

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18791567  
 研究課題名（和文） 齲蝕感受性および齲蝕抵抗性マウスを用いた  
 コンソミックマウスの作成  
 研究課題名（英文） Establishment of consomic mice to clarify host susceptibility  
 to caries  
 研究代表者  
 清水 邦彦（SHIMIZU KUNIHICO）  
 日本大学・松戸歯学部・講師  
 研究者番号：30328760

研究成果の概要：C57BL/6 系統（齲蝕高感受性マウス）由来の全染色体のうち第 2 番染色体を C3H/He 系統（齲蝕低感受性マウス）に置き換えたコンソミックマウス B6-Chr.2<sup>C3H</sup> の作成を行った。マウスの兄妹交配と第 2 番染色体の組み換え状態の確認を 12 世代まで行い、この世代の兄妹交配によりコンソミックマウス B6-Chr.2<sup>C3H</sup> を得たことにより、マウス第 2 番染色体に存在する齲蝕発症に関わる原因遺伝子の解明が可能となった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000	0	1,600,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	270,000	3,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児系歯学

キーワード：実験動物，マウス，コンソミックマウス，第 2 番染色体，う蝕，C57BL/6，C3H

## 1. 研究開始当初の背景

齲蝕発症には細菌，糖質，宿主及び時間の 4 つの要素が存在することで起こると考えられている。これら 4 要素のうち 1 つでも欠けていれば齲蝕の発症及び進行は観察されず、現在の齲蝕予防にはこれらの要素に的を絞りアプローチすることで行われている。しかしながら、これまで考案され開発された方法において、齲蝕発症に関する 4 要素のうち、宿主要因に関与するアプローチがほとんど見られていない。

日常の臨床の場において、口腔内の衛生状態に特に気を使わず衛生状態不良の人でも、

全く齲蝕の発症をしない場合もあり、宿主側に存在する要因が強く働き齲蝕の発症を抑制していることは明らかである。当教室においてこれまでに宿主側に存在する因子を遺伝的解析から解明しようと、近交系マウスを用いた実験齲蝕モデルの確立を行い、このモデルを用い齲蝕原因菌（特に *Streptococcus mutans* cerotype c）を経口摂取にて感染させることで、様々なマウス系統の感受性について検討を行ってきた。その結果、C57BL/6，C57BL/10，DBA/2，BALB/c のマウス系統では齲蝕感受性を示し、AKR，C3H，MSM のマウス系統では齲蝕抵抗性を示すことが判明した。

この様に、環境要因を均一化できる齧蝕実験モデルとしてのマウスの系統差により齧蝕感受性が異なることは、すなわち宿主の遺伝背景に何らかの違いが存在することを示唆している。そこで当教室において齧蝕感受性マウスである C57BL/6 マウスと、齧蝕抵抗性マウスである C3H マウスを用いた交配実験により、その遺伝形式の解析を行った。その結果、齧蝕感受性に関する宿主の遺伝子はメンデル遺伝形式とは異なる動態を示し、単一の遺伝子が作用しているのではなく複数の遺伝子が関与していることを明らかにした。

また近年の分子遺伝学の発展により、これまで困難であった多因子遺伝疾患原因遺伝子の遺伝子座の同定が QTL(Quantitative Trait Loci)解析法によって行われており、本教室において齧蝕感受性に関する遺伝子群を QTL 解析法にて解析した結果、C57BL/6 と C3H との交配では第 1 番染色体 32.8cM、第 2 番染色体の 27.38cM ~ 52.3cM、第 7 番染色体 43.7cM と第 8 番染色体の 50.3cM ~ 74.3cM に齧蝕感受性決定遺伝子が存在することを明らかにした。特に第 2 番染色体には QTL 解析の結果、高い LOD 値が得られたため高確率で齧蝕感受性決定遺伝子が存在する可能性が示されている。

## 2. 研究の目的

前記の齧蝕発症に關与する宿主遺伝要因の解析をさらに進めるために、本研究では高い LOD 値が得られたマウス第 2 番染色体に焦点を当て、齧蝕感受性マウスである C57BL/6 マウスの染色体のうち、2 番染色体のみを齧蝕抵抗性マウスである C3H マウスのものに置き換えたコンソミックマウス B6-Chr.2<sup>C3H</sup>を作成し、齧蝕感受性における 2 番染色体の効果をも *in vivo* で解析するための研究基盤整備を目的とした。

## 3. 研究の方法

コンソミックマウス B6-Chr.2<sup>C3H</sup> の作成にあたり C57BL/6 の雄個体と C3H の雌個体を三協ラボサービスより購入し得られた個体を交配することで複数の F1 雑種個体を作成した。続けて得られた F1 個体の雄について C57BL/6 の雌に戻し交配を行い、さらに複数の N2 世代を得た。この N2 世代において尾部を 8 mm 採取し、DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN 社) を用い付属のプロトコールに従い、マウスを生存させた状態で DNA の抽出を行った。得られた DNA は約 5ng/μl 第となるように希釈したのち、2 番染色体上に約

20 cM の間隔に設定したマイクロサテライトマーカー (D2Mit1, D2Mit237, D2Mit90, D2Mit100, D2Mit226, D2Mit200) を用いて Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で増幅後、4% アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色により遺伝型の判定を行い、2 染色体上の全てのマーカーにおいて C57BL/6 と C3H がヘテロ接合体になっている個体を選別した。その雄個体を C57BL/6 の雌にさらに戻し交配し、複数の N3 世代を得た。その後、N12 世代までこれらと同様の操作を繰り返した。

なお、2 番染色体上には C3H マウスの毛色を規定している遺伝子が存在しており、1 次スクリーニングとして、黒色の毛色を示す個体は 2 番染色体上で組み換えを起こし、次世代への交配を行うには不適切と考え、PCR による組み換えの確認を行わず、agouti 色を示す個体のみ PCR による確認を行った。

各世代において 2 番染色体以外の染色体の置換状況を、マイクロサテライトマーカーを用い調査し、最終的に N12 世代において第 2 番染色体以外の全ての染色体がほぼ 100% 置換したことを確認した後、N12 ヘテロマウスの兄妹交配を行い、第 2 番染色体 1 対だけが C3H 系統由来の第 2 番染色体に完全に置き換わったコンソミックマウス B6-Chr.2<sup>C3H</sup> を樹立した。

N12 世代において得られたヘテロマウスの兄妹交配により現在第 2 世代のコンソミックマウス B6-Chr.2<sup>C3H</sup> を得ることに成功している。

以下に本研究で使用したマイクロサテライトマーカーを示す。

Chr	position(cM)	marker	Chr	position(cM)	marker	Chr	position(cM)	marker	
1	16.4	D2Mit18	9	6.6	D2Mit60	14	3.3	D2Mit209	
	32.8	D2Mit21		9.8	D2Mit174		7.7	D2Mit207	
	40.3	D2Mit7		15.7	D2Mit25		16.6	D2Mit11	
	64.5	D2Mit24		24.0	D2Mit29		37.0	D2Mit100	
	80.8	D2Mit27		32.8	D2Mit11		40.7	D2Mit106	
	86.5	D2Mit104		41.3	D2Mit28				
	118.4	D2Mit23		47.0	D2Mit22				
				50.1	D2Mit11		53	5.5	D2Mit175
				59.0	D2Mit17		9.6	D2Mit130	
				61.2	D2Mit19		17.6	D2Mit14	
2	1.8	D2Mit1	11	19.3	D2Mit39	15.8	D2Mit71		
	28.6	D2Mit27		74.3	D2Mit39		10.8	D2Mit71	
	37.8	D2Mit96					40.8	D2Mit41	
	47.5	D2Mit100		9	13.1		D2Mit22	66.7	D2Mit42
	70.6	D2Mit107		31.7	D2Mit38				
	86.6	D2Mit28		47.0	D2Mit1		54	1.5	D2Mit100
	107.8	D2Mit26		58.7	D2Mit1		29.6	D2Mit124	
3	9.8	D2Mit103	10	18.6	D2Mit69	17	2.2	D2Mit11	
	28.3	D2Mit73		32.0	D2Mit11		5.3	D2Mit22	
	54.6	D2Mit109		48.8	D2Mit17		14.2	D2Mit69	
	64.7	D2Mit10		47.0	D2Mit29		18.7	D2Mit66	
				56.7	D2Mit60		28.0	D2Mit24	
				67.6	D2Mit10		46.4	D2Mit19	
4	12.1	D2Mit172	11	4.4	D2Mit77	18	2.2	D2Mit110	
	16.0	D2Mit24		13.1	D2Mit10		15.3	D2Mit110	
	46.1	D2Mit19		27.3	D2Mit49		35.4	D2Mit10	
	71.8	D2Mit11		36.1	D2Mit1				
				44.8	D2Mit29		19	3.3	D2Mit66
5	27.3	D2Mit134	12	75.1	D2Mit69	17.0	17.0	D2Mit10	
	88.9	D2Mit109		1.3	D2Mit14		26.2	D2Mit19	
	76.5	D2Mit101		8.7	D2Mit10		43.7	D2Mit11	
				13.1	D2Mit66				
6	19.9	D2Mit74	12	32.8	D2Mit14	17.0	17.0	D2Mit10	
	27.3	D2Mit29		47.6	D2Mit105		26.2	D2Mit19	
	31.6	D2Mit104		56.8	D2Mit29				
	66.7	D2Mit11		13	13.3		D2Mit66		
7	13.1	D2Mit47	12	26.2	D2Mit1	17.0	17.0	D2Mit10	
	14.7	D2Mit1		42.4	D2Mit75				
	42.7	D2Mit66							
	57.9	D2Mit28							
	67.6	D2Mit102							

#### 4. 研究成果

第2番染色体コンソミックマウスの作成のために、C57BL/6との戻し交配を続け、DNAの抽出およびPCRによるすべての染色体の遺伝型の確認を繰り返した結果、第2番染色体を除く常染色体と性染色体がC3HではなくC57BL/6に置き換えられ第2番染色体のみC57BL/6/C3Hヘテロ個体であるマウスを作製した。13世代目において理論値で99.5%の染色体置換が完了している。以下に各世代において得られた第2番染色体がC57BL/6/C3Hヘテロ個体の個体数を示す。

世代	a	b
N2	2/17	25
N3	3/33	12.5
N4	4/24	6.3
N5	3/21	3.2
N6	8/33	1.6
N7	5/30	0.8
N8	7/30	0.4
N9	5/54	0.2
N10	5/32	0.1
N11	3/25	0.05
N12	11/48	0.03
N13	5/19	0.02

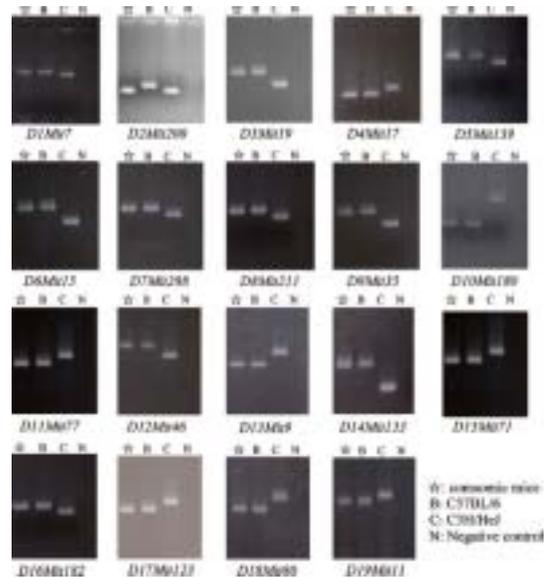
a) ヘテロ遺伝型のマウス数 (B6/C3H)/ 全マウス数  
b) 染色体の置換率 (理論値)

最終的に第13世代において5匹の第2番染色体がC57BL/6/C3Hヘテロ個体でその他の染色体がC57BL/6ホモ個体を得ることができた。すべての染色体遺伝型をPCRにて確認の後、このマウス同士を交配し、得られた個体の第2番染色体上のマーカーを前述と同様PCRにて確認した。なお、この際の遺伝型はN13世代までとは異なりC3Hホモ接合体を示す個体を選別した。

第2番染色体はマウス染色体の中でも比較的 genome サイズが大きく、動原体からテロメアにかけて全く組み換えを起こさない確率が非常に低い。ヘテロ接合体同士の交配でもN13世代までと同様に第2番染色体上で複数の組み換えが生じ、50匹以上の産子数に対して極少数の第2番染色体コンソミックマウスの作成が行われた。F1マウスを作製し始めてから現在までに300匹以上のマウスを用い雄2匹、雌2匹のコンソミックマウスを得ている。

以下に得られたコンソミックマウスの遺伝型を示す。第2番染色体のみコンソミックマウスの遺伝型がC3H型を示し、他の1~19番までのすべての染色体においてコン

ソミックマウスの遺伝型がC57BL/6型を示していることが確認できる。なお性染色体についてはF1およびN2作製時にC57BL/6由来となるように交配を行った。



最終的なコンソミックマウスを得る際に、第2番染色体が比較的大きな染色体のため、第2番染色体全体が置換した状態のマウスを得ることが非常に困難であった。第12世代及び13世代のヘテロ個体同士の交配によりコンソミックマウスの作成を行ったところ、第2番染色体がホモの遺伝型を示す個体は非常に少なく、12世代同士の交配では55匹中1匹のみ、13世代では64匹中1匹のみ2番染色体が置換されたコンソミックマウスを得ることができた。

得られたコンソミックマウスの外観上の特徴として、親系統であるB6が黒色の毛色であるのに対し、コンソミックマウスはC3H由来の agouti 色を示していた。C3Hの毛色を規定している Agouti 遺伝子座が第2番染色体上に存在することに由来していると考えられる。また、体長、体重、行動等の外観に異常は見られないが、これまでに雄の生殖能力の低下が確認されている。

今回作成されたコンソミックマウスはコンソミックマウス同士の交配により維持しているが、正常マウスおよびコンソミックマウス作製時の第2番染色体C57BL/6/C3Hヘテロ個体と比較して、得られる産子数が著しく減少している。コンソミックマウスと正常マウスの交配実験により、コンソミックマウスの雌個体と雄の正常個体の交配については正常マウスと同程度の産子数が得られているが、コンソミックマウスの雄個体と雌の正常マウスとの交配では産子数が激減しており、コンソミックマウスの雄個体に生殖能力の低下がある可能性がある。この原因につ

いては現在調査中である。

さらに現在 N1 2 および N1 3 世代から得られたコンソミックマウスでは十分な齲蝕感受性の調査を行うことが困難であると考え N1 4 世代以降についても C57BL/6/C3H ヘテロ個体を作成し、より多くのコンソミックマウスの作成を継続している。

本コンソミックマウスが作成されたことにより、齲蝕感受性に関与する遺伝子の解析がより詳細に行えると予想される。

## 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 1 件)

Makoto Nomi, Kunihiko Shimizu,  
Establishment of consomic mice to  
clarify host susceptibility to caries,  
Pediatric Dental Journal, 査読有,  
19 巻, 2009, 掲載予定

[学会発表](計 1 件)

Makoto Nomi, Kunihiko Shimizu,  
Daisuke Orino, Atsuko Nagata, Nana  
Ikematsu, Wataru Morita, Takahide  
Maeda, Establishment of consomic mice  
to clarify host susceptibility to  
caries, Internal association for  
dental research, July 2-5, 2008,  
Toronto Canada.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 邦彦 (SHIMIZU KUNHIKO)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号：30328760