

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500487

研究課題名(和文)SAM系マウスを用いた潰瘍性大腸炎の原因遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of genes for ulcerative colitis utilizing SAM mice

研究代表者

森 政之(MORI, Masayuki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：60273190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：腸粘膜での異物排出ポンプであるABCB1Aの機能喪失を共通して有するSAMP1とFVB/N系マウスを用いることにより、ABCB1Aの機能喪失を基盤とした潰瘍性大腸炎の発症が、第16染色体、および第13染色体上の修飾遺伝子により規定されることを明らかとした。さらに、第16染色体上の修飾遺伝子の存在領域を約7 Mbにまで限局することができた。この領域に存在する遺伝子の系統間多型検索の結果、修飾遺伝子の候補としてIfnar1遺伝子内のミスセンス塩基置換多型を同定した。しかしながら、この多型がABCB1A欠損条件下で潰瘍性大腸炎発症への感受性を規定するものであるか否かは完全には証明されなかった。

研究成果の概要(英文)：It was found that development of ulcerative colitis under the compromised Abcb1a function is influenced by modifier genes located on chromosomes 16 and 13 by using SAMP1 and FVB/N mouse strains that have a loss-of-function mutation in the Abcb1a gene, which functions in the exclusion of a wide range of drugs from the cell. It was also revealed that one of the modifier genes is located in the interval of approximately 7 Mb on chromosome 16. Furthermore, a missense nucleotide substitution polymorphism in the Ifnar1 gene was discovered between the two mouse strains that the SAM strains. However, it was not clear if the polymorphism is actually involved in the determination of development of ulcerative colitis under the compromised Abcb1a function.

研究分野：実験動物学

キーワード：潰瘍性大腸炎 マウス Abcb1a 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は大腸粘膜へのリンパ球の浸潤によるびらんや潰瘍を主徴とする大腸の炎症性疾患である。本邦でも患者数は年々増加しており、厚生労働省により「難病(特定疾患)」にも指定されている (<http://www.nanbyou.or.jp/entry/62>)。国内外の多くの研究により、本疾患では「遺伝的素因を背景として、食べ物や腸内細菌由来の抗原に対する粘膜免疫応答の調節異常が発症に大きく関わっている」ことが示唆されているが、その発症機序・原因の全容はいまだに不明であり、その原因究明と原因に則した根治的治療法の開発が急務である。

潰瘍性大腸炎の発症に関わる遺伝的素因として、実際にヒトにおいてはその原因となる遺伝子多型がいくつか同定されている。腸粘膜での異物排出ポンプとして働く ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A (ABC B1A) 遺伝子上の一塩基置換多型もその一つである (Ho G-T et al. *Gastroenterology* 128: 288-296 (2005))。しかしながら ABC B1A 遺伝子を含め、いずれの原因遺伝子に関しても、その多型単独では炎症性腸疾患の発症機序を説明できない。発症にはこれらの機能的遺伝子多型 (例えば ABC B1A の場合は腸管での異物の排出機能の低下) に加えてその他の遺伝子(群)および環境要因が複合的に寄与していると想定されている。ヒトは遺伝的に雑多な集団であり、また生活環境などにも大きな違いがあるため、遺伝的解析、および各要因の上下位性 (epistasis 効果) や寄与度の推定などの研究には限界がある。このような研究には遺伝的要因および環境要因を厳密に統御することができるモデル動物を利用した研究が有用である。

ヒトと同様に、マウスにおける ABC B1A 機能の喪失は潰瘍性大腸炎を惹起する。すなわち、FVB/N 系を遺伝的背景とする *Abcb1a* 遺伝子のノックアウトマウス (FVB.129P2-*Abcb1a*^{tm1Bor}) は、ヒトと類似した潰瘍性大腸炎を自然発症することが報告されていた (Panwala CM et al. *J. Immunol.* 161: 5733-5744 (1998))。以降、このマウスに関しても多くの研究報告があるものの、未だに詳細な発症機序は不明である。

一方、促進老化のモデルである一群の Senescence-Accelerated Mouse (SAM) 系マウスを用いて老化関連疾患を研究している過程で、SAM P1 系マウスが *Abcb1a* 遺伝子に機能喪失型自然突然変異をもつことが判明した。興味深いことに、SAM P1 系マウスは ABC B1A 活性を喪失しているにもかかわらず、FVB.129P2-*Abcb1a*^{tm1Bor} とは異なり潰瘍性大腸炎を発症しない。この潰瘍性大腸炎発症率の系統差は *Abcb1a* 遺伝子以外の SAM P1 と FVB/N 系マウスの遺伝子(群)における違いに起因することが想定される。すなわち、「これらのマウス系統では ABC B1A 機

能の喪失により、腸管から侵入する何らかの異物による免疫炎症反応が亢進し易い状況となっており、これが潰瘍性大腸炎発症の基盤となっている。FVB/N 系マウスは潰瘍性大腸炎の発症を促進する遺伝子(群)をもち、逆に SAM P1 系マウスは発症を抑制あるいは遅延する遺伝子(群)をもつ」と想定された。

2. 研究の目的

以下の2点の解明を目的とした研究を遂行した。

(1) SAM 系マウスが保有する潰瘍性大腸炎の発症あるいは抑制に関与する遺伝子を網羅的に同定する。

(2) ABC B1A 機能喪失とその他の機能的遺伝子多型がどのように組み合わせられて潰瘍性大腸炎の発症を規定するのか、その分子遺伝学的メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) (FVB/N x SAM P1) F₂ 交雑仔群を用いた潰瘍性大腸炎抵抗性 / 感受性遺伝子の染色体マッピング

ABC B1A 機能喪失に起因する潰瘍性大腸炎に抵抗性を示す SAM P1 系マウスと、感受性を示す FVB/N 系マウスを交配して (FVB/N x SAM P1) F₂ 交雑仔集団を作成した。尾から常法により抽出したゲノム DNA を用いて PCR / アガロースゲル電気泳動法により各マウスの *Abcb1a* 遺伝子型を判定し、SAM P1 由来の機能喪失型対立遺伝子をホモで有する個体のみを選抜した。4 ヶ月齢まで通常餌と水道水を自由摂取させて飼育した後、安楽死させた。摘出した大腸をホルマリン固定して病理標本作製し、大腸炎発症の有無を診断した。各染色体上のマイクロサテライトマーカー、および SNPs マーカー遺伝子の genotyping を行ない、その遺伝子型と潰瘍性大腸炎発症との遺伝的相関解析、および修飾遺伝子の染色体マッピングを行なった。

(2) 第 16 番染色体の当該領域内に修飾遺伝子が存在することの確認

交配と第 16 番染色体上のマーカー遺伝子の遺伝子型判定・選抜を繰り返して SAM P1 に FVB/N 系マウスの当該染色体領域を導入したコンジェニック系マウスを作成し、4 ヶ月齢で安楽死させて潰瘍性大腸炎発症の有無を調査した。

(3) 候補遺伝子の変異 (多型) の同定

NCBI の WEB サイト上のマウスゲノムのドラフトシーケンスデータを参照し、潰瘍性大腸炎発症との相関を示した第 16 番染色体上の領域に存在する遺伝子データを抽出した。これらの遺伝子のコード領域に関して、PCR クローニングと塩基配列決定により SAM P1 と FVB/N 系統間での塩基配列変異 (多型) を検索した。

WEB 上で利用できるフリーウェアである SIFT

(http://siftdna.org/www/SIFT_BLink_submit.html)、および PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) を用いてミスセンス塩基置換 (= アミノ酸置換) の影響の予測を行った。

(4) *Ifnar1* 遺伝子上のミスセンス塩基置換の病因性の検証

IFNAR1 を構成要素とする I 型インターフェロン受容体の活性測定法の確立、およびそれを利用した、塩基置換により生じる IFNAR1 内の H274R アミノ酸置換の影響の調査を試みた。インターフェロンレポータープラスミド (pGL4-ISRE::minP)、マウス IFNAR2 発現プラスミド、および、野生型、または H274R アミノ酸置換を有する IFNAR1 を発現するプラスミドを構築した。HepG2 培養細胞にこれらのプラスミドをトランスフェクトして発現させた。これにマウス INF- α または INF- β を添加した後にレポーター活性を測定した。

また、*Ifnar1* 遺伝子のノックアウトマウスと SAMP1 マウスとの交配により *Abcb1a* 遺伝子と *Ifnar1* 遺伝子のダブルノックアウトマウスを作出し、4 ヶ月齢で安楽死させて潰瘍性大腸炎発症の有無を調査した。

さらに、FVB/N 系マウスに機能喪失型 *Abcb1a* 遺伝子、および *Ifnar1* のノックアウト対立遺伝子をダブルコンジェニック導入したマウスを作出し、4 ヶ月齢で安楽死させて潰瘍性大腸炎発症の有無を調査して、FVB/N 系マウスが有する *Ifnar1* 遺伝子内のミスセンス塩基置換多型が ABCB1A 欠損条件下で潰瘍性大腸炎発症への感受性を規定するものであるか否かの証明を試みた。

4. 研究成果

(1) (FVB/N x SAMP1) F₂ 交雑仔群を用いた潰瘍性大腸炎抵抗性 / 感受性遺伝子の第 16 番染色体上での存在領域の限局化

(FVB/N x SAMP1) F₂ 交雑仔 (N=209) のうち 19 匹 (9.1%) は 4 ヶ月齢までに潰瘍性大腸炎を発症した。この発症率は、「FVB/N 系マウスに由来する二つの劣性遺伝子がホモ化することが潰瘍性大腸炎発症の条件である」と仮定した時の期待値である 6.25% とは有意に異ならなかった ($\chi^2 = 3.52$; $P > 0.05$)。

これらの F₂ 交雑仔に関して各染色体上のマイクロサテライトマーカー、および SNPs マーカー遺伝子の genotyping を行なった結果、潰瘍性大腸炎を発症していた全 19 匹の F₂ 交雑仔が第 16 番染色体の 53.37 cM に位置する *D16Mit155* マーカーにおいて FVB/N に由来する対立遺伝子のホモ型であることが判明した。この 19 匹の F₂ 交雑仔に関する *D16Mit155* のセントロメア、およびテロメア側に位置するその他のマーカー遺伝子における遺伝子型を含むハプロタイプ解析結果から、ABCB1A 欠損に起因する潰瘍性大腸炎発症の修飾遺伝子の存在領域を

約 7 Mb の領域に限局することができた。さらに複数のマーカー遺伝子に関して調査したが、SAMP1 と FVB/N の間での多型が同定されなかったため、さらなる限局化は達成されなかった。

一方、F₂ 交雑仔の中には *D16Mit155* マーカー遺伝子座において FVB/N に由来する対立遺伝子のホモ型であるにもかかわらず、潰瘍性大腸炎を発症しなかった個体が 31 匹いた。ここから計算される F₂ 交雑仔における潰瘍性大腸炎の発症率 (19/50=38%) は、過去の報告 (Staley EM et al., 2009) における FVB.129P2-*Abcb1a*^{tm1Bor} マウスの 5 ヶ月齢での発症率である約 40% と良く一致した。ただし、未発症であった 31 匹の F₂ 個体も屠殺した 4 ヶ月齢以降に潰瘍性大腸炎を発症した可能性は棄却できない。

19 匹の潰瘍性大腸炎発症 F₂ マウスは、第 13 番染色体上の *D13Mit157* マーカー (36.0 cM) においても、FVB/N 由来の対立遺伝子への有意な偏りを示した (FVB ホモ : ヘテロ : P1 ホモ = 10 : 7 : 2; $\chi^2 = 8.04$; $P < 0.05$)。

逆に、“*D16Mit155* マーカーにおいて FVB/N 由来のホモ型であったにもかかわらず大腸炎を発症していなかった 31 匹の F₂ マウス” においては *D13Mit157* マーカーに関して SAMP1 由来の対立遺伝子への有意な偏りが認められた (FVB ホモ : ヘテロ : P1 ホモ = 3 : 15 : 13; $\chi^2 = 6.49$; $P < 0.05$)。以上のデータより、FVB/N 系マウスの *D13Mit157* マーカー (36.0 cM) の近傍には、ABCB1A 機能欠損条件下での潰瘍性大腸炎の発症を弱いながらも促進する効果を有するもう一つの遺伝子が存在することが示唆された。

以上の結果を総合すると、ABCB1A 機能欠損に起因する潰瘍性大腸炎の発症を修飾する遺伝子が第 16 番、および第 13 番染色体上に存在することが示唆された。これらの遺伝子の効果は、FVB/N 系マウスに由来する対立遺伝子が発症感受性を与え、SAMP1 系マウスに由来する対立遺伝子が発症抵抗性を与えるものであることが示唆された。このうち第 16 番染色体上の遺伝子に関しては FVB/N 由来の対立遺伝子のホモ型となることが潰瘍性大腸炎の発症に必須であること示唆された。

(2) 第 16 番染色体の当該領域内に修飾遺伝子が存在することの確認

SAMP1 に FVB/N 系マウスの第 16 番染色体の当該領域を導入したコンジェニック系マウス (N4F1 世代) を作出した。4 ヶ月齢まで飼育したところ、その一部には軽度の潰瘍性大腸炎が認められた。以上の結果から、当該染色体領域に ABCB1A 機能欠損に起因する潰瘍性大腸炎の発症を修飾する遺伝子が存在することが確認された。

(3) 候補遺伝子の変異 (多型) の同定

NCBI のマウスゲノムのドラフトシーケンズデータを参照すると、第 16 番染色体上

の約7 Mbの当該領域には、83個の遺伝子(仮想の転写ユニットを含む)が存在することが判明した。このうち57個は、その発現組織や機能から潰瘍性大腸炎との関連が無いと判断されたことから、変異(多型)検索の対象から除外した。しかしながら、これらの57個の遺伝子(と転写ユニット)に真の病理性変異が存在する可能性は棄却できない。

残りの26個の遺伝子は大腸または免疫機能に何らかの関連性があることが文献的に示されていた。そこで、これら26遺伝子のコード領域に関して変異(多型)検索を行なった。その結果、3個の遺伝子(*Ifnar1*、*Ifngr2*、*Itsn1*)に塩基多型が認められた。Interferon gamma receptor 2 (*Ifngr2*)遺伝子には第4イントロン内のTの繰り返し数に系統間多型が認められた。すなわち、SAMP1では(T)15であるのに対し、FVB/Nでは(T)16であった。この多型がIFNGR2の機能に影響する可能性は想定し難く、したがって、これらの遺伝子が潰瘍性大腸炎に対する感受性を規定するものである可能性も非常に低いと考えられた。*Intersectin 1 (Itsn1)*遺伝子には多数の塩基多型が認められたが、それらがITSN1の機能に影響する可能性は低いと考えられた。しかしながら、この2つを含めた遺伝子において、コード領域以外に何らかの病理性変異(多型)が存在する可能性は棄却できない。

Interferon (alpha and beta) receptor 1 (*Ifnar1*)遺伝子の第7エクソン内のミスセンス塩基置換は274番目のコドンの第2塩基がSAMP1ではA (cAt)、FVB/NではG (cGt)であるために、274番目のアミノ酸のヒスチジン(SAMP1)からアルギニン(FVB/N)への置換(H274R)が予測されるものであった。

この塩基置換は既にマウスSNPsデータベースに登録されているものであり(rs31418313)、SAMP6、SAMR1、A/J、BALB/c、C3H/HeJ、DBA/2J、およびNZWがSAMP1と同じA型であり、一方、C57BL/6J、129S1/Sv、AKR/J、NOD、およびCF-1がFVB/Nと同じG型であること、すなわち、これはマウス系統に広く分布する塩基多型であることが判明した。また、ラット、およびヒトでは対応する塩基は全てAであり、アミノ酸はヒスチジンである。したがってA型(SAMP1型)が祖先型であり、G型(FVB/N型)が変異型であると考えられた。

潰瘍性大腸炎を発症していたF₂個体19匹全てがrs31418313においてFVB/N由来対立遺伝子のホモ型であった。

(4) *Ifnar1* 遺伝子上のミスセンス塩基置換の病理性の検証

SIFTプログラムを用いてマウスのIFNAR1でのH274Rアミノ酸置換の影響の予測を行った結果、「TOLERATED with a score of 0.47」と判定された。また、PolyPhen-2プログラムを用いたヒトのIFNAR1でのH273Rアミノ酸置換の影響を

予測した結果でも、「機能への影響は無い(score = 0.035)」と判定された。

しかしながら、「I型インターフェロンはマウスの実験的大腸炎を阻止、または緩和する」との先行報告も多数あることから(例としてKatakura K et al., *J Clin Invest* 115: 695-702 (2005))、その受容体の構成因子であるIFNAR1内のH274Rアミノ酸置換の影響に関しては実験的検証が必要と考えられた。

そこで、培養細胞内での強制発現系を作製し、IFNAR1内のH274Rアミノ酸置換の影響に関する調査を試みた。しかしながら、このIFNAR1活性アッセイ系の感度が低く、良好な結果が得られなかった。I型インターフェロン受容体の活性測定法は確立されておらず、反応性が高く、かつ高感度のアッセイ系の確立が必須と考えられた。

FVB/Nに機能喪失型*Abcb1a*遺伝子、および*Ifnar1*のノックアウト対立遺伝子をコンジェニック導入したマウス(N7F1世代)を作出し、機能喪失型*Abcb1a*遺伝子ホモ型、かつ*Ifnar1*遺伝子に関してノックアウト対立遺伝子ホモ型、FVB/N由来ホモ型、ヘテロ型の3種の個体群を作出し、4ヶ月齢まで飼育した。これらの一部にも軽度の潰瘍性大腸炎が認められたが、*Ifnar1*遺伝子型との相関は明確では無く、FVB/N系マウスが有する*Ifnar1*遺伝子内のミスセンス塩基置換多型がABC1A欠損条件下で潰瘍性大腸炎発症への感受性を規定するものであるか否かは完全には証明されなかった。

*Ifnar1*遺伝子のノックアウトマウスとSAMP1マウスとの交配により*Abcb1a*遺伝子と*Ifnar1*遺伝子内のダブルノックアウトマウスを作出した結果、これらのマウスでは潰瘍性大腸炎が発症しないことが確認された。この結果から、潰瘍性大腸炎の発症にはFVB/N系マウスの第13番染色体上に存在する遺伝子の関与が必要である可能性が考えられた。

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2件)

Unno K., Yamamoto H., Toda M., Hagiwara S., Iguchi K., Hoshino M., Takabayashi F., Shimada A., Hosokawa M., Higuchi K., Mori M.: A novel frame-shift mutation in *S1c5a2* encoding SGLT2 in a strain of Senescence-Accelerated Mouse SAMP10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454(1): 89-94 (2014) 査読有

Tanisawa K., Mikami E., Fuku N., Honda Y., Honda S., Ohsawa I., Ito M., Endo S., Ihara K., Ohno K., Kishimoto Y., Ishigami A., Maruyama N., Sawabe M., Iseki H., Okazaki Y., Hasegawa-Ishii S., Takei S., Shimada A.,

Hosokawa M., Mori M., Higuchi K., Takeda T., Higuchi M., Tanaka M.: Exome sequencing of senescence-accelerated mice (SAM) reveals deleterious mutations in degenerative disease-causing genes. *BMC Genomics*. 14(1): 248 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

ABCB1A 欠損条件下でのマウスの潰瘍性大腸炎の発症に關与する遺伝子は第 16 番染色体上に存在する

森 政之, 樋口京一

日本実験動物学会 第 61 回総会 2014 年 5 月 16 日 札幌

Senescence-accelerated mice (SAM) are not aging models but late-onset disease models

Kumpei Tanisawa, Ikuroh Ohsawa, Masafumi Ito, Atsuyoshi Shimada, Masayuki Mori, Mitsuru Higuchi, Masashi Tanaka

The Gerontological Society of America 第 65 回大会 2012 年 11 月 14 日 San Diego, USA

〔図書〕(計 4 件)

樋口京一, 森 政之

老化のモデル生物が果たす役割

石井直明、丸山直記編、老化の生物学 pp.306-321 化学同人, 2014

Mori M., Higuchi K.

Genetic characteristics of SAM strains

Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T, and Nomura Y eds. (ELSEVIER)

The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): Achievements and future directions. pp. 37-43, 2013

Mori M., Higuchi K.

Genetic profile of SAM strains. a.

Biochemical and immunogenetic markers

Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T, and Nomura Y eds. (ELSEVIER)

The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): Achievements and future directions. pp. 571-573, 2013

Mori M., Higuchi K.

Genetic profile of SAM strains. b.

Microsatellite markers

Takeda T, Akiguchi I, Higuchi K, Hosokawa M, Hosokawa T, and Nomura Y eds. (ELSEVIER)

The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): Achievements and future directions. pp. 575-578, 2013

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/department/doctor/grdkarei/i-byota/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森 政之 (MORI, Masayuki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：60273190