

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592220

研究課題名(和文) 骨・軟骨に異常をきたす疾患モデルマウスライブラリーの構築

研究課題名(英文) Construction of a model mouse library related to osteogenic and chondrogenic disease using an exchangeable gene trap mutagenesis

研究代表者

関本 朝久 (Sekimoto, Tomohisa)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：60305000

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポストゲノム時代になり遺伝子機能解析ツールとして遺伝子改変マウスは非常に重要であり、我々は骨粗鬆症等のロコモティブシンドロームの病因病態解析の為に骨軟骨に異常を来すノックアウトマウスライブラリーを構築してきた。現在まで1200ラインのトラップシステムを樹立しEGTCデータベース(<http://egtc.jp>)に公開している。EGTCを用い骨軟骨代謝において重要と考えられる遺伝子を選別して45ラインのホモ・ヘテロマウスを作製しスクリーニングを施行した。その中で37ラインに骨形態計測や骨強度試験などで異常を認めた。可変型遺伝子トラップマウスはバイオリソースとして骨軟骨代謝研究への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gene trapping in ES cells is a proven method for large-scale random insertional mutagenesis in the mouse genome. We have established an exchangeable gene trap system, in which a reporter gene can be exchanged for any other DNA of interest through Cre/mutant lox-mediated recombination. We isolated trap clones, analyzed trapped genes, and constructed the database for Exchangeable Gene Trap Clones (EGTC) [<http://egtc.jp>]. The EGTC database is the most extensive academic resource for gene-trap mouse lines. The number of registered ES cell lines was 1200 on March 2014. We also established 450 mouse lines from trap ES clones and deposited them in the mouse embryo bank at the CARD, Kumamoto Univ., Japan. Using EGTC database, we established 45 mouse lines related to osteogenic and chondrogenic metabolism. We analyzed the bone and cartilage phenotypes using micro CT, bone morphometry, biomechanical analyses, realtime-PCR, etc. Thirty seven mouse lines showed some bone and/or cartilage disorder.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：遺伝子トラップ法 ロコモティブシンドローム 骨軟骨代謝 新規遺伝子群 モデルマウス スクリーニング マウスライブラリー EGTC

1. 研究開始当初の背景

近年、日本整形外科学会では『ロコモティブシンドローム』という新しい疾患概念が提唱され一般社会にも浸透しつつある。これは変形性関節症や骨粗鬆症などの「運動器の障害」による「要介護の状態や要介護リスクの高い状態」であり、本邦では4700万人以上とも推計されている(Yoshimura, 2009)。骨粗鬆症などの疾患の病因には多数の因子が複合的に関与していることが推察されるが、その因子の一つと考えられている遺伝子については膨大な研究が行われているにもかかわらず、素因遺伝子として確立されたものは未だ見いだされていない。骨粗鬆症の病期が進行した場合は、骨折や痛みなどにより運動器全般の機能低下から寝たきり状態を余儀なくされ、患者本人およびその家族のみならず、医療経済にも多大な影響を及ぼしている。したがって、現代社会において健康寿命の延伸の為に、ロコモティブシンドロームの病因・病態解明は急務となっている。

ヒトゲノムプロジェクトの進展で、ヒトゲノムの構造解析はほぼ完了したが、ゲノムの塩基配列のみでは遺伝子機能に関する十分な情報は得られない。ポストゲノム時代になり、個体レベルでの遺伝子機能解析に適した遺伝子改変マウスはますますその重要性を増している。近年の分子生物学のめざましい発展により、いかに多くの疾患に遺伝子が関与しているかが明らかになってきた。それは骨関節疾患においても例外ではなく、過去にはマウス挿入突然変異の解析により老化抑制遺伝子の *Klotho* 遺伝子が同定され、老化に伴う骨粗鬆化に関与していることが発見されたのは画期的であった(Kuro-o M, Nature 1997)。また遺伝子ターゲティングにより、それまで免疫系の異常が推測された *Cbfa1* の変異が鎖骨頭蓋異形成症の原因であることが明らかになったが、同時にこの転写因子が骨芽細胞分化を支配するマスター遺

伝子であることが解明された(Komori T, Cell 1997)。この様にミュータジェネシスは新規遺伝子の発見、および既知遺伝子のそれまで知られていなかった機能の解明において非常に有力な手段である。

マウス ES 細胞を用いた効率の良い系統的な挿入変異体の形成とその遺伝子同定のための手法である遺伝子トラップ法は、プロモーターを持たないレポーター遺伝子を ES 細胞に導入し、それがゲノム上の遺伝子内に入るとレポーター遺伝子が発現することを指標に新規遺伝子を単離同定する方法である。そのトラップクローンを用いてキメラマウスを作製することで個体レベルでの機能解析が同時に効率的に行える利点がある。さらに我々が開発した可変型遺伝子トラップ法における一連の遺伝子トラップベクターは、レポーター遺伝子である *-geo* の開始コドンとスプライスアクセプターの間に終止コドンを配置してある。そのためトラップした遺伝子の開始コドン前後にベクターが挿入されている頻度が高く、ノックアウトマウスがヌルになる確率が高い(Taniwaki T, Dev Growth Differ 2005)。現在 ATG 周辺にベクターが挿入されたプロモータートラップクローンを『EGTC』(<http://egtc.jp>) に登録している(平成26年3月現在1200クローン)。また可変型遺伝子トラップベクターには、部位特異的組換えシステムである *Cre-lox* システムを応用しており、レポーター遺伝子を任意の遺伝子と置き換えることができ、目的とする部位で *Cre* や *EGFP* などの興味ある任意の遺伝子を発現するマウスへの応用も可能である(post insertional modification)。

このように『可変型遺伝子トラップ法』により樹立されたトラップクローンマウスを用いた骨軟骨代謝に関する新規遺伝子群のスクリーニングによって、骨軟骨疾患モデルマウスライブラリーの作製が可能となり、その各ラインの解析は、ロコモティブシンド

ロームの病態解明や治療法の確立において有力な手段となりうると考える。

2. 研究の目的

ポストゲノム時代になり遺伝子改変マウスは遺伝子機能の解析に非常に重要である。我々は、骨粗鬆症などのロコモティブシンドロームの病因・病態解明のために、可変型遺伝子トラップ法により樹立した変異マウスシステムを用いて、骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子探索のための効率的なスクリーニングを実施する計画である。我々はそれらトラップクローンデータをデータベース『EGTC』(Database for the Exchangeable Gene Trap Clones, <http://egtc.jp>) に公開し、骨軟骨代謝に異常をきたす疾患モデルマウスライブラリーを構築すると共に、骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子群の単離同定および機能解析を目的とする。

3. 研究の方法

我々の研究室では、トラップマウスにおける骨軟骨表現型解析および遺伝子機能解析等に必要な設備・機器〔3D-CT、骨形態計測、骨力学試験、病理組織作製、細胞培養、血液生化学検査、リアルタイム PCR 等〕は既に整備されている。さらに現在までに 1200 ES クローンを単離し、450 ラインのトラップシステムを樹立している。これまで樹立したトラップマウスラインは、胚及び精子凍結保存している。

1 次スクリーニング：

EGTC データベース(<http://egtc.jp>)を用いて以下の項目を評価し、スクリーニングするマウスラインを選出。

- ・ EST profile：骨軟骨において発現が強いラインを選出。
- ・ 過去の研究報告：これまで報告のない遺伝子をトラップしたラインや、ノックアウトマウスを用いた *in vivo*での報告がない

ライン、原因遺伝子の特定されたヒト骨軟骨関連疾患において、モデルマウスの報告がないラインなどを選出。

- ・ X-gal 染色：トラップベクターは *geo* 遺伝子を含んでおり、X-gal 染色にてトラップした遺伝子発現の時期・組織特異性を確認して、骨軟骨に発現が強いラインを選出。

2 次スクリーニング：

- ・ 成長曲線/血液検査：

各ラインで定期的に体重測定を行い、トラップした遺伝子の成長に与える影響を評価する。また血液検査にて Ca・IP・ALP など骨代謝関連因子の定量を行う。

- ・ 3D-CT (マイクロフォーカス X 線 CT システム L090H, Comscan)：

マウス大腿骨を撮影し、奇形や成長障害の評価を行う。また BMD 値に変換した画像で、全体的な変化を評価する。

- ・ 骨形態計測 (3D-Bon, Ratoc)：

BMD 解析 9 項目、皮質骨解析 11 項目、海綿骨解析 18 項目の合計 38 項目について統計学的解析を行い評価する。

- ・ 骨力学試験 (小型卓上試験機 EZ Test-S, SHIMADZU)：

サンプル大腿骨を試験台に設置し 3 点曲げ試験を行い、試験力や応力、エネルギーなどを最大点と破断点で評価する。

上記スクリーニングを実施し、トラップした遺伝子の骨軟骨代謝に与える影響を総合的に解析・評価して、スクリーニングマウスライブラリーを充実させる。

有意な表現型が認められたラインでは、以下の 3 次解析を進める。

3 次解析：

- 1) **トラップされた遺伝子の骨軟骨組織中の発現解析**

骨軟骨組織におけるトラップ遺伝子の発現パターンを X-gal 染色や免疫染色、*in situ* hybridization などで解析する。

2) 成長段階における骨力学試験や骨形態計測

骨軟骨スクリーニング時より計測時期や個体数を増やして詳細に解析を行う。

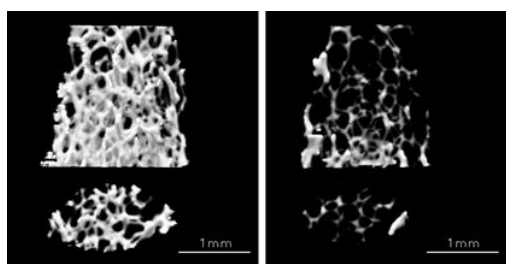
3) 骨軟骨代謝関連遺伝子の詳細な解析

野生型およびトラップマウスの骨軟骨組織から mRNA を抽出し、骨軟骨代謝に関する遺伝子群 (*BMP2*, *Runx2*, *Collagen 1/2/10*, *TRAP*, *SOX5/6/9*, *ALP* など) の発現量をリアルタイム PCR にて定量する。これらの発現量に差がある場合は、組織標本を作製し、種々の染色法や免疫染色、*in situ* hybridizationなどで詳細に解析する。

4. 研究成果

これまでに 45 の候補遺伝子についてトラップクローンマウスを作製し、スクリーニングを施行したところ、*Lima1*, *Nedd4*, *Tmem161A*, *Pkig*, *Lbr*, *Itpr1* 遺伝子など 37 のトラップクローンマウスに何らかの骨軟骨表現型異常を認めている (表 1)。

例えば、Line 39 は *Nedd4* 遺伝子をトラップしたラインで、ホモマウスは生後 3 週間で 70% が死亡し、1 か月で 96% が死亡した。2 次スクリーニングでは、 μ CT にて著明な骨量減少を認め (図 1)、組織像でも 1 次海綿骨



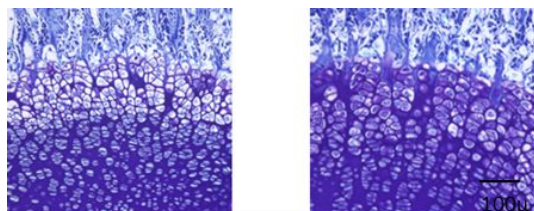
WT (14週齢) Homo (14週齢)

図1) *Nedd4* 海綿骨 μ CT 画像

の減少を認めた。骨形態計測では皮質骨厚や海綿骨厚が有意に減少し、骨力学試験でも有意に骨強度の低下を認めた。リアルタイム PCR にて *BMP2* や *Runx2*, *ALP* などの発現が有意に低く、このトラップされた *Nedd4* 遺伝子は骨芽細胞の機能発現に重要な遺伝子と考

えている。(平成 25 年日本整形外科学会基礎学術集会 最優秀ポスター賞受賞)

Line45 は細胞接着に関与する *Lima1* 遺伝子をトラップしたラインで、ホモマウスは 2 次スクリーニングにおいて、 μ CT で明らかな骨量減少を認め、組織像で一次海綿骨の減少、肥大軟骨細胞層の異常を認めた (図 2)。



WT (9日齢)

Homo (9日齢)

図2) *Lima1* 骨端線像 (TB 染色)

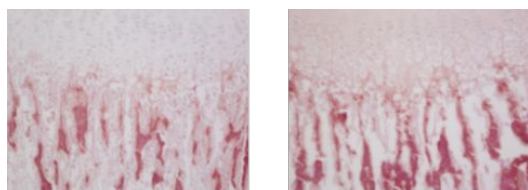
骨形態計測で骨塩量や骨梁幅が有意に減少し、骨力学試験でも有意に骨強度の低下を認めた。リアルタイム PCR にて *BMP2* の発現低下を認め、*ALP* や *Col1* も有意に染色性低下を認めた。このトラップされた *Lima1* 遺伝子は、成長板周囲で骨芽細胞や軟骨細胞の機能発現に関与する重要な遺伝子と考えている。

(平成 25 年日本整形外科学会基礎学術集会 優秀ポスター賞ノミネート)

表 1: 骨軟骨スクリーニング

トラップマウスライン							トラップマウスライン								
Line	Gene	骨形態計測	骨力学試験	血液生化学	成長曲線	ESU Profile (n=8)	X-gal 染色	Line	Gene	骨形態計測	骨力学試験	血液生化学	成長曲線	ESU Profile (n=8)	X-gal 染色
Line 1	21-B135 <i>Alms1</i>	0	0	Δ	—	248		Line 24	21-T257 <i>Mef2c</i>	7	3	Δ	Δ	190	
Line 2	21-T252 <i>Alms1</i>	0	0	Δ	—	344		Line 25	21-W202 <i>Alms1</i>	8	0	Δ	—	322	
Line 3	21-W286 <i>Alms1</i>	0	0	—	Δ	No data		Line 26	21-T75 <i>Alms1</i>	8	0	0	—	322	
Line 4	21-W273 <i>Alms1</i>	0	1	Δ	○	549		Line 27	21-W438 <i>D19Mit26</i>	9	0	—	Δ	520	
Line 5	17-52 <i>Alms1</i>	0	2	Δ	Δ	754		Line 28	21-106 <i>New</i>	9	0	—	—	No data	
Line 6	21-KB100 <i>Alms1</i>	1	0	Δ	ND	102	No data	Line 29	21-129 <i>EST</i>	10	0	0	○	0	No data
Line 7	21-T57 <i>Alms1</i>	1	0	Δ	—	117		Line 30	21-B120 <i>Alms1</i>	11	0	Δ	—	153	
Line 8	21-W288 <i>Alms1</i>	1	0	0	—	226		Line 31	21-W195 <i>LoxP2</i>	11	0	Δ	Δ	498	
Line 9	21-W405 <i>Alms1</i>	1	2	—	Δ	153		Line 32	21-T54 <i>Alms1</i>	13	1	0	○	168	
Line 10	21-W288 <i>Alms1</i>	2	6	—	Δ	117		Line 33	21-B285 <i>Alms1</i>	14	0	Δ	—	29	
Line 11	21-B186 <i>EST</i>	3	0	0	—	No data		Line 34	21-W287 <i>Alms1</i>	14	1	0	—	337	
Line 12	21-T152 <i>Alms1</i>	3	2	Δ	—	65		Line 35	18-51 <i>New</i>	17	0	Δ	—	601	
Line 13	21-W287 <i>Alms1</i>	4	0	—	○	58		Line 36	21-T273 <i>Tmem161a</i>	17	4	Δ	Δ	153	
Line 14	21-T187 <i>J2000292929</i>	4	2	Δ	Δ	No data		Line 37	21-W474 <i>EST</i>	17	5	—	○	No data	
Line 15	21-W473 <i>Alms1</i>	4	6	Δ	—	7		Line 38	21-T354 <i>Pkg</i>	20	8	Δ	Δ	43	
Line 16	21-B131 <i>Alms1</i>	5	0	Δ	Δ	292	No data	Line 39	21-T289 <i>Nedd4</i>	21	1	Δ	—	835	
Line 17	21-W116 <i>Alms1</i>	6	0	Δ	—	344		Line 40	21-W288 <i>Alms1</i>	21	3	0	○	615	
Line 18	21-W234 <i>Fgf</i>	6	0	0	Δ	674		Line 41	21-W6 <i>Alms1</i>	22	5	Δ	Δ	513	
Line 19	21-W76 <i>Alms1</i>	6	1	Δ	○	336		Line 42	21-T2 <i>Alms1</i>	25	5	Δ	○	80	No data
Line 20	21-103 <i>New</i>	6	2	0	—	No data		Line 43	18-44 <i>Alms1</i>	27	4	Δ	○	388	
Line 21	21-W119 <i>Alms1</i>	6	3	Δ	—	476		Line 44	21-KB738 <i>Alms1</i>	37	4	Δ	○	418	
Line 22	21-W234 <i>Alms1</i>	7	0	Δ	Δ	7		Line 45	21-KB122 <i>Alms1</i>	42	7	0	Δ	410	
Line 23	21-T259 <i>Alms1</i>	7	0	Δ	Δ	446	No data	Line O	Homoが出生するライン	Line O	Homoが出生するライン	Line O	Homoが出生するライン	Line O	Homoが出生するライン

Line36 は、*Tmem161A* 遺伝子をトラップしたラインで、ホモマウスでは X-gal 染色において大腿骨頭軟骨および成長軟骨が染色された。2 次スクリーニングでは、 μ CT で海綿骨量の増加を認め、骨形態計測にて皮質骨厚や骨梁間隙の有意な変化を認め、骨力学試験でも骨強度の有意な増加を認めた。組織像では 1 次海綿骨の増生を認めた (図 3)。リアルタイム PCR にて *BMP4* や *Runx2* の発現が有意に高く、このトラップされた *Tmem161A* 遺伝子は骨形成に重要な遺伝子と考えている。



WT(10日齢) Homo(10日齢)

図3) *Tmem161a* 骨端線像 (AR染色)

このように『可変型遺伝子トラップ法』により樹立されたトラップマウスを用いた骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子群のスクリーニングは非常に効率が高く、本スクリーニングで異常を認めたマウスラインは、骨軟骨代謝において重要な遺伝子をトラップしている可能性が非常に高いと推測される。したがって、本プロジェクトによって骨軟骨疾患モデルマウスライブラリーの作製が可能となり、バイオリソースとして様々な研究分野での有効活用に寄与し、ひいては骨軟骨代謝研究への大きな貢献が期待できる。そしてこのライブラリーにおける各ラインの今後の更なる解析は、ロコモティブシンドロームの病因・病態解明や新規治療法開発などにおいて有力な手段となりうると考えられる。

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)

〔学会発表〕(計 13 件)

平成 25 年日本整形外科学会基礎学術集会 最優秀ポスター賞受賞 : 1 演題

平成 25 年日本整形外科学会基礎学術集会 優秀ポスター賞ノミネート : 1 演題

平成 25 年度

1 : 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 : 幕張 : 2013 年 10 月 17 日

可変型遺伝子トラップ法で作製した *Nedd4* 欠損マウスは骨量減少を示す

船元太郎、関本朝久、黒木修司、大田智美、中村志保子、山村研一、中原舞、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

平成 25 年日本整形外科学会基礎学術集会 最優秀ポスター賞受賞演題

2 : 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 : 幕張 : 2013 年 10 月 17 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた *Lima1* /EPLIN の骨代謝における機能解析

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、中村志保子、山村研一、中原舞、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

平成 25 年日本整形外科学会基礎学術集会 優秀ポスター賞ノミネート演題

3 : 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 : 幕張 : 2013 年 10 月 17 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝疾患に関与する新規遺伝子の探索

大田智美、関本朝久、船元太郎、黒木修司、中村志保子、山村研一、中原舞、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

4 : 第 86 回日本整形外科学会学術総会 : 広島 : 2013 年 5 月 24 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝疾患に関与する新規遺伝子の探索

関本朝久、黒木修司、船元太郎、大田智美、中村志保子、濱田浩朗、山村研一、中原舞、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

5 : 第 86 回日本整形外科学会学術総会 : 広島 : 2013 年 5 月 24 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた *Nedd4* の骨代謝における機能解析

船元太郎、関本朝久、黒木修司、大田智美、
中村志保子、山村研一、中原舞、荒木喜美、
荒木正健、帖佐悦男

6：第 86 回日本整形外科学会学術総会：広島：
2013 年 5 月 24 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた *EPLIN* 遺伝
子の骨代謝における機能解析

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、
中村志保子、山村研一、中原舞、荒木喜美、
荒木正健、帖佐悦男

平成 24 年度

7：第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会：
名古屋：2012 年 10 月 26 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨代
謝に関する新規遺伝子の探索

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、
中村志保子、山村研一、中原舞、荒木善美、
荒木正健、帖佐悦男

8：第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会：
名古屋：2012 年 10 月 26 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた *Lima1*
/*EPLIN* の骨代謝における機能解析

船元太郎、関本朝久、黒木修司、大田智美、
中村志保子、山村研一、中原舞、荒木喜美、
荒木正健、帖佐悦男

9：第 30 回日本骨代謝学会学術集会：東京：
2012 年 7 月 20 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨代謝疾
患に関する新規遺伝子の探索

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、
中村志保子、山村研一、荒木善美、荒木正健、
帖佐悦男

10：第 85 回日本整形外科学会学術総会：京
都：2012 年 5 月 19 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨代
謝に異常を来す疾患モデルマウスライブラ
リーの構築

関本朝久、黒木修司、船元太郎、崎濱智美、
山口志保子、濱田浩朗、山村研一、荒木喜美、
荒木正健、帖佐悦男

平成 23 年度

11：第 26 回日本整形外科学会基礎学術集
会：前橋：2011 年 10 月 21 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾
患に関する新規遺伝子の探索

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、
中村志保子、山村研一、荒木善美、荒木正健、
帖佐悦男

12：第 29 回日本骨代謝学会学術集会：大阪：
2011 年 7 月 30 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾
患に関する新規遺伝子の探索

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、
中村志保子、山村研一、荒木善美、荒木正健、
帖佐悦男

13：第 84 回日本整形外科学会学術総会：横
浜：2011 年 5 月 12 日

可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨疾
患に関する新規遺伝子の探索

関本朝久、黒木修司、船元太郎、大田智美、
中村志保子、山村研一、荒木善美、荒木正健、
帖佐悦男

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

関本 朝久 (Tomohisa Sekimoto)

宮崎大学 医学部 講師

研究者番号：60305000

(2) 研究分担者

帖佐 悦男 (Etsuo Chosa)

宮崎大学 医学部 教授

研究者番号：00236837

荒木 正健 (Masatake Araki)

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

荒木 喜美 (Kimi Araki)

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