

# 骨粗鬆症モデルマウス(SAMP6)を用いた骨量決定遺伝子群の同定

●樋口 京一<sup>1)</sup> ◆清水 基行<sup>2)</sup> ◆澤下 仁子<sup>1)</sup>

1) 信州大学大学院医学研究科 2) 京都大学大学院医学研究科、現国立病院機構宇多野病院

## 〈研究の目的と進め方〉

老人性骨粗鬆症は高齢化が進んでいる我が国が解決しなければならない重要な病態の一つである。ヒトの骨量の遺伝形式は複数の遺伝子によって規定される多因子系である。老年性骨粗鬆症モデルマウスである"SAMP6"系マウスは低骨量を示し、その遺伝形式はヒトと同じく多因子系である(図1)。我々はSAMP6系マウスを用いた大規模な交配実験を行い(QTL解析)、その遺伝子座が"11", "13", "X"染色体に存在することを明らかにした(Pbd1, Pbd2, Pbd3, Shimizu, Mamm Genom, 1999)(図2)。各候補遺伝子が存在する約~20cMの染色体領域のcongenic mouseを作成し、これらの領域に骨量決定遺伝子が存在することを確認した(Shimizu J Bone Mine Res 2001, Mamm Genom, 2002 論文1)。本研究の目的はこれらの原因遺伝子を単離、同定し、多因子疾患である骨粗鬆症の病態解明を目指すことである。

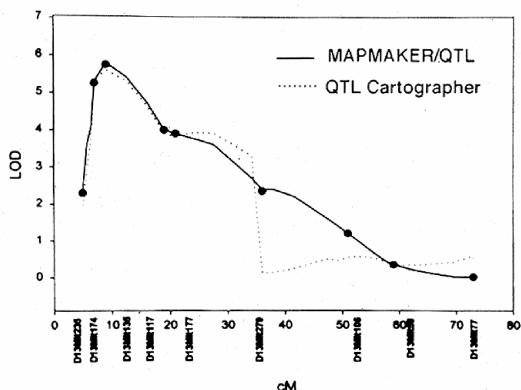
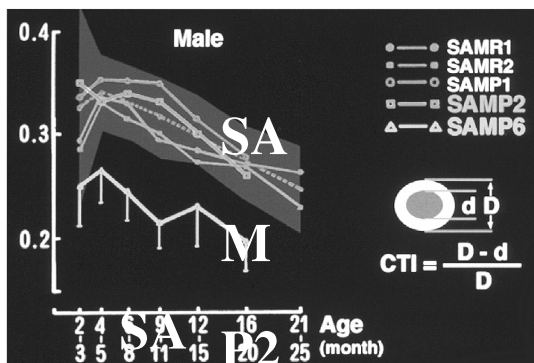


図1. 骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の大腿骨量(CTI)の加齢変化  
図2. 染色体13上の骨量決定遺伝子 Pdb2。

## 〈研究開始時の研究計画〉

研究開始時までに各骨量決定遺伝子領域に関して4種のcongenic mouse系統を作成した。Pdb1遺伝子(第11染色体)：①P6.P2-Pdb1b, ②P2.P6-Pdb1a, Pdb2遺伝子(第13染色体)：③P6.P2-Pdb2b, ④P2.P6-Pdb2a。Pdb3遺伝子(第X染色体)：P6.P2-Pdb3b, P2.P6-Pdb3a は作成

中であった。これらのcongenic mouse系統を基盤として骨量決定遺伝子の同定を目指した。

具体的な研究計画として以下の項目をあげた。

- 1). このcongenic mouseからさらに狭い領域をターゲットとした多数のsub-congenicマウスを作成中である(現在11番染色体10系統、13番7系統作成済み)。これらのマウスを用いてpositional cloningの手法で、原因遺伝子の同定を目指す。
- 2). これらのcongenic mouseや、SAMP6、SAMP2マウスの骨・骨髄 mRNAを用いてcDNA マイクロアレイ解析を行い、発現量の相違と染色体位置から原因遺伝子を同定する。不十分な場合はSSH (Suppression subtraction hybridization)法やDifferential Display法を用いる。
- 3). 狭められた候補領域の塩基配列を決定して、原因遺伝子の同定を目指す。
- 4). 候補遺伝子のtransgenic, knockout mouseを作成し候補遺伝子の確定と機能解析を行う。
- 5). これらの結果明らかにされた原因遺伝子のhuman homologueの遺伝子の同定と塩基配列決定、機能解析を行い、さらにヒトにおける多形の探索と骨量との相関を明らかにする。

## 〈研究期間の成果〉

図3に示したように2つの候補骨量決定遺伝子(Pbd1, Pbd2)のcongenic mouse 系統を作成し、その骨量を比較した結果、それぞれの領域に骨量決定遺伝子が存在することを確認した(論文1)。

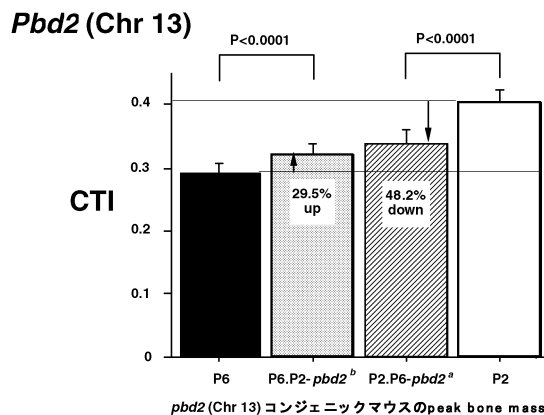


図3 Pdb2 congenic mouse の骨量

## ①Pbd2遺伝子の同定：

### ①-1) Pbd2 のsub及び sub-sub congenic mouseの作成

P6.P2-Pdb2bとSAMP6マウスの交雑仔から、Pbd2 候補領域内(~20 cM)で交差が起こっている個体を選抜し、再度交配を行い、この領域をホモに持つ"sub-congenic mice"を7系統(A-G系統)作成し、各系統のSAMP2マウス由来領域をfine mappingで同定した。各系統の雄マウスの4ヶ月齢での骨量を測定し、候補領域との関連を検討した(図4)。その結果、3 cM (5.8 Mbp) まで領域を絞り込んだ。

### Pbd2 (Chr13); Construction of congenic mapping

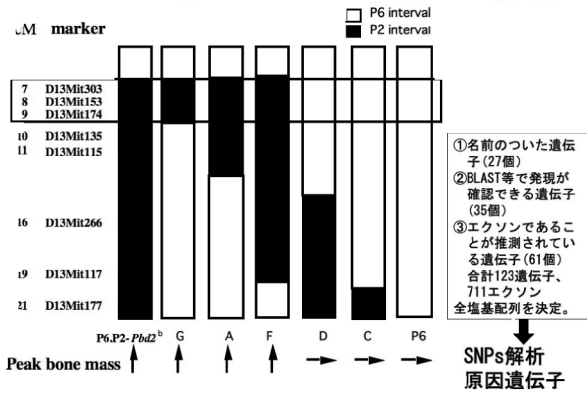


図4 Pbd2 sub-congenic mice の作成と骨量との関連

図4 Pbd2 sub-congenic miceの作成と骨量との関連  
最も狭まった候補領域を持つ"G" Sub-congenicマウス (G系統) とSAMP6との交配で更に狭まった領域を持つマウスを選抜し、ホモ化して (5系統)、骨量との関連を検討した。その結果、1.9 Mbpの領域に骨量決定遺伝子が存在することが明らかになった (図5)。

### Pbd2 Sub-sub-congenic mouse

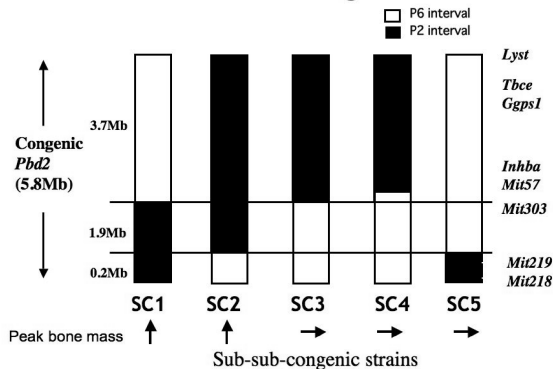


図5 Pbd2 Sub-sub-congenic mice の作成と骨量との関連

①-2,3) Pbd2に関する遺伝子解析とマイクロアレイ解析  
Sub-congenic mapを用いて絞り込んだPbd2の候補領域内の127遺伝子の全エクソンの塩基配列解析を行った。多くのSNPsが得られ、詳細なmappingが可能となった。この領域に存在する74個の機能的遺伝子内、アミノ酸置換を生じるSNPsが15遺伝子で発見された (図4)。

G系統マウスとSAMP6のcalvaria及び骨芽細胞からmRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ解析、及びsub-sub-congenicマウスでの最小候補領域に存在する9遺伝子と2 ESTsの発現を定量PCRで解析した。その結果Sfrp-4 (secreted frizzled-related protein 4)のみが、SAMP6でG系統マウスの約40倍高く発現していた。

Sfrp-4の高発現の原因を明らかにするためにSfrp-4遺伝子のpromoter領域 (約2,100 bp) と6 exonを含む遺伝子全長の塩基配列をSAMP6とSAMP2で比較した。その結果promoter領域に14個、intron部分に多数のSNPsを発見した。現在のところCalvaria由来MMC細胞を用いたSfrp-4遺伝子のpromoter解析ではSAMP6, SAMP2の系統差は認められない。

#### ①-4) Pbd2の候補Sfrp-4の機能解析

Sfrp-4 transgenic マウスを作成中であり、骨量への影響を解析する予定である。

#### ②) Pbd1遺伝子の同定:

#### ②-1) Pbd1のsub及びsub-sub congenic miceの作成

P6.P2-Pdb1bとSAMP6マウスの交雑仔から、Pbd1 候補領域内 (~30 cM) で交差が起きている個体を選抜し、交配を行い、この領域をホモで持つ"sub congenic mice"を13系統 (02 - 200系統) 作成し、各系統のSAMP2マウス由来領域をfine mappingで同定した。各系統の雄マウス、4ヶ月齢での骨量を測定し、候補領域との関連を検討した (図6)。その結果、3.5 cM (13 Mbp) まで領域を絞り込んだ。

### Pbd1 (Chr11); Construction of congenic mapping

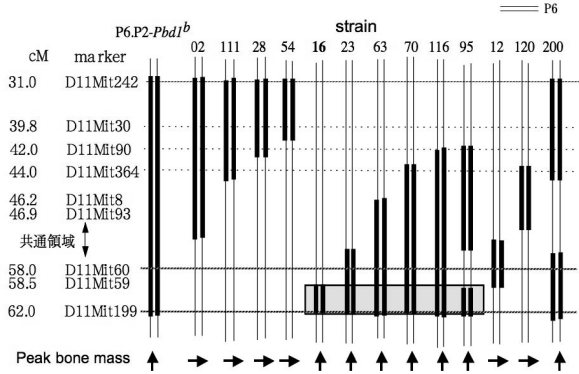
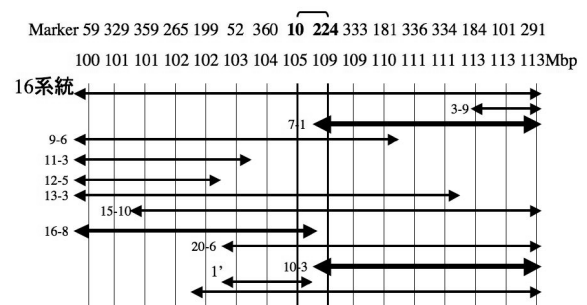


図6 Pbd1 Sub-congenic miceの作成と骨量との関連

最も狭まった候補領域を持つ"16" sub-congenic mouse (16系統) とSAMP6との交雑で更に狭まった領域を持つマウスを選抜し、ホモ化して (全12系統)、骨量との関連を検討した。その結果、D11Mit10-D11Mit224 (4 Mbp)の領域に骨量決定遺伝子が存在することが明らかになった (図7)。

### Pbd1 Sub-subcongenic mouseの作製



#### ②-2, 3) Pbd1に関する遺伝子解析とマイクロアレイ解析

P6.P2-Pdb1bとSAMP6の骨髄細胞からmRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、Interferon  $\gamma$  関連の遺伝子発現に顕著な差が認められ、その調節遺伝子であり、Pbd1領域に存在するIfp35が候補遺伝子と推測されたが、sub congenic map解析で、候補領域外にあることが明らかになり、さらにIFP35 transgenic マウスでも骨量の変化が認められなかった。

Sub-sub-congenic mapを用いて絞り込んだPbd1の候補領域内の54遺伝子の全エクソンの塩基配列解析を行ったが、多形はほとんど検出されず、この領域は両系統が同じ染色体ハプロタイプを持つことが明らかになり、Pbd1はSAMP6で新たに生じた突然変異である可能性が高く、今後この領域のより詳細な解析が必要である。

#### ③) Pbd3遺伝子の同定

##### ③-1) Pbd3のcongenic miceの作成

SAMP2にSAMP6のPbd3を導入したcongenic mouseを作成し、45.6 cMの領域が入れ替わっていることが明らか

になった (P2.P6-Pdb3a)。各congenic mouseの骨量の加齢変化を比較するとPbd3 bは4ヶ月齢での最高骨量を増加させ、退行期での骨密度減少を抑制することが示され、Pbd3は退行期のbone turnoverを調節している遺伝子である可能性が示唆された (図7)。

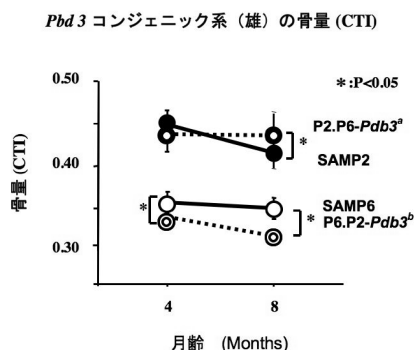


図7 Pbd3 congenic mouse の骨量の加齢変化

#### <国内外での成果の位置づけ>

実験用マウスを用いた骨量解析の最初の報告がPortland大から1998年に発表され、SAMP6を用いた我々の解析が1999年に、同様な研究がArkansas大学やJackson研究所からも報告されている。現在は4研究グループによる原因遺伝子解明の競走となっている。我々が明らかにした染色体11番 (Pbd1)、13番 (Pbd2) 遺伝子はどの研究グループにも共通する遺伝子であり、プライオリティを確保するためにも解析を急ぐ必要がある (Grupe et al, Science 292: 1915, 2001. Koller et al, J Bone Miner Res 18: 1785, 2003. Lang et al, J Bone Miner Res 20: 88, 2005.)。低骨量を示すC57BL/6系統を用いた大規模交配によりChr11に連鎖領域が同定され、最近その原因遺伝子が同定された (Alox15) が、Pbd1とは異なっている (Klein, Science 2004)。また、Pbd2の存在するヒト7p14の領域は最近、連鎖解析にて骨密度のQTLが存在することが示唆されており (Kammmerer et al, J Bone Miner Res 18: 2245, 2003. Ralston et al, Hum Mol Genet 14: 943, 2005.)、マウス、ヒトにおいて同一の骨量制御遺伝子の可能性も生じ、非常に興味深く、当該遺伝子の精査は急務であると思われる。

一般に動物モデルの量的形質の原因遺伝子を同定することは極めて困難である。SAMP6の骨量調節遺伝子の同定の試みはその困難さを着実に克服しつつある点で高く評価されている。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1. Pbd1 (Chr 11): Sub及びsub-subcongenic mouseの作成は困難を極めた。その途中で、cDNAマイクロアレイ解析では有力な候補遺伝子であったIfp35遺伝子が sub及びsub-subcongenic mouseを用いたより詳しいMap解析やtransgenic mouseを用いた解析の結果、候補遺伝子から外さねばならない結果となった。幸いにしてSub-subcongenic mouseの解析で領域をかなり狭めることが出来たが、どうしてもこの領域内の遺伝子のエキソン内にはSNPsを発見できないため、高骨量 (SAMP2)、低骨量 (SAMP6)とも同一のハプロタイプを持ち、したがってSAMP6に生じたエクソン外の突然変異が原因と考えるに至った。したがって候補領域の全塩基配列の決定を行う必要が生じてきた。

2. Pbd2 (Chr 13): Sub-subcongenicマウスの解析とcDNA

アレイや定量PCRでほぼ原因遺伝子 (Sfrp-4) を突き止め現在transgenic マウスを作成して最終的な同定を目指している。Sfrp-4 のPromoter部分に多数のSNPsが発見されているが、現在のところ、低骨量マウスでの高発現を説明できるシステムは見つかっていない。

3. Pbd3 (Chr X): congenic mouseの作成とこれを利用してPbd3の興味深い機能が明らかになったが、様々な事情でsub-congenicマウスの作成が進んでいない。

4. その他: このような解析には多大な労力と、費用更に時間が必要であるために、研究の遂行と研究成果の公表に遅滞感が認められる (参考論文2)。

#### <今後の課題>

Pbd2の原因遺伝子として我々が同定したSfrp-4は最近、骨芽細胞系の分化・増殖に強く関わるとして注目されているWntシグナル調節遺伝子の一つであり、SAMP6のcalvariaでは若齢から非常に高発現し、骨芽細胞への分化を抑制するために低骨量を招くと考えている。最近我々は、recombinant 蛋白を投与することで、マウスの骨芽細胞系培養細胞の分化、増殖を抑制する作用が存在することを確かめ、骨量制御遺伝子の可能性が非常に高いと考えられた。これまでの成果は現在論文投稿の準備を進めている (参考論文2)。今後、高発現のメカニズムの解明とTransgenic.及びKnockout mouseを用いた機能解析が必要である。

研究開始当初の予定であったヒトでの骨量への関与の研究に関しては、京都大学倫理委員会や信州大学医学部倫理委員会からの承認は既に得られているので、被験者にインフォームドコンセントなどを徹底して行うように配慮し、ヘルシンキ宣言にのっとり研究を遂行する予定である。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文 (研究代表者)

1. 0209022242

Shimizu, M., Higuchi, K., Kasai, S., Tsuboyama, T., Matsushita, M., Matsumura, T., Okudaira, S., Mori, M., Koizumi, A., Nakamura, T., and Hosokawa, M., A congenic mouse and candidate gene at the Chr 13 locus regulating bone density. Mamm. Genom., 13, 335-340 (2002)

2) データベース/ソフトウェア なし

3) 特許など なし

4) 参考論文 (共同研究者、投稿準備中)

1. Kasai, S., Shimizu, M., Matsumura, T., Okudaira, S., Matsushita M, Tsuboyama, T., Nakamura, T., and Hosokawa, M., Consistency of low bone density across bone sites in SAMP6 laboratory mice. J. Bone Miner. Metab. 22, 207-214 (2004)

2. Nakanishi, R., Otsuki, B., Mori, M., Tsuboyama, N., Shimizu, M., and Nakamura, T., Sfrp4 as a candidate for quantitative trait locus for peak femoral mineral Density (Pbd2) on chromosome 13, which modulates bone formation. (論文投稿準備中)