

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462305

研究課題名(和文) 可変型遺伝子トラップ法を用いた骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子群の機能解析

研究課題名(英文) Development of an efficient screening system to identify novel bone metabolism-related genes using the exchangeable gene trap mutagenesis mouse models.

研究代表者

黒木 修司 (Kurogi, Syuji)

宮崎大学・医学部・医員

研究者番号：40418843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：今回、我々は可変型遺伝子トラップクローンデータベースに登録されたマウスラインを用いて、骨代謝に関与する新規遺伝子を同定するための効率的なスクリーニング法を開発した。まずEGTCデータベース内の1278トラップクローンから骨軟骨代謝に関与する既知遺伝子をトラップしたラインを除外し、1次スクリーニングで4つの基準から52の候補ラインを選択し2次スクリーニングでは、骨形態計測や骨力学試験を実施した。その結果オスでは42ラインで骨形態計測または骨力学試験のいずれかで異常を示した。本スクリーニングにおいて、X-gal染色によるトラップ遺伝子の組織特異性の確認は骨表現型以上の探索に有意に有用であった。

研究成果の概要(英文)：We have developed an efficient screening system to identify novel genes involved in bone metabolism using mutant mouse strains registered in the Exchangeable Gene Trap Clones (EGTC) database. From 1278 trap clones in the EGTC, 52 candidate lines were selected in the first screening, which were decided referring to 4 criteria. Bone morphometric analysis (BMA), biomechanical strength analysis (BSA), etc. were then performed on the candidate lines as the second screening, and 41 lines (78.8%) showed abnormalities in either BMA or BSA. In the first screening "X-gal" was significantly efficient ($P = 0.0099$). Thus, our screening system using the EGTC mouse lines is extremely efficient in identifying novel genes involved in bone metabolism. The gene trap lines identified as abnormal using this screening approach are highly likely to trap important genes for bone metabolism, therefore these selected trap mice would be valuable for bone research by acting as novel bio-resources.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 可変型遺伝子トラップ法 骨粗鬆症 ロコモティブシンドローム

1. 研究開始当初の背景

近年、日本整形外科学会から『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「運動器の障害」によって「要介護」になるリスクの高い状態であるが、本邦では現在4700万人の予備軍が推測されている。(Yoshimura N, J Bone Miner Metab 2009) 其中で骨粗鬆症の患者は1700万人を超え、高齢化社会が進むにつれてその数は増加の一途をたどると予想される。骨粗鬆症の病期が進行した場合は、患者は寝たきりの状態を余儀なくされ、患者本人のみならず、医療経済にも多大な影響を及ぼしている。昨今、骨粗鬆症の病因病態解明のための様々な研究が行われているが、その発症原因はいまだ不明であり、原因タンパクならびにゲノム遺伝子の異常、遺伝性などは十分に解明されていない。

2. 研究の目的

現在我々は、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世界に先駆けて構築する目的で、『可変型遺伝子トラップ法』により樹立した変異マウス系統を用いた、骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子探索の効率的なスクリーニングを実施している。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>)に公開している。(図1) 現在このEGTCデータベースに登録したクローンから、特に骨軟骨にトラップした遺伝子の発現のみられるクローンを選別し、その遺伝子欠損マウスを作製して骨軟骨表現型および遺伝子機能を解析している。本研究ではこのマウスライブラリーから骨軟骨代謝に関与する新規遺伝子を探索することを目標とする。

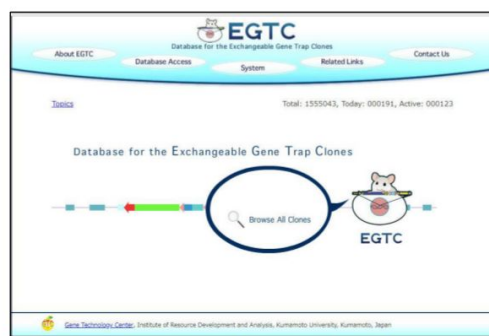


図1 EGTC ホームページ

3. 研究の方法

EGTC データベース内の1278トラップクローンから骨軟骨代謝に関与する既知遺伝子をトラップしたラインを除外し、

- 1) 1次スクリーニングにおいて「EST profile」:骨軟骨において発言が強いラ

インを選出、「X-gal」:トラップベクターは geo 遺伝子を含み X-gal 染色にてトラップした遺伝子発現の時期や組織特異性を確認でき、骨軟骨に発言が強いラインを選出、「Related article」:骨軟骨代謝に間接的に影響を及ぼしそうな既知遺伝子、および「Novel gene」:これまでに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などを選出の4つの基準から決定された52の候補ラインを選択した。(表1)

No.	EGTC ID	Gene Symbol	Chr	Genbank Accession	EGTC X-gal Staining	EST Profile	1st Screening Decision	NPPI
1	18-44	Apof	11	AB212668	NEI	388	EST profile	NBII
2	21-103	Nov	4	AB187255	NEI	NEI	Novel gene	NPPI
3	21-106	Nov	5	AB187257	NEI	NEI	Novel gene	NPPI
4	21-139	EST	5	AF191469	NEI	9	Novel gene	NPPI
5	21-8120	Apofact1	6	AB247961	NEI	153	EST profile	NBII
6	21-8135	Rarg2	10	AB253053	NEI	248	EST profile	NBII
7	21-8186	Pip3kac1	17	AB273634	NEI	NEI	RA ⁺	NBII
8	21-8206	Lpar5	6	AB204309	NEI	28	RA ⁺	NBII
9	21-82176	Jah3ap11	8	AB291261	NEI	418	EST profile	NBII
10	21-K891122	Emx1	15	AB461912	Novel	410	EST profile	NBII
11	21-K891180	Cux3	3	AB611934	-	300	X-gal + EST profile	NBII
12	21-K892001	Hsf11	7	AB264508	-	44	X-gal	NBII
13	21-7132	Tnfr2	5	AB290808	NEI	58	RA ⁺	NBII
14	21-7167	ZNF602(1)Rat.1ncRNA	8	AB291487	NEI	NEI	RA ⁺ Novel gene	NPPI
15	21-7188	EST	17	AB252513	NEI	NEI	Novel gene	NPPI
16	21-72	M62	11	AB281199	NEI	80	RA ⁺	NBII
17	21-7219	Hgf1	1	AB307034	NEI	486	EST profile	NBII
18	21-7369	Nid4	9	AB321600	-	635	X-gal + EST profile	NBII
19	21-7376	Itih3a1a	8	AB331519	NEI	153	EST profile	NBII
20	21-7397	Hes1	12	AB330742	NEI	190	EST profile	NBII
21	21-7332	Cy5b	8	AB323991	NEI	344	EST profile	NBII
22	21-734	EST	2	AB262317	NEI	NEI	Novel gene	NPPI
23	21-7354	Pkg	2	AB304985	NEI	43	RA ⁺	NBII
24	21-7374	Rpl3	15	AB284778	NEI	168	X-gal + EST profile	NBII
25	21-737	Fhox17	7	AB278135	NEI	117	EST profile	NBII
26	21-775	AKR107C(1)Rat.1ncRNA	X	AB284377	NEI	NEI	Novel gene	NPPI
27	21-78105	Zfp412	10	AB483530	NEI	498	EST profile	NBII
28	21-78115	Nov	11	AB309133	NEI	NEI	Novel gene	NPPI
29	21-78166	Cdk16	8	AB361736	Novel	344	EST profile	NBII
30	21-78203	Nov	3	AB307799	NEI	NEI	Novel gene	NPPI
31	21-78234	Egr1	18	AB304294	-	674	X-gal + EST profile	NBII
32	21-78266	Defabp	5	AB316984	NEI	NEI	RA ⁺	NBII
33	21-78267	Hkx4	1	AB309835	NEI	65	RA ⁺	NBII
34	21-78268	Tnfr	1	AB310259	NEI	655	X-gal + EST profile	NBII
35	21-78282	Ucp3	16	AB309947	NEI	522	EST profile	NBII
36	21-78319	Rpl3	19	AB314355	NEI	476	EST profile	NBII
37	21-78321	AKR107D(1)Rat.1ncRNA	6	AB305825	-	7	X-gal + Novel gene	NPPI
38	21-78361	Dna	18	AB323777	-	44	X-gal	NPPI
39	21-78367	Pip3kac1	5	AB252761	NEI	237	EST profile	NBII
40	21-78373	Nov	15	AB252763	-	589	X-gal + EST profile	NBII
41	21-78386	Nid4g2	2	AB317997	NEI	153	EST profile	NBII
42	21-78326	E19Ww1a2a	19	AB333339	NEI	520	EST profile	NBII
43	21-78336	Ppat	5	AB306133	-	726	X-gal + EST profile	NBII
44	21-78372	Hes1	12	AB310368	NEI	2	X-gal	NBII
45	21-78374	EST	19	AB305561	-	NEI	X-gal + Novel gene	NPPI
46	21-78384	Pdfr1	11	AB317133	-	432	X-gal + EST profile	NBII
47	21-78336	Cdk16	8	AB317992	-	73	X-gal	NBII
48	21-78380	Rbm12	2	AB301831	-	1342	X-gal + EST profile	NBII
49	21-78380	Rpl3	6	AB317942	-	117	X-gal + EST profile	NBII
50	21-7838	Cux3	2	AB271136	NEI	533	EST profile	NBII
51	21-78376	Nov	11	AB313414	NEI	336	EST profile	NBII
52	R	Rha8	9	-	NEI	734	EST profile	NBII

表11次スクリーニングで選択したマウスライン

さらに2次スクリーニングでは、骨形態計測、骨力学試験、骨 X-gal 染色などを候補ラインで実施した。(図2a)

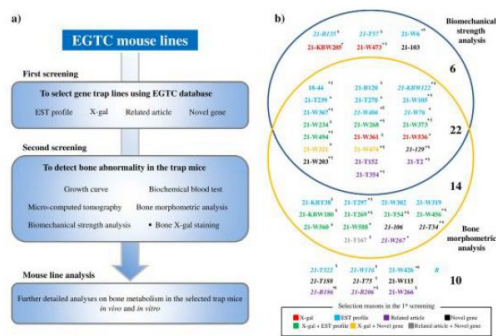


図2 a)スクリーニング手法 b)1次スクリーニングの結果

4. 研究成果

1次スクリーニングで選択した52とラップラインのうちオスでは42トラップライン(80.8%)において骨形態計測または骨力学試験のいずれかで異常を示した。(図2b)

1次スクリーニングでは4つの基準でマウスラインを選択したが、その中で X-gal 染色が有意に骨表現型を認めた (P=0.0161) (表2)

	1 st screening selected lines	2 nd screening positive lines	BMA positive lines	BMA positive lines	2 nd screening negative lines	P value
EST profile	30	26	16 (53.3)	23 (76.7)	4	0.1828
X-gal	16	16	10 (62.5)	14 (87.5)	0	0.0161
RA	8	5	3 (37.5)	5 (62.5)	3	0.1712
Novel gene	11	8	5 (45.5)	7 (63.6)	3	0.3533

表2 1次スクリーニングの選択根拠と2次スクリーニングの結果の相関関係

また本スクリーニングにおいて、X-gal 染色によるトラップ遺伝子の組織特異性の確認は骨表現型異常の探索に有意に有用であった (P = 0.0057) (表3)

	X-gal staining		Total	P-value
	(+)	(-)		
2 nd screening positive lines	33 (78.6)	9 (21.4)	42	0.0057
2 nd screening negative lines	3 (30.0)	7 (70.0)	10	

表3 2次スクリーニング結果とX-gal 染色の結果

骨形態計測のパラメーターのひとつである皮質骨骨塩量と、骨力学試験のパラメーターのひとつである最大点試験力において、各トラップラインにおいて WT とトラップラインの比を用い、全 52 ラインの相関を散布図に示した。(図3) 2次スクリーニングで骨形態計測または骨力学試験陰性のラインは基準点周囲にプロットされる一方で、2次スクリーニングで骨形態計測または骨力学試験要請のラインは多くのラインが相関近似直線の周囲にプロットされた。一方で近似直線から大きく離れてプロットされたラインも認められ、骨塩量に依存しない骨強度の異常があると思われる。

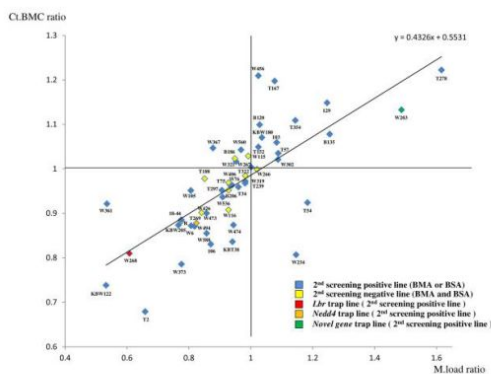


図3 全マウスラインの皮質骨骨塩量比と最大点試験力比の相関

例として、本スクリーニングシステムを使用して選択された Lbr おび Nedd4 遺伝子のトラップラインの詳細なマウスライン解析を行ったところ、これらのマウスラインで有意な骨量減少および骨脆弱性を示し、Lbr おび Nedd4 遺伝子は骨芽細胞分化に関与する遺伝子であることが示唆された。(図4)

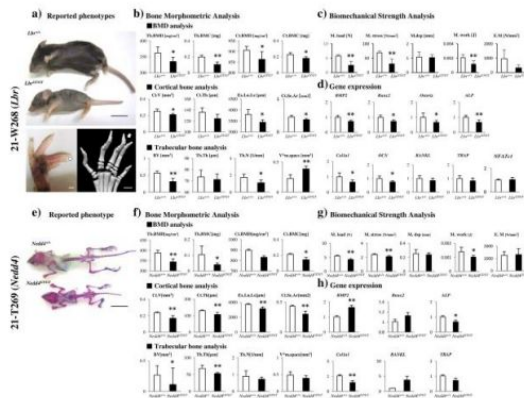


図4 21-W268と21-T269 マウスライン解析の結果

この EGTC データベースを用いたスクリーニングシステムは、非常に効率的で骨代謝に關与する新規遺伝子の同定に極めて有効である。本スクリーニングで異常を認めたマウスラインは、骨代謝における重要な遺伝子をトラップしている可能性が高く、本研究により新規骨代謝異常モデルマウスライブラリーを充実していくことが可能となり、これらのトラップマウスは、バイオリソースとして様々な骨代謝研究において有効活用が可能で、今後の骨粗鬆症などの病因・病態の解明、また将来的には創薬・治療への貢献が期待できると考える。

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)

査読: 有

Syuji Kurogi¹, Tomohisa Sekimoto, Taro Funamoto, Tomomi Ota, Shihoko Nakamura, Takuya Nagai, Mai Nakahara, Kumiko Yoshinobu, Kimi Araki, Masatake Araki & Etsuo Chosa

Development of an efficient screening system to identify novel bone metabolism-related genes using the exchangeable gene trap mutagenesis mouse models. Sci Rep. 2017; 7: 40692. Published online 2017 Jan 20.

doi: 10.1038/srep40692

[学会発表](計 5件)

1: 第30回日本整形外科学会基礎学術集会: 富山市民プラザ: 2015年10月22・23日
可変型遺伝子トラップ法で作製した Tmem161a 欠損マウスは明らかな骨量増加を呈する

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、中村志保子、永井琢哉、中原舞、吉信公実子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

2: 第33回日本骨代謝学会学術集会: 京王プラザホテル: 2015年7月23-25日
可変型遺伝子トラップ法で作製した

Tmem161a 欠損マウスは明らかな骨量増加を呈する

黒木修司、関本朝久、船元太郎、中村志保子、大田智美、永井琢哉、帖佐悦男

3: 第 88 回日本整形外科学会学術総会: 神戸ポートピアホテル: 2015 年 5 月 21-24 日

可変型遺伝子トランプ法で作製した Tmem161a 欠損マウスは明らかな骨量増加を呈する

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、中村志保子、中原舞、荒木喜美、吉信公美子、荒木正健、帖佐悦男

4: 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会: 城山観光ホテル: 2014 年 10 月 9-10 日

可変型遺伝子トランプ法で作製した Tmem161a 欠損マウスは明らかな骨量増加を呈する

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、中村志保子、中原舞、吉信公美子、荒木喜美、荒木正健、帖佐悦男

5: 第 32 回日本骨代謝学会学術集会: 大阪国際会議場: 2014 年 7 月 24-26 日

可変型遺伝子トランプ法を用いた骨代謝に關与する新規遺伝子群の効率的スクリーニング

黒木修司、関本朝久、船元太郎、大田智美、中村志保子、帖佐悦男

平成 26 年日本骨代謝学会学術集会 優秀ポスター賞演題

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒木 修司 (Kurogi Shuji)

宮崎大学医学部整形外科・助教

研究者番号: 40418843

(2) 研究分担者

帖佐 悦男 (Chosa Estuo)

宮崎大学医学部整形外科・教授

研究者番号: 00236837

関本 朝久 (Sekimoto Tomohisa)

宮崎大学医学部整形外科・講師

研究者番号: 60305000

荒木 正健 (Araki Masatake)

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 (Araki Kimi)

熊本大学生命資源研究支援センター・教授

研究者番号: 90211705

(3) 研究協力者

船元 太郎 (Funamoto Taro)

大田 智美 (Ohta Tomomi)

中村 志保子 (Nakamura Shihoko)