

平成10年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

研究課題名

骨粗鬆症モデルマウスを用いた骨量遺伝子の解析

課題番号

(H10-長寿-80)

主任研究者

樋口京一

信州大学医学部加齢適応研究センター教授

平成 10 年度

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

研究課題名

骨粗鬆症モデルマウスを用いた骨量遺伝子の解析

課題番号
(H10-長寿-80)

主任研究者

樋口京一

信州大学医学部加齢適応研究センター教授

骨訴訟症モデルマウスを用いた骨量遺伝子の解析

主任研究者 樋口京一 信州大学医学部加齢適応研究センター教授

研究要旨 骨粗鬆症のモデルマウスである SAMP6 の low peak bone mass に連鎖する QTL が第 11、13、X 各染色体に存在することが示された。そこで、最大の lod score を示す第 11 染色体上の candidate gene である G-CSF、chondroadherin、Scya2、NOS、Nog の genome の塩基配列を決定したが、塩基配列に変異は見られなかった。原因遺伝子が既知のものでない可能性が考えられその場合の遺伝子単離に必要な positional cloning の前段階として、polygene 系の遺伝形式である SAMP6 のシステムを single gene 系の遺伝形式に変換するために、各々の染色体について変異のある QTL を一つずつ持つ congenic mouse 各系統の作製を開始した。Speed congenic mouse の手法で QTL 領域の 3 つのマーカー（約 20cM の interval）による選択を行いながら、SAMP2 と SAMP6 を連続 7 回戻し交配して、第 11、13、X 各染色体で一つの QTL を含む SAMP2 の background をもつ系統、SAMP6 の background をもつ系統の 2 系統、合計 6 系統の作製をほぼ完成した。今後匹数が増えたところで、各系統骨量測定を行うことで先の連鎖解析の結果及び、原因遺伝子が interval 内に存在することを証明し positional cloning を目指す。更に各 congenic 系統について、骨形態計測を含む in vivo study、及び骨芽細胞、脂肪細胞、破骨細胞各系の培養を含む in vitro study を行い表現形を決定し、おのおのの QTL の機能を調べる予定である。

分担研究者

細川昌則・京都大学再生医科学研究所・再生誘導研究分野・助教授

子座を同定しようとしてきたこれまでの研究をさらに推し進め、原因遺伝子そのものを同定を目指すことが本研究の目的である。

A. 研究目的

老人性骨粗鬆症の予防、治療は健康で活動的な高齢生活を送るために緊急に解決すべき課題である。老人性骨粗鬆症は本来遺伝的要因の大きな老化病態であるが、複雑な遺伝形式のため、原因遺伝子を明らかにすることは不可能であり、詳細な遺伝解析の可能なモデルマウスを用いた解析が必要不可欠であった。老人性骨粗鬆症のモデルマウスである SAMP6 系統マウスの低骨量の最大原因は成長期における低い peak bone mass にあることがこれまでの我々の研究によって明らかにされている。交配実験による連鎖地図作成により SAMP6 の低骨量状態を決定している遺伝

B. 研究方法

1. **動物**：SAMP6（低骨量系）、SAMP2（高骨量系）マウスは京都大学再生医科学研究所で兄妹交配によって維持され、conventional condition で飼育された。QTL 解析には 488 匹の F2 交雑子を用いた。染色体 DNA は生後一ヶ月で切断した尾から、RNA は大腿骨の骨髓より分離した。骨量の測定は生後 4 ヶ月で屠殺したマウスの大腿骨の軟 X 線写真から骨皮質幅比(CTI)を求めた。
2. **候補遺伝子の塩基配列決定**：ダイターミネータサイクルシーケエンシング法で塩基配列を決定した。すなわち ABI Big Dye

Terminator Cycle Sequencing キットを用いてキットに附属するプロトコールにのっとり 9600 型遺伝子増幅装置を用いて反応を行い、ABI PRISM 310 型ジェネティックアナライザの Large Capillary を用いて塩基配列を決定した。

3. 候補領域の congenic mouse 系統の作成：同定された 3 つの候補染色体領域（11, 13, X 染色体）の機能を解析し、さらには将来、positional cloning 法によって骨量規定遺伝子を同定するために、SAMP2 の遺伝的背景にそれぞれの当該染色体領域のみ SAMP6 の対立遺伝子を持つ congenic strain 3 系統およびその逆に SAMP6 の遺伝的背景に当該染色体領域のみ SAMP6 の対立遺伝子を持つ congenic strain 3 系統を作成した。back-cross 第 5 世代より各染色体あたり 2 つ以上のマーカー(全 46 マーカー)を用いて、交雑仔マウスの全ゲノムスキャンニングを行い、congenic mouse の完成のスピードアップを計った。

4. ゲノムマッピング：Research Genetics 社 (Huntsville Ala, USA) より購入したマイクを用いて行い、解析は MAPMAKER を用いて行った。

C. 研究結果

1. 候補遺伝子の塩基配列決定：SAMP6 と SAMP2 系マウスとの交配実験が完了し、SAMP6 雄において最大骨量を減少させる遺伝子の染色体上の位置を最終的に決定した。図 1 と図 2 に明らかになった骨量を調節する染色体領域を示した。第 11 染色体上に最も強い連鎖のピークが明らかにされ、そのロッド値(LOD)はセントロメアより 51.3 cM(センチモルガン)でピークを示し最大値は 10.8 であった。さらに雌の F2 マウスのゲノム解析を行い、この領域の連鎖を確認した。multiple regression 解析によりさらに絞りこまれた候補領域には、骨量に関与すると考えられる既知の候補遺伝子が 10 個以上認められている。これらの候補遺伝子の塩基配列を決

定して SAMP6 と SAMP2 との相違が存在するかを調べた。

Glanurocyte colony stimulation factor (顆粒球コロニー形成刺激因子：Csf or GCSF)は第 11 染色体の 56.8 cM に存在する遺伝子で、Csf を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは血清中の顆粒球が増大すると同時に骨吸収が亢進し骨粗鬆症が誘導されることが報告されている。SAMP6 でも Csf の発現量の増大と顆粒球の増加が報告されているのでまず最初の候補遺伝子として Csf 遺伝子の解析を行った。2 ヶ月齢の SAMP6 と SAMP2 マウス大腿骨より骨髓細胞を採取し total RNA を分離した。両系統における骨髓での Csf の発現量を RT-PCR 法で比較したが、顕著な相違は観察されなかった。次に SAMP6 と SAMP2 の肝臓より DNA を分離した。Csf 遺伝子は 5 つのエクソンと 4 つのイントロンよりなる約 3000 塩基の遺伝子であるが、第 1 エクソンの開始メチオニンコドンより、第 5 エクソン内の終始コドンまでを含む部分を PCR 法で増幅した。PCR 産物を精製した後、塩基配列を決定したが残念ながら SAMP6 と SAMP2 の Csf のエクソンの遺伝子配列は完全に一致した。図 3 にその結果を示す。これらの結果より Csf が原因遺伝子とは考えにくい。さらにプロモーター領域にも変異は発見されなかった。図 4 にそのプロモーター領域の塩基配列を示した。また第 3 イントロンにはマイクロサテライト配列が発見されたが SAMP6 と SAMP2 では繰り返し数に相違は観察されなかった。

コンドロアドヘリン(chondroadherin)は第 11 染色体上の 53 cM に位置する遺伝子 (Chad)で骨芽細胞の骨マトリックスへの接着を促進する作用を持つ。4 つのエクソンを PCR で増幅しその塩基配列を決定したが SAMP6 と SAMP2 系統間には違いは発見できなかった。その結果を図 5 に示した。46 cM 付近には骨髓中でのマクロファージの活性を調節する beta-chemokine の superfamily が存

在する。その中で small inducible cytokine A2 (Scya2) 遺伝子の発現量と塩基配列を比較したが両系統で相違は観察されなかった。どこ結果を図 6 に示す。

現在は他の候補遺伝子である NOS2 (inducible NO synthase), Cola1(collagen type1 α 1 chain), Rara (retinoic acid receptor alpha), Nog (noggin), Stat (signal transducer and activator of transcription) 等や他の beta-chemokine の superfamily 遺伝子について塩基配列決定を進めているがまだ変異は発見されていない。

さらに候補領域を狭めるために SAM 各系統と AKR マウスの第 11 染色体の詳細なゲノムタイピングを行った。図 7 にの骨量調節候補領域の詳細なマッピングの結果と現在その領域に存在することが報告されている遺伝子をまとめた（ヒトの染色体相同部分に存在する遺伝子を含む）を示した。SAM6 と SAMP2 の組み替えはセントロメア側は D11Mit8 と D11Mit93 の間テロメア側は D11Mit160 と D11Mit160 で起こっていることが明らかになった。しかし AKR や SAMR1 系統は高骨量系統に相当するため、SAMP6 に特異的な領域は発見できず、SAM 系統の成立以前に低骨量遺伝子が存在したとは考えにくい結果となった。SAM 系統群成立以後に SAMP6 で突然変異が生じたと考えている。

2. 候補領域の congenic mouse 系統の作成：
第 11 染色体は D11Mit242 から D11Mit59 までの約 30 cM、第 13 染色体は D13Mit174 から D13Mit177 までの約 12 cM、X 染色体は DXMit113 から DXMit97 までの約 12 cM を導入した congenic mouse の作成を進めており、現在では戻し交配の第 7 世代まで交配が進んでいる。残りの染色体領域がすべて recipient 系統に置換したヘテロマウスの作成に成功し、さらにこれらのマウスの交配によって導入領域をホモに持つマウスの作成にも成功している。図 8 と図 9 にスピード congenic 作成に

使用した 46 のマイクロサテライトマーカーの染色体上の位置とコンジェニックマウスで recipient 系統に導入された染色体領域を示した。

現在 congenic mouse の作成は主として京都大学再生医科学研究所再生誘導研究分野で行われていおり、各系統の骨量の測定が行われている。

D. 考察

SAM(Senescence-Accelerated Mouse)の一系統である SAMP6 は生後 4 ヶ月で達する最大骨量(peak bone mass) が有意に低い老年性骨粗鬆症のモデル動物とされている。現在まで SAMP6 が低骨量をきたす原因の一側面として、骨内膜側の骨量低下、骨髄間質細胞から骨芽細胞への分化抑制と脂肪細胞への分化亢進、骨髄造血環境の老化促進が認められ、分子生物学的レベルでは骨髄間質細胞の Interleukin 11 の発現量低下などが報告されているが本質的な原因は不明である。ヒトにおいては骨量は polygene 系の遺伝形式をとり、peak bone mass がその遺伝的因子として注目されている。現在まで Vitamine D receptor 等、種々の候補遺伝子の遺伝的多形を用いた association study が行われているが統一的な見解は得られていない。骨粗鬆症等の退行性疾患では家系分析を用いた全染色体レベルでの量的形質遺伝子座(QTL)解析は表現型値に影響を及ぼす因子が多すぎるため困難であり、連鎖地図、物理的地図、遺伝子単離という positional cloning の手法は未だ行われていない。こういった点から自然発症モデル動物を用いた研究は有効であると考えられる。本研究で SAMP の低骨量を規定する染色体領域が明らかになり、この領域に存在する既知遺伝子の変異解析を行ったが原因遺伝子の解明には至らなかった。今後はさらに可能な限り多数の遺伝子の解析を行うつもりであるが、未知の遺伝子が原因である可能性も大きいため、これらの領域に関する congenic mouse を

作成した。スピード congenic マウス作成法に基づき、戻し交配 6 世代で congenic マウス作成に成功した。今後はこの貴重な congenic マウスを利用して 1) 導入染色体領域の骨形成に及ぼす効果を解析し、原因遺伝子の機能を明らかにする。2) 新たな交配解析を行い単一遺伝子による支配となった骨量遺伝子の positional cloning を目指す。

単一遺伝子が原因となる遺伝疾患に比べると多遺伝子による遺伝疾患の解析は格段に困難である。しかし高齢者社会において重要なのはこのような遺伝疾患である。SAMP6 を用いた遺伝解析がさらに発展し、最終的に原因遺伝子群の human homologue が明らかにされ、その遺伝的多形と骨量との相関がヒトでも認められれば骨粗鬆症の診断、予防、治療への活用が期待される。

E. 結論

老人性骨粗鬆症のモデルマウスである SAMP 系統マウスを用いた遺伝的解析により骨量を規定する 3 つの染色体領域が同定された。この領域に存在する候補遺伝子に変異は発見されなかった。これらの領域の congenic マウスが作成され、今後の原因遺伝子の解明のための有力なモデルマウスになると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

清水基行、樋口京一、坪山直生、松下睦、木本光俊、藤澤裕美、夏農、千葉卓哉、中村孝志、細川昌則：老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の低骨量の QTL 解析。基礎老化研究、vol. 22: 25 1998

清水基行、坪山直生、松下睦、笠井宗一郎、細川昌則、樋口京一、中村孝志：老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 における低骨量の QTL 解析。日本整形外科学会雑誌、Vol. 72: 1580 1998.

M. Shimizu, K. Higuchi, B. Bennett, C. Xia, T. Tsuboyama, S. Kasai, T. Chiba, H. Fujisawa, K. Kogishi, H. Kitado, M. Kimoto, N. Takeda, M. Matsushita, H. Okumura, T. Serikawa, T. Nakamura, T.E. Johnson, M. Hosokawa: Identification of peak bone mass QTL in a spontaneously osteoporotic mouse strain. *Mamm Genome*. 10: 81-87, 1999.

N. Takeda, T. Tsuboyama, R. Kasai, K. Takahashi, M. Shimizu, T. Nakamura, K. Higuchi, M. Hosokawa: Expression of the c-fos gene induced by parathyroid hormone in the bones of SAMP6 mice, a murine model for senile osteoporosis. *Mech Ageing Dev*. 1999. in press.

C. Xia K. Higuchi, M. Shimizu, T. Matsushita, K. Kogishi, J. Wang, T. Chiba, MFW. Festing, M. Hosokawa: Genetic typing of the Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains with maicrosatellite markers. *Mamm. Genone* 1999 (in press)

総説

樋口京一、細川昌則：老化促進モデルマウス(SAM)を用いた老化科学への分子学的アプローチ。Moelcular Medicine Vol. 35: 606-615, 1998

細川昌則、坪山直生、樋口京一：老年性骨粗鬆症（老化促進モデルマウス：SAM6）。Moelcular Medicine Vol. 35: 541-544, 1998

細川昌則、樋口京一：老化モデルとしての Senescence Accelerated Mouse(SAM)。現代医療 Vol. 30: 483-488, 1998

2. 学会発表

清水基行、樋口京一、坪山直生、松下睦、木本光俊、藤澤裕美、千葉卓哉、夏晨、中村孝志、細川昌則：老化促進モデルマウス(SAM)に関する実験的研究 110. 老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の低骨量の QTL 解析。第 87 回日本病理学会 (1998. 4. 15) 広島

清水基行、樋口京一、坪山直生、松下睦、木本光俊、藤澤裕美、夏晨、千葉卓哉、中村孝志、細川昌則：老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の低骨量の QTL 解析。第 21 回日本基礎老化学会 (1998. 6. 17) 東京

清水基行、樋口京一、坪山直生、松下睦、木本光俊、笠井宗一郎、藤澤裕美、夏晨、千葉卓哉、中村孝志、細川昌則：老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の低骨量の QTL 解析。第 14 回 SAM 研究協議会 (1998. 7. 3) 京都

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

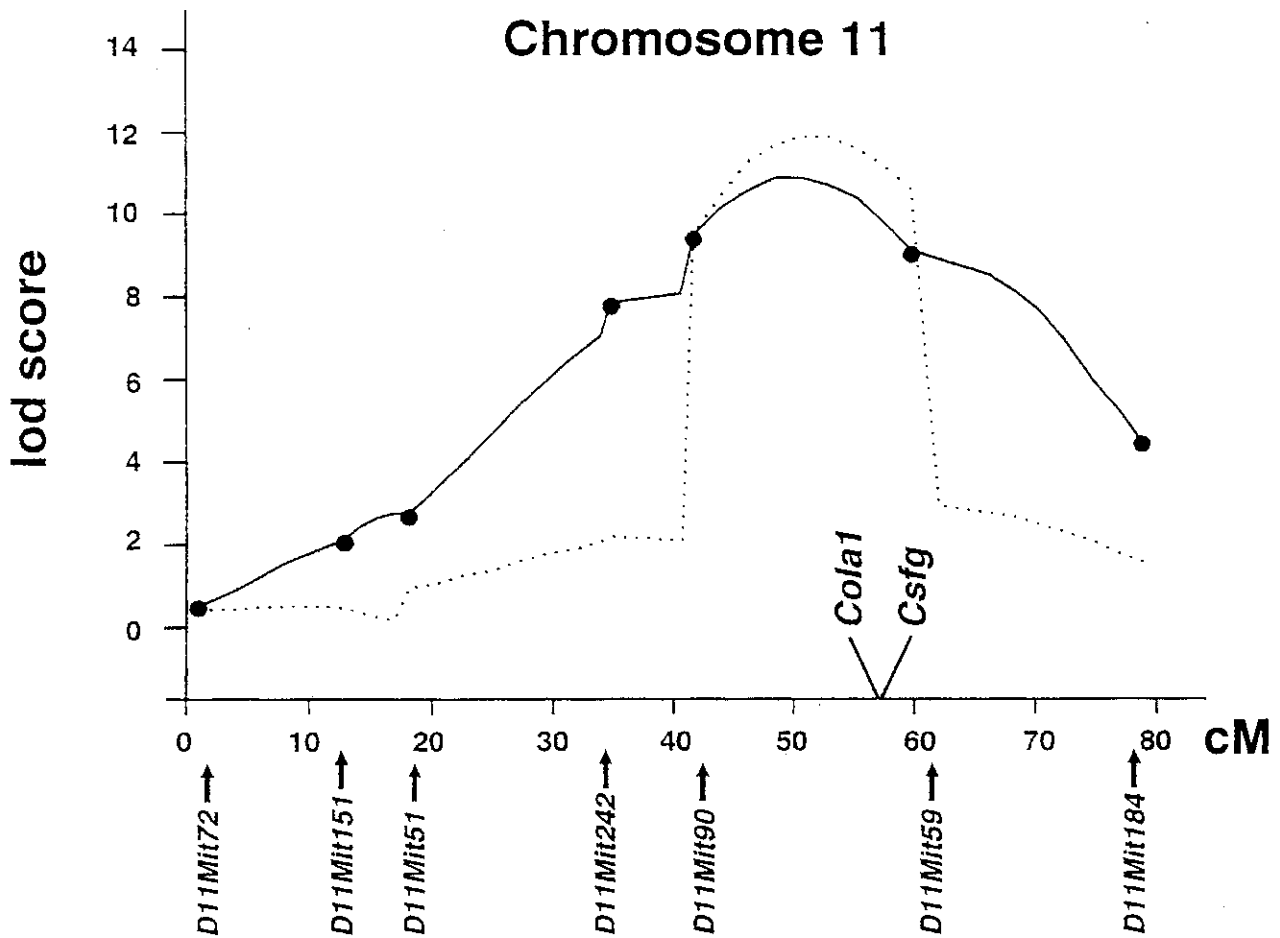


図1 第11染色体におけるCTIのLOD値の計算結果

全部で246匹の雄第2代交雑子(F2)を用いた。実線はMAPMAKER/QTLプログラムを用いて計算した。点線はQTL Cartographerを用いて multipleregression解析で計算した値を示す。横軸はセントロメアーからの距離を表し、用いたマイクロサテライトマーカーを図の下部にしめた。Cola1は1型コラーゲンの α 鎖、Csfgは顆粒球コロニー形成刺激因子遺伝子の位置を示す。

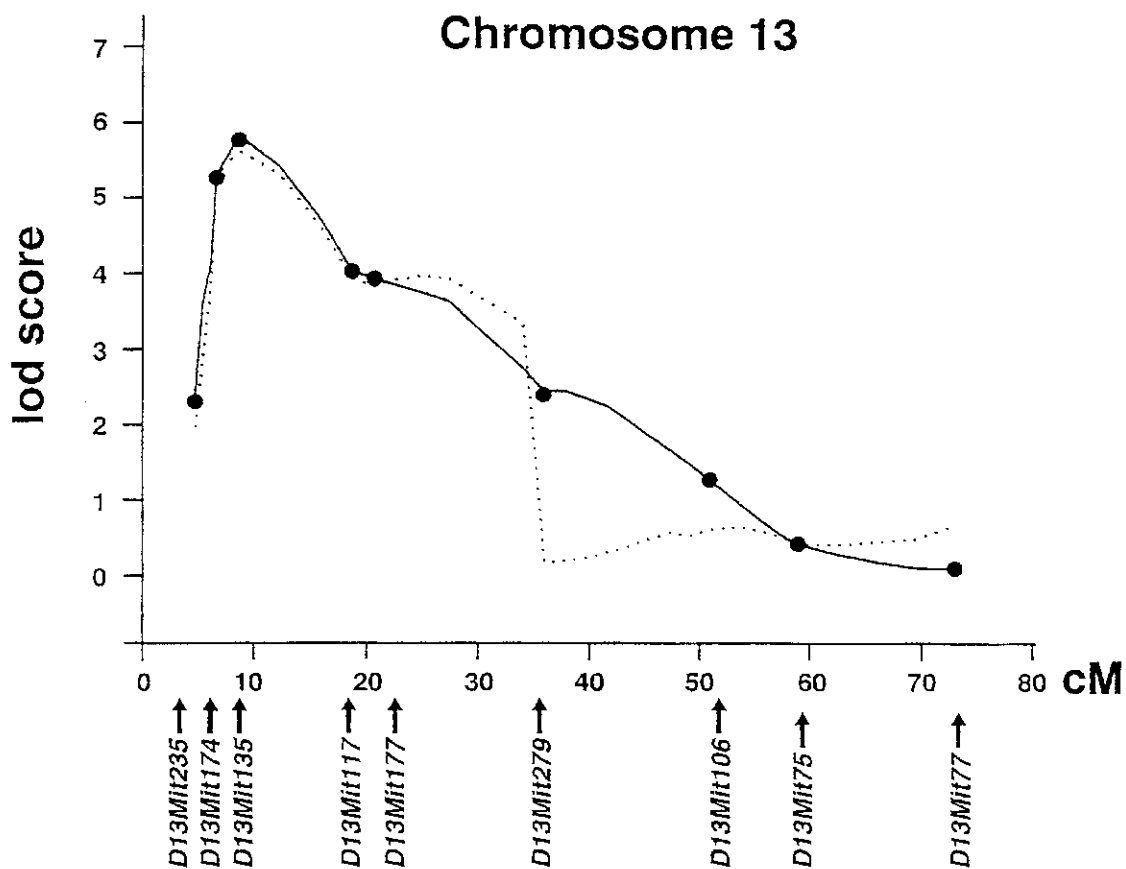
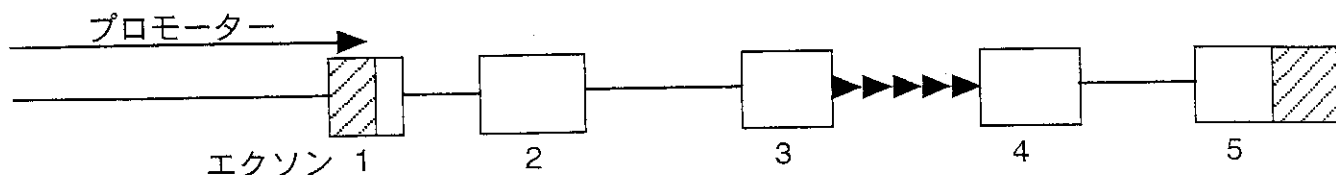


図2 第13染色体におけるCTIのLOD値の計算結果
全部で246匹の雄第2代交雑仔(F2)を用いた。実線はMAPMAKER/QTLプログラムを用いて計算した。点線はQTL Cartographerを用いてmultipleregression解析で計算した値を示す。横軸はセントロメアからの距離を表し、用いたマイクロサテライトマーカーを図の下部にしめた。



エクソン 1

ATGGCTCAACTTTCTGCCCAGAGGGCGCATGAAGCTAATGG

エクソン 2

CCCTGCAGCTGCTGCTGTGGCAAAGTGCACATATGGTCAGGACGAGAGGCCGTTCCCTGGTCACTGTCAGCGCTCTGCCAC
CATCCCTGCCTCTGCCCCGAAGCTTCCTGCTTAAGTCCCTGGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGCCAGCGGCTCGGTGCTGC
TGGAGCAGTTG

エクソン 3

TGTGCCACCTACAAGCTGTGTCAACCCCGAGGAGCTGGTGTGTGCTGGGCCACTCTCTGGGGATCCCGAAGGCTTCCCTGAG
TGGCTGCTCTAGCCAGGCCCTGCAGCAG

エクソン 4

ACACAGTGCCTAAGCCAGCTCCACAGTGGGCTCTGCCTCTACCAAGGTCTCCTGCAGGCTCTATCGGGTATTTCCCTGCC
CTGGCCCCCACCTTGGACTTGCTTCAGCTGGATGTTGCCAACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAG

エクソン 5

ATGGAAAACCTAGGGGTGGCCCTACTGTGCAGCCCACACAGAGCGCCATGCCAGCCTTCACTTCTGCCTTCCAGCGCCGG
GCAGGAGGTGCTCCTGGCCATTTTCGTACCTGCAGGGCTTCCTGGAGACGGCTCGCCTTGCTCTGCACCACTTGGCCTAG

図3 SAMP6及びSAMP2系マウスの*Csf1*遺伝子解析の方法と結果

（上段）マウス*Csf1*遺伝子のエクソン/イントロン構造。エクソンをBoxで、プロモーターの位置を矢印で示した。エクソン内のnon-coding領域を斜線で示した。また、矢頭で第3イントロン内にマイクロサテライト配列の存在を示した。

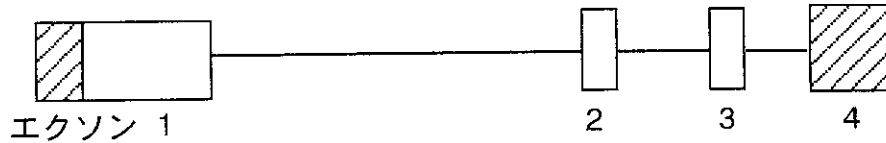
（下段）SAMP6及びSAMP2系マウスの*Csf1*遺伝子のエクソン部の塩基配列を示す。開始メチオニン及び終止コドン~~を太字で示した~~。両系統間で塩基配列の違いは検出されなかった。また、第3イントロン内にマイクロサテライト配列の長さにも違いは見られなかった。

```
aacaccctgcagcgattcaggcctgggtgtggctggaagagaggaagagagtt  
gaggggggggacaagacgtcaaggaaggaacagagattccccgatttcacaaa  
ctttcgcaaacagcttttccccaaccccctgcattgtcctgagctatcatca  
tttgcataaatcctgggaagttattactaagcctgagttgccccagccccagc  
aatttcctcccggggccttgatggctttatgtataaaggccccctggagctgc  
ccctggcagagcccagagctgcagcccagatcaccagaatccATGGCTCAAC  
TTCTGCCCAGAGGCGCATGAAGCTAATGGG
```

**図4 SAMP6及びSAMP2系マウスの*Csfg*遺伝子のプロモーター
領域から第1エクソンまでの塩基配列**

プロモーター領域、及び第1エクソンの塩基配列をそれぞれ小文字、及び大文字で示した。開始メチオニンコドン¹を太字で示した。

SAMP6及びSAMP2系マウス系統間で違いは検出されなかった。



エクソン 1

```
GGACTTGTCGCTGCCTTAGCCCCAGCCCAGGCTCAAGGCGTTCTAACCATGGCCCGCGCGCTCTT
TTCAGTCTGGTCTTTCTTGCCATCCTCCTGCCTGCGCTAGCCGCCTGCCCCCAAACCTGCCACTGC
ATGGAGATCTGCAGCATGTCATCTGCGACAAGGTGGGGCTGCAGAAGATCCCCAAGGTATCAGAG/
AACCAAACCTGCTCAATCTCCAGCGCAACAACCTCCCGGTGCTGGCTGCCAACTCGTTTCGGACCA/
CCGAACCTGGTCTCCCTGCACCTGCAACACTGCAACATCCGCGAGGTGGCGGCTGGTGCCTTCCG/
GCCTGAAGCAGCTTATCTACCTGTACCTGTCCACAACGACATCCGGGTATTGCGAGCTGGAGCC/
CGACGACCTGACTGAACTCACTTACCTCTATCTAGACCACAACAAAGTGTCCGAACTGCCCCGGG/
TTGCTCTCTCCTCTGGTCAACCTCTTCATCTTGCAACTCAACAACAACAAAATCCGAGAGCTGCG/
CTGGAGCTTTCAGGGGGCCAAGGACCTGCGCTGGCTCTACCTGTCAGAAAATGCCCTCAGTTCC/
GCAGCCTGGTTCCTGGATGATGTGGAGAACCTAGCCAAGTTCACCTGGACAAGAACCAGCTGTC/
AGCTACCCCTCAGCCGCCCTGAGCAAACCTTCGGGTGGTGGAGGAGCTGAAGCTGTCTCACAAACC/
TGAAGAGCATCCAGACAATGCCTTCCAGTCCTTCGGTAGATATCTGGAGACCTCTGGCTGGAT/
CACCAACCTGGAGAAG
```

エクソン 2

```
TTCTCAGATGCTGCCTTCTCGGGTGTGACCACACTGAAACACGTCCATCTGGACAACAACCGCCTC
ACCAAACCTGCCTTCCCTCCTTCCCCTTTGACAACCTGGAGACCTCACTCTCACCAACAACCCATGG/
ATGCACCTGCCAGCTCCGTGGCCTTCGGCG
```

エクソン 3

```
GTGGTTGGAAGCCAAGGCTTCTCGACCGGATGCTACCTGCTCCTCGCCAGCCAAGTTCAAGGGTCT/
CGGATTCGTGACACAGATGCCCTTTCGACGCTGCAAATCCCCGACCAAGAGGTCCAAGAAAGCTGG/
GCCATTAAACAG
```

図5 SAMP6及びSAMP2系マウスのChad遺伝子解析結果

（上段）マウスChad遺伝子のエクソン/イントロン構造。エクソンをBoxで示した。
non-coding領域は斜線で示した。第4エクソンはnon-codingエクソンである。

（下段）SAMP6及びSAMP2系マウスのChad遺伝子の第1～3エクソン部の塩基配列を
示す。開始メチオニン及び終止コドン~~を太字で示した~~。両系統間で塩基配列の違いは
検出されなかった。

CTCTCTCTTCCTCCACCACC**ATG**CAGGTCCCTGTCATGCTTCTGGGCCTGCTGTT
ACAGTTGCCGGCTGGAGCATCCACGTGTTGGCTCAGCCAGATGCAGTTAACGCC
ACTCACCTGCTGCTACTCATTACCAGCAAGATGATCCCAATGAGTAGGCTGGAG
GCTACAAGAGGATCACCAGCAGCAGGTGTCCCAAAGAAGCTGTAGTTTTTGTAC
AAGCTCAAGAGAGAGGTCTGTGCTGACCCCAAGAAGGAATGGGTCCAGACATACA
TAAAAACCTGGATCGGAACCAAATGAGATCAGAACCTACAACCTTTATTTAAACT
CATCTGCCCTAAGGTCTTCAGCACCTTTGAATGTGAAGTTGACCCGTAAATCTGA
GCTAATGCATCCACTACCTTTTCCACAACCACCTCAAGCACTTCTGTAGGAGTGA
CAGTGTGACAGTGA**ACTAG**TGTGACTCGGACTGGA

図6 SAMP6及びSAMP2系マウスの*Scya2*遺伝子のcDNA塩基配列

開始メチオニン及び終止コドン^{*}を太字で示した。SAMP6及びSAMP2系マウス系統間で塩基配列の違いは検出されなかった。

Chr.11

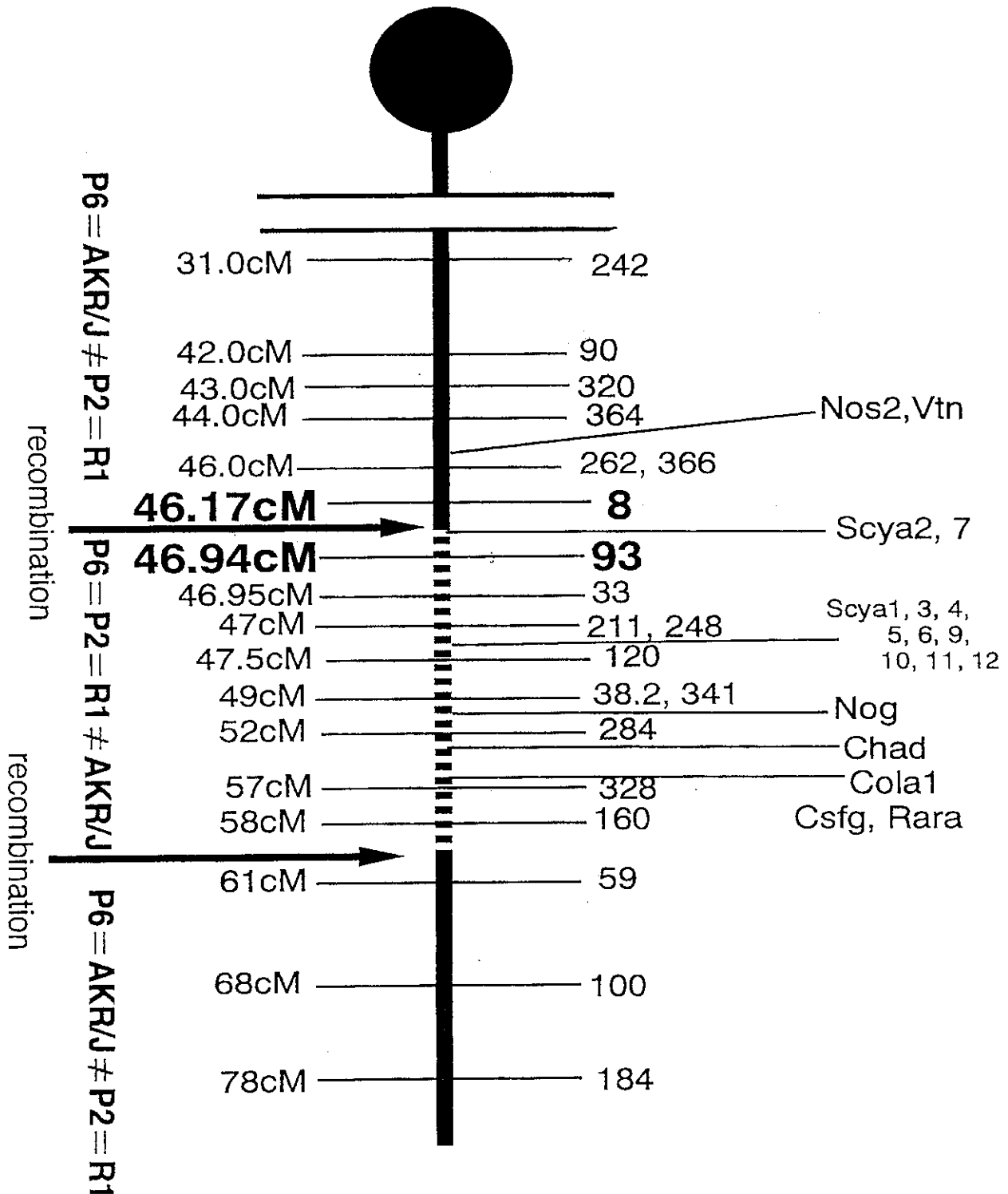


図7 第11染色体の骨量調節候補領域の染色体地図を示す。図の右側にはこの領域に位置する遺伝子を示している。太字で示した遺伝子は塩基配列の決定が進行しているがSAMP6とSAMP2で配列に変異が発見されていない遺伝子を示す。

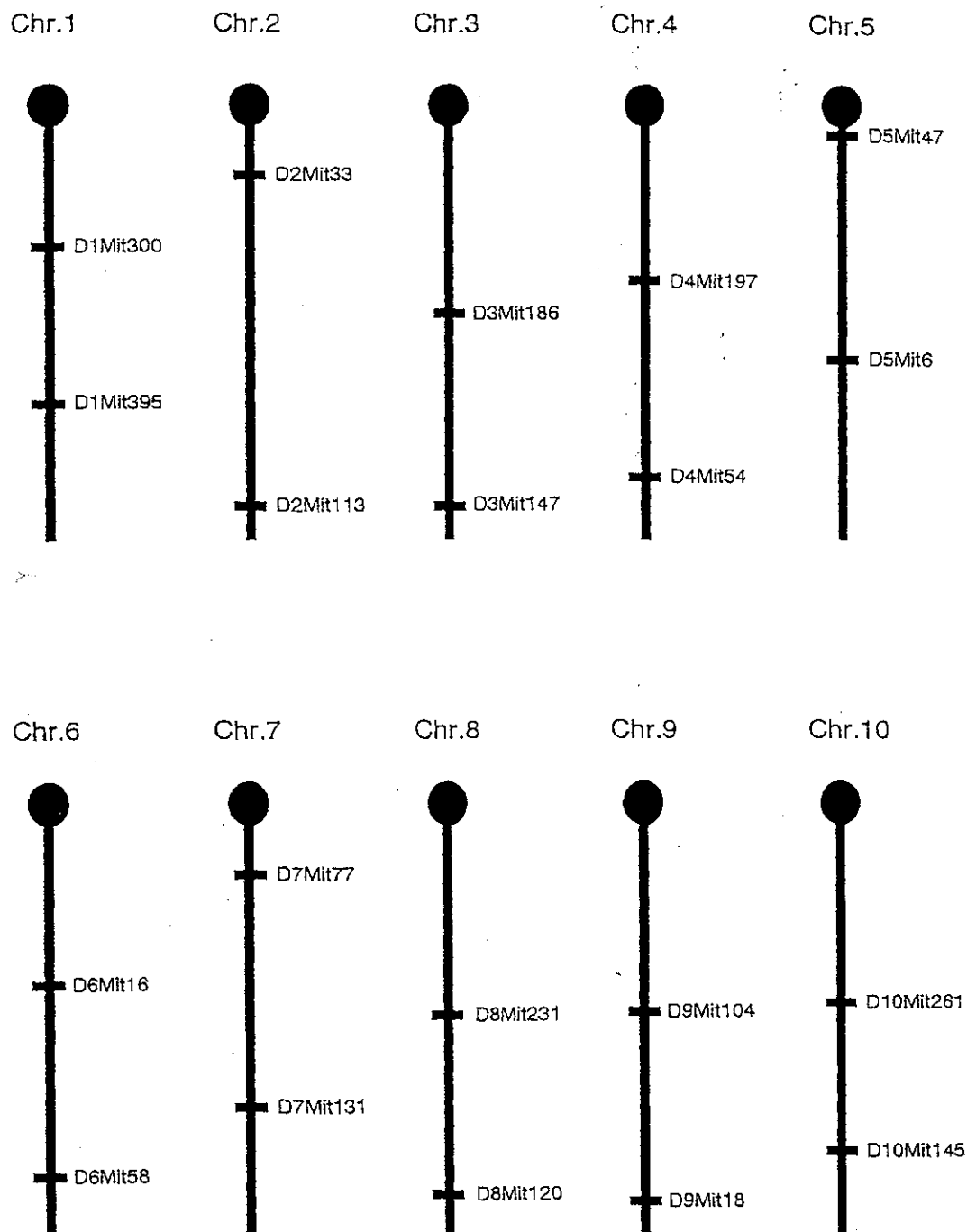
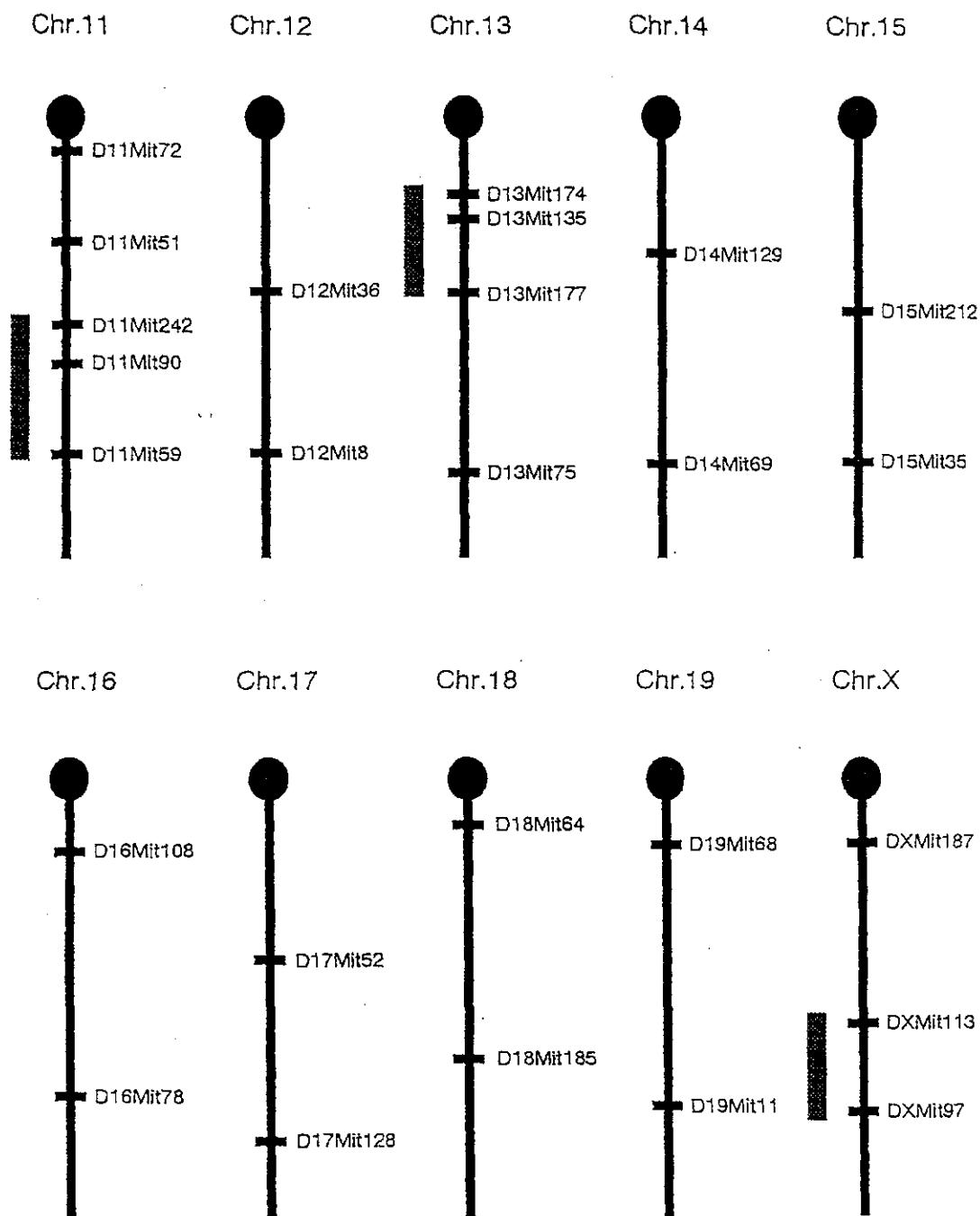


図8 スピードcongenic マウス作成のために使用した第1染色体から第10染色体上に存在するマイクロサテライトマーカー。戻し交配第5,6,7世代の全ての交雑仔のゲノムスキャンニングを行い、候補遺伝子以外の領域は recipient系統由来になるように選抜し、さらにも戻し交配を繰り返した。



Congenic mice have carried  intervals.

図9 スピードcongenic マウス作成のために使用した第11染色体からX染色体上に存在するマイクロサテライトマーカー。戻し交配第5, 6, 7世代の全ての交雑子のゲノムスキャンニングを行い、候補遺伝子以外の領域は recipient系統由来になるように選抜し、さらにも戻し交配を繰り返した。黒棒はcongenic mouseへ導入された染色体領域を示す。

骨訴訟症モデルマウスを用いた骨量遺伝子の解析

分担研究者 細川昌則 京都大学再生医科学研究所・再生誘導研究分野・助教授

研究要旨

骨粗鬆症のモデルマウスである SAMP6 の low peak bone mass に連鎖する QTL が第 11、13、X 各染色体に存在することが示された。候補遺伝子の変異解析は主任研究者である樋口が行い、細川は原因遺伝子が既知のものでない可能性を考え、その場合の遺伝子単離に必要な positional cloning の前段階として、polygene 系の遺伝形式である SAM のシステムを single gene 系の遺伝形式に変換するために、各々の染色体について変異のある QTL を一つずつ持つ congenic mouse 各系統の作製を開始した。Speed congenic mouse の手法で QTL 領域の 3 つのマーカー(約 20cM の interval) による選択を行いながら、SAMP2 と SAMP6 を連続 7 回 backcross 交配して、第 11、13、X 各染色体で一つの QTL を含む SAMP2 の background をもつ系統、SAMP6 の background をもつ系統の 2 系統、合計 6 系統の作製をほとんど完成した。今後匹数が増えたところで、各系統骨量測定を行うことで先の連鎖解析の結果及び、原因遺伝子が interval 内に存在することを証明し positional cloning を目指す。更に各系統について、骨形態計測を含む in vivo study、及び骨芽細胞、脂肪細胞、破骨細胞各系の培養を含む in vitro study を行い表現型を決定し、各々の QTL の機能を調べる予定である。

1. 研究目的

老人性骨粗鬆症の予防、治療は健康で活動的な高齢生活を送るために緊急に解決すべき課題である。老人性骨粗鬆症は本来遺伝的要因の大きな老化病態であるが、複雑な遺伝形式のため、原因遺伝子を明らかにすることは不可能であり、詳細な遺伝解析の可能なモデルマウスを用いた解析が必要不可欠であった。老人性骨粗鬆症のモデルマウスである SAMP6 系統マウスの低骨量の最大原因は成長期における低い peak bone mass にあることがこれまでの我々の研究によって明らかにされている。交配実験による連鎖地図作成により SAMP6 の低骨量状態を決定している遺伝子座を同定しようとしてきたこれまでの研究をさらに推し進め、原因遺伝子そのものを同定を目指すことが本研究の目的である。

2. 研究方法

動物：老化促進モデルマウス(SAM)は京都大学で開発された促進老化を主要形質とする純系マウス系統群である。その 1 系統である SAMP6 は有意に低い骨量を示し、その後加齢にともない骨量が漸減していく老年性骨粗鬆症のモデルマウスである。交配相手あるいは対照として用いた SAMP2 は SAM 系統群のなかでは最も高い骨量を示す。SAMP6 と SAMP2 マウスは京都大学再生医科学研究所で兄妹交配によって維持され、conventional condition で飼育された。QTL 解析には 488 匹の F2 交雑子を用いた。染色体 DNA は生後一ヶ月で切断した尾から、RNA は大腿骨の骨髓より分離した。骨量の測定は生後 4 ヶ月で屠殺したマウスの大腿骨の軟 X 線写真から骨皮質幅比(CTI)を求めた。

2. 候補領域の congenic mouse 系統の作成：
同定された3つの候補染色体領域（11, 13, X染色体）の機能を解析し、さらには将来、positional cloning 法によって骨量規定遺伝子を同定するために、SAMP2 の遺伝的背景にそれぞれの当該染色体領域のみ SAMP6 の対立遺伝子を持つ congenic strain 3 系統およびその逆に SAMP6 の遺伝的背景に当該染色体領域のみ SAMP6 の対立遺伝子を持つ congenic strain 3 系統を作成した。back-cross 第5世代より各染色体あたり2つ以上のマーカー（全46マーカー）を用いて、交雑仔マウスの全ゲノムスキャンニングを行い、congenic mouse の完成のスピードアップを計った。交配は京都大学再生研で行い、マッピングは信州大学と共同で行った。

4. ゲノムマッピング：Research Genetics 社（Huntsville Ala, USA）より購入したマイクロサテライトマーカー用のプライマーを用いて行った。多形の解析は4%アガロース電気泳動で行った。QTL 解析は MAPMAKER を用いてコロラド大学の Dr. Thomas E Johnson との共同研究で行った。

C. 研究結果

候補領域の congenic mouse 系統の作成：x 第11染色体は D11Mit242 から D11Mit59 までの約30 cM、第13染色体は D13Mit174 から D13Mit177 までの約12 cM、X染色体は DXMit113 から DXMit97 までの約12 cM を導入した congenic mouse（合計6系統）の作成を進めている。SAMP6 と SAMP2 を親系統として交雑仔のなかで上記の染色体領域を持つ個体を選抜し、さらに相手の親系統（recipient）へ戻し交配する方法を4世代繰り返した。5世代からは各染色体から SAMP6 と SAMP6 の親系統で異なる多形を示すマイクロサテライトマーカー2個以上を選び（合計46マーカー）、全交雑仔のゲノムタイピングを行った。その結果に基づきマウスを選抜しながら戻し交配を行い、候補領域以外の染

染色体領域がより早く recipient 系統由来になるように工夫された“スピードコンジェニック”作成の手法を実施した。現在では戻し交配の第7世代まで交配が進み、従来の方法では12世代の戻し交配が必要である“候補領域以外の全ての染色体領域が recipient 系統に置換したコンジェニックマウス”作成のための6系統全部のヘテロマウスの作成に成功した。さらにこれらのマウスの交配によって導入領域をホモに持つマウスの作成にも11, 13染色体では成功している。

現在 congenic mouse の作成は主として京都大学再生医科学研究所再生誘導研究分野で行われていおり、各系統の匹数の増加と骨量の測定が行われている。

D. 考察

SAM(Senescence-Accelerated Mouse)の一系統である SAMP6 は生後4ヶ月で達する最大骨量(peak bone mass)が有意に低い老年性骨粗鬆症のモデル動物とされている。現在まで SAMP6 が低骨量をきたす原因の一側面として、骨内膜側の骨量低下、骨髄間質細胞から骨芽細胞への分化抑制と脂肪細胞への分化亢進、骨髄造血環境の老化促進が認められ、分子生物学的レベルでは骨髄間質細胞の Interleukin 11 の発現量低下などが報告されているが本質的な原因は不明である。ヒトにおいては骨量は polygene 系の遺伝形式をとり、peak bone mass がその遺伝的因子として注目されている。現在まで Vitamine D receptor 等、種々の候補遺伝子の遺伝的多形を用いた association study が行われているが統一的な見解は得られていない。骨粗鬆症等の退行性疾患では家系分析を用いた全染色体レベルでの量的形質遺伝子座(QTL)解析は表現型値に影響を及ぼす因子が多すぎるため困難であり、連鎖地図、物理的地図、遺伝子単離という positional cloning の手法は未だ行われていない。こういった点から自然発症モデル動物を用いた研究は有効であると考えられる。候補

遺伝子の変異解析が主任研究者である樋口によって行われたが原因遺伝子の解明には至らなかった。その結果として未報告（未知）の遺伝子が原因である可能性が大きくなったため、これらの領域に関する congenic マウスを作成した。スピード congenic マウス作成法に基づき、戻し交配7世代で完全な congenic マウス作成に成功した。今後はこの貴重な congenic マウスを利用して 1) 導入染色体領域の骨形成に及ぼす効果を解析し、原因遺伝子の機能を明らかにする、2) 新たな交配解析を行い単一遺伝子による支配となった骨量遺伝子の positional cloning に道が開けたと考えている

E. 結論

老人性骨粗鬆症のモデルマウスである SAMP 系統マウスを用いた遺伝的解析により骨量を規定する3つの染色体領域が同定された。この領域に存在する候補遺伝子に変異は発見されなかった。これらの領域の congenic マウスが作成され、今後の原因遺伝子の解明のための有力なモデルマウスになると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

清水基行、樋口京一、坪山直生、松下睦、木本光俊、藤澤裕美、夏晨、千葉卓哉、中村孝志、細川昌則：老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の低骨量の QTL 解析。基礎老化研究、vol. 22: 25 1998

清水基行、坪山直生、松下睦、笠井宗一郎、細川昌則、樋口京一、中村孝志：老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 における低骨量の QTL 解析。日本整形外科学会雑誌、Vol. 72: 1580 1998.

M. Shimizu, K. Higuchi, B. Bennett, C. Xia, T. Tsuboyama, S. Kasai, T. Chiba, H. Fujisawa, K. Kogishi, H. Kitado, M. Kimoto,

N. Takeda, M. Matsushita, H. Okumura, T. Serikawa, T. Nakamura, T.E. Johnson, M. Hosokawa: Identification of peak bone mass QTL in a spontaneously osteoporotic mouse strain. *Mamm Genome*. 10: 81-87, 1999.

N. Takeda, T. Tsuboyama, R. Kasai, K. Takahashi, M. Shimizu, T. Nakamura, K. Higuchi, M. Hosokawa: Expression of the c-fos gene induced by parathyroid hormone in the bones of SAMP6 mice, a murine model for senile osteoporosis. *Mech Ageing Dev*. 1999. in press.

C. Xia, K. Higuchi, M. Shimizu, T. Matsushita, K. Kogishi, J. Wang, T. Chiba, MFW. Festing, M. Hosokawa: Genetic typing of the Senescence-Accelerated Mouse (SAM) strains with microsatellite markers. *Mamm. Genome* 1999 (in press)

総説

樋口京一、細川昌則：老化促進モデルマウス(SAM)を用いた老化科学への分子学的アプローチ。Moelcular Medicine Vol. 35: 606-615, 1998

細川昌則、坪山直生、樋口京一：老年性骨粗鬆症（老化促進モデルマウス：SAM6）。Moelcular Medicine Vol. 35: 541-544, 1998

細川昌則、樋口京一：老化モデルとしての Senescence Accelerated Mouse(SAM)。現代医療 Vol. 30: 483-488, 1998

2. 学会発表

清水基行、樋口京一、坪山直生、松下睦、木本光俊、藤澤裕美、千葉卓哉、夏晨、中村孝志、細川昌則：老化促進モデルマウス(SAM)に関する実験的研究 110. 老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の

低骨量の QTL 解析。第 87 回日本病理学会（1998. 4. 15）広島

清水基行、樋口京一、坪山直生、松下睦、木本光俊、藤澤裕美、夏晨、千葉卓哉、中村孝志、細川昌則：老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の低骨量の QTL 解析。第 21 回日本基礎老化学会（1998. 6. 17）東京

清水基行、樋口京一、坪山直生、松下睦、木本光俊、笠井宗一郎、藤澤裕美、夏晨、千葉卓哉、中村孝志、細川昌則：老年性骨粗鬆症モデルマウス SAMP6 の低骨量の QTL 解析。第 14 回 SAM 研究協議会（1998. 7. 3）京都

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし