

平成22年6月9日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19300145

研究課題名（和文） 潰瘍性大腸炎モデルとしてのSAM系マウスの特性解析および改良

研究課題名（英文） Characterization of SAM mice as an ulcerative colitis model

研究代表者

森 政之 (MORI MASAYUKI)

信州大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60273190

研究成果の概要（和文）：促進老化のモデルとして利用されている SAMP1, SAMP6, SAMR1 系マウスが異物排出ポンプとして機能する *Abcb1a* 遺伝子に機能喪失型自然突然変異を有することを明らかとした。これらの SAM 系マウスが大腸炎発症特性、デキストラン硫酸塩誘発大腸炎に対して異なる感受性をもつことを明らかとした。さらに遺伝解析により、SAM 系マウスは *Abcb1a* 遺伝子の遺伝的変異に起因する潰瘍性大腸炎の発症を抑制する遺伝子群を有することを明らかとした。以上、ヒトの潰瘍性大腸炎の治療あるいは予防法確立のための有用性の高いデータの獲得ができた。

研究成果の概要（英文）： We found that SAMP1, SAMP6, and SAMR1 mouse strains had a spontaneous loss-of-function mutation in the *Abcb1a* gene, which functions in the exclusion of a wide range of drugs from the cell. We revealed that the SAM strains had a difference not only in incidence for spontaneous ulcerative colitis, but also in susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis. We also discovered that the SAM strains have genes, which suppress ulcerative colitis under the compromised *Abcb1a* function. These data indicate that SAM mouse strains are useful for the study of molecular genetic mechanisms of ulcerative colitis 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	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：潰瘍性大腸炎, *Abcb1a* 遺伝子, SAM 系マウス, 突然変異, 疾患感受性, 系統差, 遺伝解析

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。患者数は本邦でも年々増加しており、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/sikkan/009.htm>）。しかしながら国内外の多くの研究にもかかわらず、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機序が特定できない大きな要因は、この疾患が複数の遺伝子変異が食生活や腸内細菌などの環境因子とともに複雑に組み合わさって発症する多因子疾患であることによる。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、遺伝的解析あるいは疫学的調査には限界がある。

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コントロール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。しかしながら、これまで知られる潰瘍性大腸炎の自然発症モデルは、T細胞あるいはサイトカイン系の不全モデルマウスであり、免疫系に異常を有するものであった。したがってこれらのモデルでの発症機序は、正常な免疫能を有しながらも発症するヒトでの潰瘍性大腸炎とは異なると考えられていた。

このような状況下、異物排出ポンプとして機能するATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A (*Abcb1a*) 遺伝子のノックアウトマウス (FVB/N-*Abcb1a*^{-/-}マウス) が、正常な免疫能を保ちつつもヒトと極めて類似した潰瘍性大腸炎を自然発症することが報告された (Panwala CM *et al.* A novel model of inflammatory bowel disease: Mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J. Immunol.* 161, 5733-5744 (1998))。

さらに興味深いことに、「*ABCB1A* 遺伝子上の特定の1塩基置換変異が、ヒトにおける潰瘍性大腸炎の一つの危険因子である」とする複数の報告がなされた (Ho GT. *et al.* Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 128, 288-296 (2005))。日本人においても、この1塩基置換変異が35歳以降発症の遅発型の潰瘍性大腸炎に限って相関するとの報告が出された (Osuga T. *et al.*, MDR1 C3435T polymorphism is predictive of later onset of ulcerative colitis in Japanese. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 324-329 (2006))。ノックアウトマウスとは異なり、ヒトにおいては塩基置換変異によって*ABCB1A*活性が100%喪失しているわけではないことが大きな相違であり、*ABCB1A* 遺伝子

上の多型が潰瘍性大腸炎の危険因子となるメカニズムも不明である。しかしながら、これらの報告から、ヒトとマウスの潰瘍性大腸炎の発症には共通するメカニズムが存在することが示唆されていた。したがって、*Abcb1a*機能不全マウスの解析から、潰瘍性大腸炎に関する有用なデータが取得できると考えられた。

一方、我々が維持していたSAMR1系マウスコロニーに蟻虫感染が発生し、これに対処するために駆虫薬であるイベルメクチンを投与したところ、全マウスが急性の神経症状を呈して死亡することが観察された。このようなイベルメクチンに対する異常な高感受性は*Abcb1a*ノックアウトマウスの特性として報告されていた。このことより、SAMR1系マウスも何らかの機構により*Abcb1a*機能を喪失していることが強く疑われた。この仮説が正しいならば、SAM系マウスは潰瘍性大腸炎の研究のための有用なモデルとなるポテンシャルを有すると想定された。

実際、SAM系マウスにおいても、以前から潰瘍性大腸炎の発症は報告されていた

(<http://samrc.md.shinshu-u.ac.jp:591/index.html>)。SAM系マウスの潰瘍性大腸炎には以下の二つの特徴がある。

①発症が30週齢以降と極めて遅い。これは、「日本人における*ABCB1A*遺伝子上のSNPが遅発型の潰瘍性大腸炎と相関する」との報告と類似する。逆に、SAM系マウスは*ABCB1A*活性を生まれつき欠如しているのに、なぜ発症までにこのような長い期間を要するのか興味深い。

②発症率に大きな系統差がある。SAMP6, SAMR1, SAMP1系マウスは共通して*Abcb1a*遺伝子に変異をもつにもかかわらず、SAMP6系マウスでは約90%の高頻度で発症するのに対し、SAMR1では約50%のみが発症し、SAMP1では発症は認められない (Tanaka S. *et al.*, Effects of housing and nutrition condition on the reproduction of SAMR1, SAMP6 and SAMP8 at NILS aging farm. Nomura Y, Takeda T and Okuma Y eds. (ELSEVIER) The Senescence-Accelerated Mouse (SAM): An Animal Model of Senescence. pp.167-173 (2004))。

この発症率の系統差の原因は飼育施設（環境）の違い、および*Abcb1a*遺伝子以外の遺伝子群の違いに起因すると考えられる。すなわち、SAMP6系マウスは*Abcb1a*遺伝子以外に潰瘍性大腸炎の発症を促進する遺伝子（群）をもち、逆にSAMP1系マウスは発症を抑制あるいは遅延する遺伝子（群）をもつと想定される。一群のSAM系マウスは、AKR/J系と未同定の系統（仮にB系統）の交雑群から、リコンビナント近交系に類似した方法により確立された互いに遺伝的に関連した近交系

マウスである。したがって *Abcb1a* 遺伝子を含め、潰瘍性大腸炎感受性/抵抗性遺伝子は、これらの祖先系統に由来したものが、SAM 系統群に異なる組み合わせで遺伝的に固定されたものと考えられる。実際、我々はマーカー遺伝子を用いて SAMP6, SAMP1, SAMR1 系マウスが互いに異なる遺伝的プロファイルをもつことを明らかとしていた (Xia C. *et al.* Genetic typing of the Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains with microsatellite markers. *Mamm. Genome* 10, 235-238 (1999))。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、SAM 系マウスの特性を活かした「潰瘍性大腸炎モデルとしての SAM 系マウスの特性解析および改良」を試みた。

3. 研究の方法

(1) SAM 系マウスにおける *Abcb1a* 遺伝子の変異解析

SAMR1 系マウスの脳より抽出した mRNA から *Abcb1a* 遺伝子の cDNA を RT-PCR 増幅して塩基配列を調査した。13 系統の SAM 系マウス (SAMR1, SAMR3, SAMR4, SAMR5, SAMP1, SAMP2, SAMP3, SAMP6, SAMP7, SAMP8, SAMP9, SAMP10, SAMP11)、14 系統の近交系マウス (C57BL/6J, AKR/J, A/J, C3H/He, DBA/2, 129/SvJ, NZB, NFS, SL, SL/Kh, SL/Ni, SJL/J, SWR/J, DDD)、3 系統のクローズドコロニー系マウス (ddY, CD-1/Crj, ICR/Jcl) に関してもゲノミック DNA から *Abcb1a* 遺伝子のイントロン 22-23 の領域を PCR 増幅して塩基配列を調査した。

(2) SAM 系マウスにおける大腸炎発症特性の調査

Abcb1a 遺伝子に自然突然変異をもつ SAM 系マウス (SAMR1, SAMP1, SAMP6) は日本エスエルシーより、FVB/N-*Abcb1a*^{-/-}マウスは Taconic より購入した。信州大学ヒト環境科学研究支援センター動物実験施設のコンベンショナル飼育環境において飼料および市水は自由摂取させ、長期飼育を行った。16 ヶ月齢で屠殺し、大腸の病理組織標本作製して大腸炎の有無を評価した。

(3) SAM 系マウスのデキストラン硫酸塩誘発潰瘍性大腸炎に対する感受性の検討

デキストラン硫酸塩 (dextran sulfate sodium; DSS) の経口投与はマウスに潰瘍性大腸炎を誘発する人為的処置として頻用されている。そこで *Abcb1a* 変異系統である SAM 系マウス、および正常マウス系統を用いて、DSS 誘発大腸炎に対する感受性を比較検討した。マウス (全て雌、N=5) に、DSS を飲水中に 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、および 3.0% 添加して 7 日間自由摂取させ、その間の体重の変動、血便の有無を調査した。これらのマ

ウスの大腸組織のヘマトキシリン/エオジン (HE) 標本作製し、顕微鏡下で大腸炎の有無、およびその重症度を評価した。

(4) (FVB/N x SAMP1)F2 交雑仔群による潰瘍性大腸炎感受性遺伝子の同定研究

SAMP1 と FVB/N-*Abcb1a*^{-/-}マウス間に認められた潰瘍性大腸炎の発症率の系統差を規定する *Abcb1a* 遺伝子以外の遺伝子群の関与の確認、さらにはそのポジショナルクローニングを目的として、SAMP1 系と FVB/N 系マウスの交配により、F2 交雑仔群を作出した。全染色体 DNA 領域に分散するマイクロサテライトマーカーを用いた遺伝連鎖解析を行った。

4. 研究成果

(1) SAM 系マウスにおける *Abcb1a* 遺伝子の変異解析

SAMR1, SAMR4, SAMR5, SAMP1, SAMP6, SAMP7, および SAMP9 系マウスにおいては *Abcb1a* 遺伝子のイントロン 22 とエクソン 23 の境界に、レトロウイルスに由来する約 8.35 kb の DNA 断片が挿入されており、そのためにエクソン 23 が mRNA に転写されないことが判明した (Zhang G., Zhang B., Fu X., Tomozawa H., Matsumoto K., Higuchi K., Mori M.: Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains have a spontaneous mutation in the *Abcb1a* gene. *Exp. Anim.* 57 (4): 413-417 (2008))。この挿入突然変異は CF-1 系マウスにおいて報告されているものと全く同一であった。

(2) SAM 系マウスにおける大腸炎発症特性

長期飼育された SAMR1 および SAMP1 系マウスには大腸炎は認められなかった。しかしながら、16 ヶ月齢の SAMP6 系マウスの大腸の HE 標本ではリンパ球を主体とする多数の白血球の腸粘膜固有層、粘膜下層、筋層皮への浸潤が認められた。好中球の浸潤はほとんど認められず、消瘦や軟便、血便などの症状も全く認められなかった。これらの観察から、SAMP6 系マウスは老齢期で軽度の慢性大腸炎を発症することが明らかとなった。一方、同じ飼育環境下で FVB/N-*Abcb1a*^{-/-}マウスは 4 ヶ月齢までに全例が潰瘍性大腸炎を発症した。

(3) SAM 系マウスのデキストラン硫酸塩誘発潰瘍性大腸炎に対する感受性

Abcb1a 遺伝子に自然突然変異をもつ SAM 系マウス (SAMR1, SAMP1, SAMP6) においても DSS 誘発大腸炎に対する感受性は正常 3 系統マウスと差がなかった。ABCB1A の機能欠損は DSS 誘導大腸炎に対する感受性には影響を与えず、この感受性はむしろ *Abcb1a* 以外の遺伝子による影響を強く受けることが示唆された (Zhang G., Fu X., Takeda T., Higuchi K., Mori M.: Dysfunction in ABCB1A has only a weak effect on susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis

in SAM strains. *Exp. Anim.* 58 (4): 421-425 (2009)). SAMP6 系マウスは DSS 誘導大腸炎に対しては感受性が低いことが明らかとなったが、一方で SAMP6 系マウスは慢性大腸炎を SAMR1 系マウスよりも高率に自然発症することが報告されている。これらのデータを総合すると、SAM 系統群には慢性大腸炎と DSS 誘導大腸炎に対する異なる感受性/抵抗性遺伝子(群)が保有されていることが示唆された。(4) (FVB/N x SAMP1)F2 交雑仔群による潰瘍性大腸炎感受性遺伝子の同定

変異型 *Abcb1a* 遺伝子をホモにもつ 201 匹の F2 マウスのうち 19 匹が 4 ヶ月齢までに潰瘍性大腸炎を発症した。この発症率 (9.5%) より、SAMP1 系マウスは潰瘍性大腸炎の発症を抑制する 2 個の優性遺伝子を有することが推測された。マイクロサテライトマーカーを用いた遺伝連鎖解析の結果、そのうちの 1 個は第 16 番染色体の 55-69 cM の領域に存在することを示唆するデータを得た。マウスゲノムデータを参照すると、この領域には約 80 個の遺伝子が存在する。今後、FVB/N と SAMP1 系統間での、これら遺伝子の変異(多型)検索により、潰瘍性大腸炎感受性遺伝子の同定が可能と考えられた。

以上の研究成果をまとめると、従来ヒトおよび他のモデル動物を解析対象とした場合では不可能であったヒトの潰瘍性大腸炎の治療あるいは予防法確立のための有用性の高いデータの獲得ができた。

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 10 件)

- ①Schmelzer C., Kubo H., Mori M., Sawashita J., Kitano M., Hosoe K., Boomgaarden I., Doring F., Higuchi K., Supplementation with the reduced form of Coenzyme Q10 decelerates phenotypic characteristics of senescence and induces a PPAR- α gene expression signature in SAMP1 mice, *Molecular Nutrition & Food Research* 54 巻, 1-11, 2009, 査読有
- ②Sawashita J., Kametani F., Hasegawa K., Tsutsumi-Yasuhara S., Zhang B., Yan J., Mori M., Naiki H., Higuchi K., Amyloid fibrils formed by selective N-, C-terminal sequences of mouse apolipoprotein A-II, *Biochim. Biophys. Acta* 1794 巻, 1517-1529, 2009, 査読有
- ③Mori M., Li G., Hashimoto M., Nishio A., Tomozawa H., Suzuki N., Usami S., Higuchi K., Matsumoto K., Eosinophilia in the MES rat strain is caused by a

loss-of-function mutation in the gene for cytochrome b(-245), alpha polypeptide (*Cyba*), *Journal of Leukocyte Biology* 86 巻, 473-478, 2009, 査読有

- ④Zhang G., Fu X., Takeda T., Higuchi K., Mori M., Dysfunction in ABCB1A has only a weak effect on susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in SAM strains, *Experimental Animals* 58 巻, 421-425, 2009, 査読有
 - ⑤Mori M., Fu X., Chen L., Zhang G., Matsumoto K., Higuchi K., Hereditary pancreatitis model WBN/Kob rat strain has a unique haplotype in the *Pdwl1* region on chromosome 7, *Experimental Animals* 58 巻, 409-413, 2009, 査読有
 - ⑥Umezawa M., Higuchi K., Mori M., Matsushita T., Hosokawa M., Effect of dietary unsaturated fatty acids on senile amyloidosis in Senescence-Accelerated Mice, *J. Gerontol. A Bio. Sci. Med. Sci.* 64 巻, 646-652, 2009, 査読有
 - ⑦Zhang G., Zhang B., Fu X., Tomozawa H., Matsumoto K., Higuchi K., Mori M., Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains have a spontaneous mutation in the *Abcb1a* gene, *Experimental Animals* 57 巻, 413-417, 2008, 査読有
 - ⑧Yan J., Fu X., Ge F., Zhang B., Yao J., Zhang H., Qian J., Tomozawa H., Naiki H., Sawashita J., Mori M., Higuchi K., Cross-seeding and cross-competition in mouse apolipoprotein A-II amyloid fibrils (AApoAII) and protein A amyloid fibrils (AA), *American Journal of Pathology* 171 巻, 172-180, 2007, 査読有
 - ⑨Ge F., Yao J., Fu X., Guo Z., Yan J., Zhang B., Zhang H., Tomozawa H., Miyazaki J., Sawashita J., Mori M., Higuchi K., Amyloidosis in transgenic mice expressing murine amyloidogenic apolipoprotein (*Apoa2*), *Laboratory Investigations* 87 巻, 633-643, 2007, 査読有
 - ⑩Otsuki B., Matsumura T., Shimizu M., Mori M., Okudaira S., Nakanishi R., Higuchi K., Hosokawa M., Tsuboyama T., Nakamura T., Quantitative trait locus that determines the cross-sectional shape of the femur in SAMP6 and SAMP2 mice, *Journal of Bone & Mineral Research* 22 巻, 675-685, 2007, 査読有
- [学会発表] (計 13 件)
- ①Jinze Qian, Beiru Zhang, Yaoyong Wang,

Xiaoying Fu, Fengxia Ge, Jingmin Yan, Jinko Sawashita, Pengyao Zhang, Hiroshi Tomozawa, Masayuki Mori, Akira Nakai, Keiichi Higuchi, Accelerated senile amyloidosis in heat shock factor-1 (HSF-1)-deficient mice, The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine, 2009.10.7, 札幌

- ② 森 政之, モデル生物研究の重要性, 日本遺伝学会第 81 回大会 公開市民講座「遺伝学と社会の接点 第 2 部: パネル討論会 現代社会における遺伝学の教育と普及のあり方」2009.9.16, 松本
- ③ 樋口京一, 森 政之, 竹田俊男, 老化促進モデルマウス (SAMP) の現状と遺伝的特性, 第 56 回 日本実験動物学会シンポジウム「モデルマウスを用いた老化への分子遺伝学的アプローチ」, 2009.5.14, さいたま
- ④ 銭 金澤, 巖 景民, 張 蓓茹, 葛 鳳霞, 澤下仁子, 友澤 寛, 森 政之, 付 笑影, 樋口京一, マウス老化アミロイドーシスでの骨格筋へのアミロイド沈着, 日本病理学会第 98 回総会, 2009.5.2, 京都
- ⑤ 張 国紅, 竹田俊男, 樋口京一, 森 政之, 多剤耐性分子 ABCB1A を遺伝的に欠損する老齢 SAMP6 系マウスに認められる慢性大腸炎, 日本病理学会 第 98 回総会, 2009.5.2, 京都
- ⑥ 鈴木伸嘉, 橋本繁成, 森 政之, 樋口京一, 宇佐美 眞一, SAMP1 の内耳に於ける遺伝子発現について, 日本基礎老化学会 第 31 回大会, 2008.6.12, 松本
- ⑦ 銭 金澤, 巖 景民, 張 蓓茹, 葛 鳳霞, 澤下仁子, 友澤 寛, 内木宏延, 森 政之, 付 笑影, 樋口京一, マウス老化アミロイドーシスでの骨格筋へのアミロイド沈着, 日本基礎老化学会 第 31 回大会, 2008.6.12, 松本
- ⑧ 澤下仁子, 藤井健志, 細江和典, 久保博司, 巖 景民, 張 蓓茹, 姚 俊潔, 伊沢直人, 竹田俊男, 森 政之, 樋口京一, 還元型コエンザイム Q10 は老化促進モデル SAMP1 マウスの促進老化を遅延する, 日本基礎老化学会 第 31 回大会, 2008.6.12, 松本
- ⑨ 張 国紅, 付 笑影, 竹田俊男, 樋口京一, 森 政之, 多剤耐性 *Abcb1a* 遺伝子に機能喪失突然変異をもつ SAMP6 系マウスは老齢期に慢性大腸炎を自然発症する, 日本基礎老化学会 第 31 回大会, 2008.6.12, 松本
- ⑩ 吉川欣亮, 森 政之, 樋口京一, 三浦郁生, 森脇和郎, 城石俊彦, 米川博通, 実験用マウス近交系のミトコンドリア DNA 多型情報の蓄積, 第 55 回 日本実験動物学会総会, 2008.5.17, 仙台
- ⑪ 張 国紅, 樋口京一, 森 政之, SAM 系マウ

スを用いた DSS 誘発大腸炎感受性に対する ABCB1A 欠損の影響の検討, 第 55 回 日本実験動物学会総会, 2008.5.17, 仙台

- ⑫ Jingmin Yan, Kenji Fujii, Junjie Yao, Hideyuki Kishida, Hiroshi Kubo, Kazunori Hosoe, Jinko Sawashita, Toshio Takeda, Masayuki Mori, Keiichi Higuchi, Reduced coenzyme Q10 supplementation decelerates senescence in senescence accelerated SAMP1 mice, 第 5 回 国際コエンザイム Q10 カンファレンス, 2007.11.9, 神戸
- ⑬ 張 国紅, 森 政之, 張 蓓茹, 友沢 寛, 松本清司, 樋口京一, SAM 系マウスは多剤耐性 *Abcb1a* 遺伝子に機能喪失突然変異をもつ, 第 24 回 日本疾患モデル学会総会, 2007.8.31, つくば

[その他]

ホームページアドレス

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 政之 (MORI MASAYUKI)

信州大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 60273190