res Commun. 425:619-624,2012)。また、Crp が肝臓における HNF1α の標的遺伝子であることを同定し、高感度 CRP が MODY3 患者診断のバイオマーカーとなりうることを見出した(Ohki T. et al. J. Diabetes Invest. in press)。

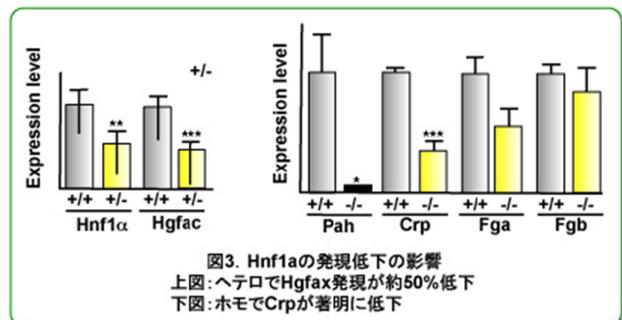


図3. Hnf1αの発現低下の影響
上図:ヘテロでHgfax発現が約50%低下
下図:ホモでCrpが著明に低下

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

- (1) Ohki T, Utsu Y, Morita S, Karim M.F., Sato Y, Yoshizawa T, Yamamura K, Yamada K, Kasayama S, Yamagata K: Low serum level of high-sensitivity C-reactive protein in a Japanese subject with MODY3. *J. Diabetes Invest.* 査読有 (in press)
DOI:10.1016/B978-0-12-800174-5.00016-8.
- (2) Furuse T., Yamada I., Kushida T., Masuya H., Ikuo Miura., Kaneda H., Kobayashi K., Wada Y., Yuasa S., Wakana S. Behavioral and neuromorphological characterization of a novel Tuba1 mutant mouse. *Behavioral Brain Research.* 査読有 227: 167-174, 2012.
DOI: 10.1016/j.bbr.2011.11.002
- (3) Ohki T, Sato Y, Yoshizawa T, Yamamura K, Yamada K, Yamagata K: Identification of hepatocyte growth factor activator (Hgfac) gene as a target of HNF1 α in mouse β -cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 425: 619-624, 2012
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.134
- (4) Ohmuraya, M., Sugano, A., Hirota, M., Takaoka, Y. and Yamamura, K. Role of intrapancreatic *SPINK1/Spink3* expression in the development of pancreatitis. *Frontiers in Physiol.* 査読有 3: article 126, 2012.
DOI: 10.3389/fphys.2012.00126
- (5) Wang, J., Ohmuraya, M., Suyama, K., Hirota, M., Ozaki, N., Baba, H., Nakagata, N., Araki, K. and Yamamura, K. Relationship of strain-dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of *Prss1* and *Spink3* expression. *Lab. Invest.* 査読有 90: 654-64, 2010
DOI: 10.1038/labinvest.2010.44
- (6) Furuse T, Wada Y., Hattori K., Yamada I., Kushida T., Shibukawa Y., Masuya H., Kaneda H., Miura I., Seno N., Kanda K., Hirose R., Toki S., Nakanishi K., Kobayashi K., Sezutsu H., Gondo Y., Noda T., Yuasa S., Wakana S. Phenotypic characterization of a new *Grin1* mutant mouse generated by ENU mutagenesis. *Eur. J. Neurosci.* 査読有 31: 1281-91. 2010.
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07164.x
- (7) Romac, J., M. Ohmuraya, M., C. Bittner, C., Majeed, M. F., Vigna, S. R., Que, J., Fee, B. E., Wartmann, T., Yamamura, K. and Liddle, R. A. Transgenic expression of pancreatic secretory trypsin inhibitor-1 rescues *SPINK3* deficient mice and restores a normal pancreatic phenotype. *Amer. J. Physiol.* 査読有 298: G518-G524, 2010.
DOI: 10.1152/ajpgi.00431.2009
- (8) Araki, K., Takeda, N., Yoshiki, A., Obata, Y., Nakagata, N., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Yamamura, K. Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain. *Mamm Genome* 査読有 20: 14-20, 2009.
DOI: 10.1007/s00335-008-9160-7
- (9) Hashimoto, D., Ohmuraya, M., Hirota, M., Wang, J., Baba, H. and Yamamura, K. Effect of low-molecular-weight trypsin inhibitor, nafamostat mesilate, on trypsin activity using the pancreatic acinar cells. *Pancreas* 査読有 38: 595-597, 2009.
DOI: 10.1097/MPA.0b013e31819156de

[学会発表] (計 69 件)

- (1) 山村研一: ヒト疾患モデルを用いた病因・病態解析と治療法の検証. 第 6 1 回日本実験動物学会総会、2014.05.15-17、札幌 (札幌コンベンションセンター)
- (2) Kazuya Yamagata: The molecular mechanisms of impaired insulin secretion in diabetes mellitus. The 2nd Shandong University-Kumamoto University Medical Symposium, China (Shandong Univ) 2013.12.16
- (3) 大村谷 昌樹, 荒木喜美, 山村研一: オートファジー不全がもたらす慢性膵炎発症メカニズムの解析, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-12.6, 兵庫 (神戸ポートアイランド)
- (4) Kazuya Yamagata, Yoshifumi Sato, Md. Fazlul Karim, Tatsuya Yoshizawa: Analysis of a novel HNF4a target gene *Anks4b* in pancreatic β -cells. 72nd American Diabetes Association scientific sessions L. Hunter Limbaugh, USA (Philadelphia/Pennsylvania) 2012.6.8-12
- (5) Yamamura, K., Araki, K., Ohmuraya, M.: *Spink3* is involved in pancreatitis

through the regulation of autophagy. Mouse Genetics 2011, June 22-25.2011, Washington DC USA (Omni Shoreham Hotel).

- (6) Kazuya Yamagata: Regulation of insulin secretion by HNF-4 transcription factor. 第33回日本分子生物学会・第83回日本生化学会大会 神戸ポートピアホテル(兵庫) 2010.12.7
- (7) 山田郁子、古瀬民生、串田知子、鈴木智広、榎屋啓志、金田秀貴、小林喜美男、三浦郁生、森脇和郎、山村研一、若菜茂晴: 理研 BRC 日本マウスクリニック II: 日本産野生系統 MSM の行動解析, 第57回日本実験動物学会総会, 2010.5.12-5.14, 京都(京都テルサ)
- (8) 山村研一: 膵炎におけるオートファジーの役割(シンポジウム3 オートファジーと病態), 第99回日本病理学会総会, 2010.4.27-4.29, 東京(京王プラザホテル)
- (9) Wang, J., Ohmuraya, M., Suyama, K., Hirota, M., Ozaki, N., Baba, H., Nakagata, N., Araki, K., Yamamura, K.: Relationship of strain dependent susceptibility to experimentally induced acute pancreatitis with regulation of Prss1 and Spink3 expression, Fourth meeting on Asian Mouse Mutagenesis and Resource Association, December 17-18. 2009, Kumamoto.

[図書] (計2件)

- (1) Araki, K. and Yamamura, K. Genetic manipulations using Cre and mutant loxP sites. (ed. Alexei Morozov), in Controlled genetic manipulations. Neuromethods 65, 29-45, 2012.
- (2) 山村研一、若菜茂晴 編“疾患モデルマウス表現型解析指南”中山書店、2011、477頁

[産業財産権] (計0件)

○出願状況(計 件)

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://irda-genetics.kuma-u.jp/>

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/department/biochem2/biochem2.html>

<http://www.riken.go.jp/r-world/research/la>

b/brc/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 研一 (YAMAMURA Ken-ichi)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・教授
研究者番号: 90115197

(2) 研究分担者

若菜 茂晴 (WAKANA Shigeharu)
独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・チームリーダー
研究者番号: 90192434

山縣 和也 (YAMAGATA Kazuya)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号: 70324770

吉信 公美子 (YOSHINOBU Kumiko)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教
研究者番号: 20274730

(3) 連携研究者

荒木喜美 (ARAKI Kimi)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授
研究者番号: 90211705

竹田直樹 (TAKEDA Naoki)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教
研究者番号: 90304998

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

李正花 (LI Zhenghua)
熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教
研究者番号: 80398239