

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500392

研究課題名（和文） *Ali18* 変異による炎症発生病機構の分子、細胞、個体レベルでの解析研究課題名（英文） Analysis of the inflammatory mechanisms caused by the *Ali18* mutation in molecular and cellular levels

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：90294123

研究成果の概要（和文）：マウス *Ali18* 系統は、リン酸化酵素遺伝子の変異が原因となって炎症性関節炎を引き起こす。しかし、どのような分子機構で炎症が発生するかは不明であった。*Ali18* マウスとマスト細胞を欠損する *W/W^v* マウスとを交配させて二重変異マウスの解析を行ったところ、関節炎が完全に抑制されていた。このことから、*Ali18* 変異によるマスト細胞を介した炎症発生病機構の一端が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The *Ali18* mutation in an kinase gene causes inflammatory arthritis in mice. However, its molecular mechanisms remains largely unknown. Here we show that *Ali18; W/W^v* double mutant mice show no inflammatory arthritis. These results indicate the effects of the *Ali18* mutation on mast cells trigger the initiation of inflammation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

これからの高齢者社会では、医療費の増加が社会を強く圧迫することが予想されている。なかでも65歳以上の約半数では何らかの関節に痛みを伴った症状があるとされており、関節炎に対する効果的治療法の開発が急務である。しかし、ほとんどの関節炎の患者では、環境因子と遺伝因子が複雑に作用して発症することが知られている。このように関節炎は多因子性疾患であることから、原因の究明が困難であった。

2. 研究の目的

近交系など均一な遺伝的背景を持ち飼育環境を厳密に制御可能な実験動物は、多因子性

疾患のモデルとして最適である。表現型を指標として得られた変異体より原因遺伝子を同定する方法は順遺伝学的手法と呼ばれ、複雑な現象において分子的基盤の理解がなくとも機能的な新規遺伝子を同定することが可能である(総説: Abe and Yu, 2009)。本研究に用いる *Ali18* (Abnormal limb) 変異マウス系統はドイツにおける ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*) ミュータジェネシスプロジェクトにおいて、後肢の発赤と腫脹を指標として単離された(下図)。*Ali18* ヘテロマウスでは生後7週齢以降になって下肢に発赤や腫脹が認められるのに比較して、ホモマウスでは4週齢と早期

より四肢の腫れが認められ、その表現型はさらに重篤で皮膚からの出血や壊死による指の欠失を伴う。遺伝的マッピングと候補遺伝子の塩基配列決定により、*Ali18* 変異はリン酸化酵素遺伝子のコーディング領域に検出され、アミノ酸置換を引き起こすことが予想された。しかし、この原因遺伝子が関節炎に関与するという実験的証拠はなく、また発症に関わる細胞動態や分子メカニズムについても未知であった。そこで本研究では、1) 変異タンパクの機能解析、2) 標的細胞の探索、3) 変異を含むトランスジェニックコンストラクトを作製し、表現型模倣について解析を試みた。



3. 研究の方法

本研究では、*Ali18* 変異による病態メカニズムを分子レベル、細胞レベル、個体レベルで解明することを目的とする。*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。*W*/*W*マウスは、*W*/+マウスと *W*/+マウスをそれぞれ日本SLCより購入し、*Ali18* マウスとの交配を行った。分子レベルでは、培養細胞系を主に用いた *Ali18* 変異タンパクの発現ベクターを導入し、リン酸化活性測定を行った。細胞レベルでは、マスト細胞を欠損する *W*/*W*マウスとの二重変異マウス作製し、炎症発生への効果を解析した。個体レベルでは、*Ali18* 変異とレポーター遺伝子を異所的に発現させるトランスジェニックマウス系統を作製するためのコンストラクションを行った。

4. 研究成果

現在までに、positional candidate cloning によって候補領域内のリン酸化酵素の C 末端付近にミスセンス変異が検出された。

この遺伝子が関節炎に関与するという報告はなく、炎症発生の細胞動態や分子メカニズムは未知のままである。本研究では、*Ali18* 変異の炎症発症機構を分子レベル、細胞レベル、個体レベルで総合的に理解して治療薬開発などの応用へと結び付けることを目的とした。分子レベルの解析においては、野生型と *Ali18* 変異タンパクのリン酸化活性の比較を行った。哺乳類培養細胞における発現ベクター (pTARGET, Promega) に、野生型および *Ali18* 変異を含むのタンパク質コード領域全体の PCR クローニングを行った。挿入部は DNA シークエンシングにより確認した。この発現ベクターをマウス由来の線維芽細胞である NIH3T3 細胞に遺伝子導入し、リン酸化活性の比較を行った。トランスフェクションを行っていない細胞では目的のリン酸化活性は検出されなかったが、導入細胞ではリン酸化活性が検出された。しかし、野生型と変異タンパクの間では大きなリン酸化活性の変化は認められなかった。また、この原因遺伝子が発現する骨髄よりタンパクを調整して、野生型と変異マウスでの活性を比較したが大きな差は認められなかった。そこで、精製したタンパクでリン酸化酵素活性を比較するため、pET システム (Novagen) により GST タグとの融合タンパクとして大腸菌で発現させてタンパク精製を行った。その結果、同じファミリーに属するリン酸化酵素では、同方法により活性を測定に成功したが、目的タンパクは翻訳高率が非常に低いことがわかった。現在、培養細胞で発現する FLAG タグ付きベクターのコンストラクションを行っており、これによりさらに精度を高くして活性測定を行う予定である。また、リン酸化活性を測定するための抗リン酸化抗体を、別の会社の抗体で行った結果、変異タンパクの活性上昇が認められたので、もう一度抗体を変更してはじめての実験を繰り返している。

本研究では *Ali18* 変異による関節炎の発症に関わるイニシエーターとしてマスト細胞を焦点とした研究計画を作成した。これは、予備的な実験よりマスト細胞を欠損する *c-kit* 変異マウス (*W*/*W*) と *Ali18* 変異マウスとの二重変異マウスでは関節炎の発症が抑制されるという結果を基にしている。*W*/*W*; *Ali18*/*Ali18* 変異マウスを得るために、*W*あるいは *W* と *Ali18* の二重ヘテロ変異マウスを作製してその交雑を行った。それら 153 個体の遺伝子型を PCR と制限酵素切断により決定し、関節炎の表現型を clinical score により解析した。その結果、*c-kit* が野生型で *Ali18* がホモの *+/+*; *Ali18*/*Ali18* では、6 個体中 5 個体 (83.3%) で関節炎の発症が認められた。しかし、マスト細胞を欠損する *W*/*W*; *Ali18*/*Ali18* マウスでは、13 個体中関節炎を発症する個体は認められなかった。解析

たした個体のうち+/+; *Ali18*/*Ali18*の1個体で関節炎が発症しなかったが、これは *W*あるいは *W*系統の遺伝的背景に存在する修飾遺伝子群の抑制効果であることが推測された。さらに、これらのマウスより組織切片を作製し、トルイジンブルー染色を行ってマスト細胞の可視化を行った。その結果、*Ali18*/*Ali18*マウスでは炎症を発症する四肢末端部で、野生型に比較して多数のマスト細胞が観察された。関節炎を発症しない *W*/*W*; *Ali18*/*Ali18*マウスでは予想通り、マスト細胞は観察されなかった。これらの結果よりマスト細胞が存在しない場合は *Ali18* の関節炎が発症しないことが明らかとなったことから、マスト細胞が過剰に反応することが原因となって *Ali18* の関節炎が発症する可能性が考えられた。



W/W; *Ali18*/*Ali18* +/-; *Ali18*/*Ali18*

また、個体レベルの解析では、目的の原因遺伝子座の付近のマウスのBACクローンを複数購入して、それぞれのクローンの解析を行った結果、目的としたクローンが得られた。しかし、マウスにおいてはそれらのクローン内に遺伝子発現を制御する領域が含まれているかどうか不明であることが判明した。ところがヒトのゲノム領域の解析では、組織特異的エンハンサー領域についての報告があることがわかった。そこで、マウスのBACクローンによるコンストラクションを中止し、ヒトのエンハンサー領域に目的遺伝子を挿入したコンストラクトに変更してトランスジェニックマウスを作製するためのコンストラクションを行っている。

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4件)

① 阿部幸一郎, Araki K, Tanigawa M, Semba K, Ando T, Sato M, Sakai D, Hiyama A, Mochida J, Yamamura K-I. A Cre knock-in mouse line on the *Sickle tail* locus induces recombination in the notochord and

intervertebral disks. *genesis*. 2012; 50: 758-765(査読有) DOI: 10.1002/dvg.22035

② 阿部幸一郎, Fuchs H, Boersma A, Hans W, Yu P, Kalaydjiev, Klaften M, Adler T, Calazada-Wack, Mossbrugger I, Rathkolb B, Rozman J, Prehn C, Maraslioglu M, Kametani Y, Shimada S, Adamski J, Busch DH, Esposito I, Kingenspor M, Wolf E, Wurst W, Gailus-Durner V, Katan M, Marschall S, Soewarto D, Wagner S, Hrabec de Angelis M. A novel N-ethyl-N-nitrosourea-induced mutation in phospholipase Cg2 causes inflammatory arthritis, metabolic defects, and male fertility in vitro in a murine model. *Arthritis & Rheumatism*. 2011; 63, 1301-1311(査読有) DOI 10.1002/art.30280

③ Hiyama A, Skai D, 阿部幸一郎, Mochida J. The relationship between Wnt/b-catenin and TGF- β /BMP signals in the intervertebral disc cell. *Journal of Cellular Physiology*. 2011; 226: 1139-1148(査読有) DOI: 10.1002/jcp.22438

④ Hiyama A, Sakai D, Risbud MV, Tanaka M, Arai F, 阿部幸一郎, Mochida J. Enhancement of intervertebral disc cell senescence by Wnt/b-catenin signaling-induced matrix. *Arthritis & Rheumatism*. 2010; 62: 3036-3047(査読有) DOI 10.1002/art.27599

[学会発表] (計4件)

① 阿部幸一郎, 荒木喜美, 谷河麻耶, 仙波圭, 安藤卓, 佐藤正宏, 酒井大輔, 檜山明彦, 持田讓治, 山村研一. *Sk1^{cre}*マウス系統を用いた脊柱椎間板におけるコンディショナルノックアウトシステムの構築. 日本実験動物科学・技術九州2012. 2012年5月24日 別府.

② 阿部幸一郎, 谷河麻耶, 内藤佳津子, 石川久美子, 谷口真沙美. レチノイド投与による炎症性関節炎モデルマウスへの薬理作用. 日本実験動物科学・技術九州2012. 2012年5月24日 別府.

③ 阿部幸一郎, Araki K, Tanigawa M, Semba K, Imai K, Yamamura K-I. Intervertebral disc-specific expression of Cre recombinase in *Sk1^{cre}* knock-in mice. *Cartilage Biology & Pathology* (Gordon Research Conference). 2011年3月9日 Ventura, California, USA.

④ 阿部幸一郎, Fuchs H, Boersma A, Yu P, Kalaydjiev S, Klaften M, Adler T, Hans W, Rathkolb B, Prehn C, Adamski J, Busch D, Wolf E, Gailus-Durner, Katan M, Marschall S,

Wagner S, Hrabe de Angelis M. ホスホリパーゼCγ2 の新規機能亢進型変異であるAli14 はマウスにおいて炎症性関節炎を引き起こす. 日本実験動物学会総会. 2010年5月12日 京都.

〔図書〕(計0件)

〔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

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

(1) 東海大学 医学部 阿部幸一郎研究室

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

(2) 東海大学 TWAVE

http://www.u-tokai.ac.jp/tweve/volume02_2/index.html

(3) 東海大学 TWAVE_PDF

<http://www.u-tokai.ac.jp/international/about/twave.html>

6. 研究組織

(1) 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: 90294123

(2) 連携研究者

高松 信彦 (TAKAMATSU NOBUHIKO)

北里大学・理学部・教授

研究者番号: 40206876

伊藤 道彦 (ITO MICHHIKO)

北里大学・理学部・准教授

研究者番号: 90240994

木村 穰 (KIMURA MINORU)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 10146706