

## 実験動物の進歩 1

## 日本産野生由来マウスに発見した新しい疾患モデル動物

The new disease model mouse, originated from Japanese wild mouse

まつ しま よし ぶみ  
松 島 芳 文  
Yoshibumi MATSUSHIMA

## はじめに

近年、個々人に対応したオーダーメイド医療もしくはテーラーメイド医療という言葉がマスコミでも聞かれるようになってきた。疾患モデル動物学においてもこれらに対応すべく、多型性に富んだ新しい遺伝資源を見出さなくてはならない時期に来ている。今日、世界各国で *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) による大規模ミュータジェネシスプロジェクトが競って行われているのもその現れのひとつである。これは化学変異原物質である ENU が点突然変異を高率に誘発することを利用し、その変異個体のなかにヒト疾患モデル動物を見出し、病気の遺伝機能解明を目指す試みである。

ところが名古屋大学農学部家畜育種学講座教授であった故 近藤恭司先生は60年以上も前の少なくとも1943年頃には、このことに気付いていた。驚くべきことに1943年といえば世界大戦のさなかである。先生は日本在来の愛玩用マウスに新しい遺伝子資源を求め、埼玉県春日部地方の農家で、江戸時代から露天商の扱うハツカネズミを飼育していることを知り、当地を訪れて「カスカベマウス」を入手している。このマウスは、のちに2型糖尿病モデルとして世界的に有名になった KK マウスの起源である。また、上野の露天商から入手した愛玩用マウス「ニシキネズミ」から近交系化された NC マウスは、最近ではアトピー性皮膚炎モデルとして頻用されている。

そして、20年後の1963年には同大学農学部のあった愛知県安城市郊外で野生ハツカネズミ *Mus musculus molossinus* の捕獲を開始し、野生ハツカネズミ由来の近交系マウス MOA (モロシヌス安城の

意) および MOM (モロシヌス瑞穂区の意) などを樹立している。

さらに20年後の1983年、近藤先生の退官記念事業として出版された「実験動物の遺伝的コントロール」<sup>1)</sup> のなかで、先生は「実験動物としてのマウスの系統育成を企画する立場としては、今後医学研究の場で人種差を考慮に入れて論じなければならない事態が増えるであろうから、育種素材を広く野生の *Mus musculus* に求め、亜種を考えに入れた系統育成をしておくことは重要なことと思われる。」と述べている。

当時でも主に米国を中心に育成された C57BL/6, C3H/He および BALB/c マウスなど、いわゆるラボラトリーマウスは300系統以上が存在していたと思われる。しかし先生は、これらの一見多様性に富んでいるように思える膨大なラボラトリーマウスでも、その祖先は主にヨーロッパの野生ハツカネズミ (*Mus musculus musculus* あるいは *Mus musculus domesticus*) を起源としていて、遺伝的にはさほど複雑ではないことを見抜いていたのである。

一方筆者は、あるきっかけから日本産野生ハツカネズミを捕獲し、野生由来マウスの近交系化を開始した。その過程で幾つもの偶然と幸運に導かれるように、次々と新しい変異個体を発見し、幾つかの疾患モデルを樹立することができた。

本連載では、はじめに「日本産野生由来マウス」について、次に「アポE欠損高脂血症マウス」、「ワールデンブルグ症候群4型マウス」、「アトピー性皮膚炎マウス」および「非肥満2型糖尿病マウス」など、いずれも日本産野生由来マウスに見出された新しい疾患モデルマウスについて、発見のエピソードを交えながら紹介する。

## I. 日本産野生由来マウス

### 1. 唾液と涙液のタンパク多型

今から30年も前のことであるが、筆者は当時、福島県郡山市の東北歯科大学（現 奥羽大学）に勤務していた。歯科大学では俗に「研究テーマは首から上で探せ」といわれていたので、歯科大学に相応しい研究テーマとしてマウスの唾液を材料に選んで研究をスタートさせた。程なくしてマウスの唾液をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析すると、そのタンパク像に系統差と性差のあることを見出した。つまり、唾液でマウスを分類し、性を判別することができたのである。また、唾液を採取中にたまたまマウスの目が涙で潤んでいるのに気付き、涙を濾紙片に採って泳動したところ、唾液以上に多彩なタンパク多型と性差のあることがわかった。

性差について詳しく検討した結果、唾液および涙液のタンパク像は、いずれも幼若時には性差がなく、性成熟によって雄のタンパク像のみが変化して雄型になり、性成熟しても変化しない雌との間に性差を生じた。これらの性差は雄の去勢実験、雌へのテストステロン投与実験によって雄性ホルモン依存性であることがわかった。

唾液と涙液のタンパク多型は、マウスを生かしたままサンプルの採取が可能で、比較的簡単な電気泳動法によって多くの遺伝情報が得られた。新たに入手したマウスの唾液と涙液を電気泳動すると、面白いように次々と新しい変異型と新しい遺伝子座までもが見つかった。生来の収集癖も手伝って、全国の大学や研究機関で維持しているマウスのうち未調査の系統を分与してもらっては実験し、また国内の実験動物業者と米国のジャクソン研究所からも可能な限りのマウスを購入した。DNA多型の登場する以前の当時としては、これらのタンパク多型は貴重な遺伝標識であり、やがてオランダ国立癌研究所のJ. Hilgersから、癌研究所で維持しているすべての近交系とリコンビナント近交系など100系統以上のマウスについて、唾液と涙液のタンパク多型を調べて欲しいとの依頼があり、日本ではあまりなじみのないRII, GRS, O20, STSなど、ヨーロッパ由来の近交系マウスを検索する機会を得た。このようにして

最終的には亜系も含めると約270系統のラボラトリーマウスについて、唾液と涙液のタンパク多型を検索した<sup>2-5)</sup>。

### 2. 野生ハツカネズミの採取

1983年、近藤先生の退官記念パーティーに出席して前述の本<sup>1)</sup>をいただき、その本の中で近藤先生が野生ハツカネズミを採取し、MOA、MOMなどの野生由来近交系を樹立していることを知った。また静岡県三島市にある国立遺伝学研究所の森脇和郎先生は野生由来近交系MSM（三島の意）を作出していることもわかった。

当然のことながら、いわゆるラボラトリーマウスとは亜種レベルで異なるMOA、MOM、MSMなど日本産野生由来マウスについても唾液型と涙液型を調べてみたくなった。また、これらはいずれも中部地方由来であり、東北地方の野生マウスとは地理的にだいぶ距離があるので、おそらく唾液型も涙液型も異なっているだろうと考え、東北のマウスは自分で捕まえ、東北地方の野生由来近交系マウスは自分で作ることを決意した。東北由来の近交系マウスも将来きっと有用な遺伝資源になるに違いないと考えたからである。

早速、人づてに郡山市近郊の農家を回ってネズミ捕りのトラップを仕掛けさせてもらった。また知人を頼って会津若松市、須賀川市、岩手県前沢町および秋田県田沢湖町などでも採取した。はじめにハツカネズミ、つまりマウスの目撃情報を得るために、マウス、ドブネズミ、クマネズミを見分けるためのイラストと簡単な説明文を記したパンフレットを作った。それは、ハツカネズミがマウスであることの理解を得るのが大変で、ハツカネズミはドブネズミの仔ネズミだといわれたこともあったからである。しかし、農家にとってネズミは最も関心の高い動物のようであり、捕獲には多くの方々から協力を得られた。また、罠を仕掛けるときに、ネズミは頭がいいから黙ってやらないとネズミが聞いていて捕まらないともいわれた。餌は、鳥の唐揚げ、油揚げ、竹輪、魚肉ソーセージなど多様で、罠を仕掛けさせてもらう家々で異なった。ネズミ獲りには皆、一言言っていて、お願いする手前それぞれ家人の「指導」に従った。



そ10年目の1992年に、筆者は近交途上の12系の野生由来マウスと共に現職の埼玉県立がんセンターに転職した。そこで、それまでコンベンショナル環境で飼育していた野生由来マウスを埼玉がんセンターのSPF施設に移動するため、(株)日本クレアにSPF化を依頼した。当時、日本クレアでは野生マウスのクリーニング化は初めての経験であったが、12系のうち8系がSPF化に成功し、ほぼ1年後にがんセンターに導入された。その後F15代までいって途絶えた系もあり、近交系化に成功したのは郡山由来のKOR1(写真2)、KOR5、KOR7、会津若松由来のAIZ2および岩手県前沢由来のMAEのわずか5系統であった。

日本産野生マウスから新しい遺伝子資源を導入する目的で近交系化を始めて、およそ8年目の1996年、近交途上のKor1系の中に腹部の毛並みの異常と胸部の乳頭周囲に脱毛を認める1匹の雌マウスを見つけた(写真3)。この異常個体の出現に、まず脳裏をよぎったのはウイルス感染やダニなどの寄生であった。前職の東北歯科大当時にHVJ(センダイウイルス)の感染で飼育していたマウスを大半を失ったことなど、不吉なことも思い出した。しかし、これらの野生由来マウスは、埼玉がんセンターに移動する際にSPF化したばかりであり、また同一ケージ内のマウスはもちろんのこと他に同様の異常個体は見当たらなかったもので、感染やダニによる可能性は低かった。感染の有無を確認するために微生物モニタリングを行った結果も、外部寄生虫を含む細菌、ウイルスなど、SPFのすべての項目が陰性であった。



写真2 日本産野生由来マウス近交系マウス KOR1 (福島県郡山市由来)

そこで、この毛並みの異常マウスは何らかの疾患モデルの候補ではないかと直感し、同時にそうであればいいと願った。さっそく、これまでに報告されている種々の疾患モデル動物について、実験動物学の成書や疾患モデル動物のリストなどをくまなく検索したが、「幸い」腹部の毛並みの異常などに似た症状を記載したものはなかった。それはそれで良かったのであるが、ヒトに同様な疾患がなければモデルにはならないので、さらに皮膚科の成書を調べた。当然のことながら「腹部毛並の異常と胸部の脱毛」から類推されるヒトの疾患は見あたらなかった。そこで、いずれにしても遺伝病でなければモデルになる可能性は少ないと考え、皮膚科学全書のなかに、遺伝性皮膚疾患「脂質代謝異常と皮膚疾患」の項目を見つけた。高脂血症による種々の皮膚黄色腫の症例写真から、皮膚黄色腫には眼瞼黄色腫、手掌線状黄色腫、およびアキレス腱黄色腫などのあることを知った。

マウスとの共通点を探すと、変異マウスでも眼瞼周囲の脱毛と前肢手掌の肉丘のわずかな肥大が認められ、辛うじてこれらがヒトの皮膚黄色腫と共通していた。しかし、変異マウスのアキレス腱部位は外見上正常であり、アキレス腱黄色腫に似た症状は認められなかった。半信半疑ながら、変異マウスの皮膚症状は高脂血症によるものではないかと考えた。

さっそく変異マウスが高脂血症であるか否かを確かめるために、ヘマトクリット管で少量の採血をして遠心分離をした。その結果、血清部分はひどく白濁していて、照明の角度を変えてみると血清は青白く見えた。正常個体の血清と比較するまでもなく、



写真3 日本産野生由来マウスに発見された自然発症高脂血症マウス SHL

高脂血症による眼瞼周囲の皮膚黄色腫と脱毛が認められ、全身の毛並みも悪い(写真は近交系化後のSHLマウス)。

変異マウスが高脂血症であることを確信した。変異マウスの血清総コレステロール (TC) 値を測定すると 1,332mg/dl であり、それまで筆者は正常マウスの TC 値すら知らなかったが、正常マウスの 10 倍以上の高値であることがわかった。

次に、疾患モデルとしての有用性を左右する動脈硬化の有無を調べるために病理学的検索を行った。その結果、大動脈起始部に多数のコレステリン結晶隙と泡沫細胞を認める粥状動脈硬化巣が確認された (写真 4)。また、病変部皮膚の肥厚部位にもコレステリン結晶隙と泡沫細胞が確認された。従って発見のきっかけとなった「毛並みの異常と脱毛」は高脂血症による皮膚黄色腫であり、この変異マウスは脂質代謝に関与した何らかの遺伝子変異によって高脂血症になることが推定され、自然発症高脂血症マウス (spontaneously hyperlipidemic mouse : SHL マウス) と名付けた<sup>6)</sup>。

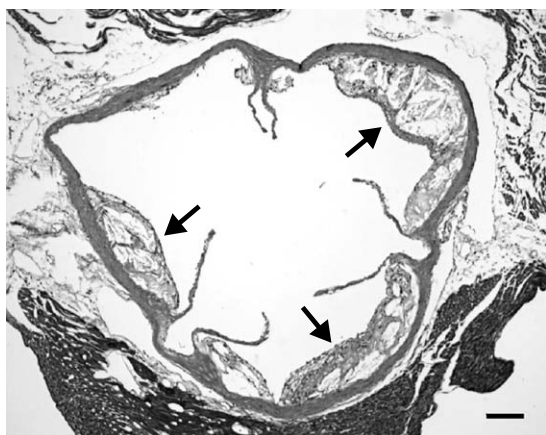


写真 4 SHL マウスの大動脈起始部の動脈硬化巣  
バーは 100 $\mu$ m

SHL マウスはアポ EKO マウスに比較して、高脂血症がより重度であるのに動脈硬化は軽度であった。

## 2. 既存の高脂血症モデルとの比較

SHL マウスが新規の疾患モデルになるか否かを知るために既存の高脂血症マウスについて検索した。マウスは基本的には動脈硬化抵抗性動物であり、高コレステロール食を与えても動脈硬化はできにくく、HDL コレステロール動物ともいわれ、LDL コレステロールはほとんど検出されない。またこれまでに自然突然変異による高脂血症モデルマウスは存在しないことを知った。しかし、1990 年代の初頭から、脂質代謝に関連したアポ E および LDL 受容

体などのノックアウト (KO) マウスが作出されていることがわかった。とくにアポ EKO マウスは普通食でも高脂血症になることが報告されていたので、SHL マウスとの異同を調べるために米国のジャクソン研究所からアポ EKO マウスを入手した。

送られてきたアポ EKO マウス (C57BL/6-*Apoe*<sup>-/-</sup>) の被毛は SHL マウスに認められた毛並みの異常と脱毛などの皮膚黄色腫も認められず、外見上の共通点はなかった (後にアポ EKO マウスでも加齢に従って皮膚黄色腫が認められることがわかった)。アポ EKO マウスの TC 値は約 600mg/dl であり高脂血症を示したが、SHL マウスの方がさらに高値であることがわかった。さっそく高脂血症の原因遺伝子を検討するためにアポ EKO マウスと SHL マウスとを交配して相補性試験を行った。その結果、F1 個体が高脂血症を示したので、SHL マウスの高脂血症の原因はアポ E 遺伝子の変異による可能性が強く示唆された。

## 3. SHL マウスのアポ E 遺伝子

SHL マウスの高脂血症の原因遺伝子がアポ E 遺伝子の変異であることが推定されたので、ノザン解析を行いアポ E の RNA が全く作られていないことを確認した。次に、サザン解析を行った結果、SHL マウスのアポ E 遺伝子に大きな欠失が存在し、そのためにアポ E タンパクが作られないことが推定された。さらにこれを確認するために、ウェスタン解析を行った。

アポ E は血漿リポタンパクの主要な構成要素であり、脂質およびリポタンパク代謝に重要な役割を持つ。また一方で、アルツハイマー病との関係が明らかであり、主要なアイソフォーム  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  および  $\epsilon 4$  のうち、 $\epsilon 4$  はアルツハイマー病の危険因子であり、アポ E アイソフォームを簡便に検出できるキット「フェノタイピングアポ E IEF システム」が (株) 常光から市販されていた。このキットは高額だったので、常光の技術部にマウスのアポ E タンパク検出に使用可能かどうかを問い合わせたところ、ヒトアポ E 抗体とマウスのアポ E とは交叉しないと云われた。しかし試さなければわからないと考え、思いきってその検出キットを購入した。結果的にはマウスアポ E も検出可能であり、正常マウスのアポ E タンパク検出部位に SHL マウスのアポ E タンパク

は全く認められないことを確認した(写真5)。

また、ヒト高脂血症の病型はリポタンパク像によって6型に分類されるが、SHLマウスのリポタンパク像は、やはり(株)常光から市販されているディスクゲル電気泳動キット「リポフォー」を用いて検討した。その結果、SHLマウスのリポタンパク像は家族性Ⅲ型高リポタンパク血症とよく似たパターンを示した。ヒト家族性Ⅲ型高リポタンパク血症はアポEタンパクの構造異常が原因とされている高脂血症であり、マウスにおいてもアポEの関与が確認出来た。SHLマウスの発見によって、アポEタンパクの欠損と高脂血症の病型を決めるリポタンパク像の検出をこれらの市販キットで確認できたことも幸運であったといえる。

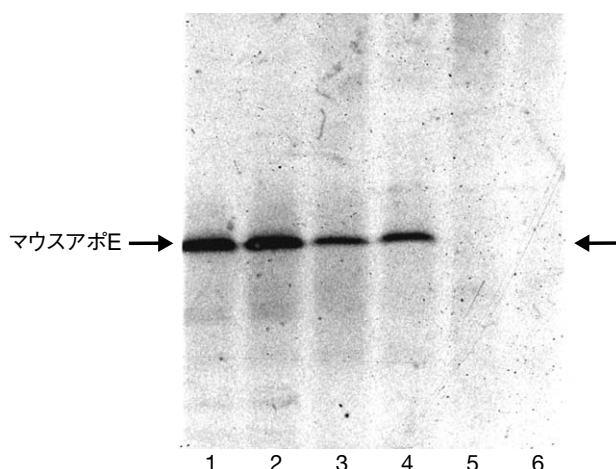


写真5 マウスアポEのウエスタンブロット

C58BL/6マウス(1, 2)、C58BL/6 x SHL F1マウス(3, 4)、SHLマウス(5, 6) SHLマウスはアポEタンパクを完全に欠損していた。C58BL/6とSHLのF1マウスのアポEタンパクはC58BL/6マウスの約1/2量に見えた。

#### 4. SHLマウスの近交系化とコンジェニックSHLマウス

SHLマウスが世界で初めての自然発症高脂血症・動脈硬化症マウスであり、その原因がアポEタンパクの欠損であることが明らかになったので、疾患モデルとして樹立するために近交系化を行った。実際には変異マウスの発見時から、変異遺伝子の存在を信じて交配実験を開始していた。幸いに変異マウスを産んだ両親が生存していて、再び同様の症状を示す個体が得られた。その後種々の交配を行って変異個体(遺伝子)の保存に成功し、交配記録からこの高脂血症の遺伝は常染色体劣性遺伝に従

うことがわかった。

SHLマウスのアポE遺伝子変異は日本産野生由来マウスに生じたものであり、日本産野生マウスと遺伝的背景が大きく異なるラボラトリーマウスとでは病態がどのように変化するかという興味があったのでコンジェニックマウスの作出を開始した。コンジェニックマウスとは、変異遺伝子(*Apoe<sup>shl</sup>*)を、導入しようとするドナー系統に12回以上の戻し交配を行って、アポE遺伝子以外の遺伝的背景をほぼ入れ替えたマウスのことである。ドナー系統にはラボラトリーマウスのうち動脈硬化感受性系のC57BL/6と動脈硬化感抵抗性系のBALB/cおよびC3H/Heマウスの3系統を選び、遺伝的背景の異なるコンジェニック疾患モデルセットを約8年かけて樹立した<sup>7)</sup>。

コンジェニックSHLマウスの正式な記載は、オリジナルのSHLマウスをKOR-*Apoe<sup>shl</sup>*とし、完成したコンジェニックマウスはC57BL/6. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>*、BALB/c. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* および C3H. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* とした。略称はそれぞれ B6. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>*、C. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* および C3. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* とした。

#### 5. 3系統コンジェニックSHLマウスの表現型

オリジナルのSHLマウスであるKOR-*Apoe<sup>shl</sup>*の表現型(症状)の特徴は、高TC値、大動脈起始部に限局した粥状動脈硬化症および重症の皮膚黄色腫であり、また極めて短命(1年未満)なことであるが、3系統の遺伝的背景の異なるコンジェニックマウス、B6. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>*、C. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* および C3. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* が完成したので、SHLマウスの表現型と比較した。

TC値を比較すると、6週齢時でのTC平均値は、KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* は1,300mg/dl、C3. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* は1,100mg/dl、C. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* は900mg/dl、B6. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* は700mg/dlでB6. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>* が最も低い値を示した。また、弁起始部の動脈硬化巣は、9カ月齢マウスで比較した。意外なことに最もTC値の高いKOR-*Apoe<sup>shl</sup>*の動脈硬化巣が最も軽度であり、逆に最もTC値の低いB6. KOR-*Apoe<sup>shl</sup>*の動脈硬化巣が最も重度であり、このことから日本産野生マウスには重度の高脂血症にもかかわらず動脈硬化の進展を抑制する遺伝子が存在している可能性が考えられた。

## 6. SHL マウスのモデルとしての有用性と入手法

高脂血症・動脈硬化症では環境要因である地域差、食生活の違いなどが明らかである一方、同様の食生活習慣を持つグループの中でも大きな個人差があることが知られている。このことはとりもなおさず遺伝的背景・遺伝子多型の関与を示唆している。今後、高脂血症・動脈硬化症の機序、予防および治療に関する研究に際しては、個々人の遺伝的背景を考慮した研究により、各個人にきめ細かい指導と治療が出来るようになることが望まれる。この意味でオリジナル SHL マウスと複数のコンジェニック SHL マウスは、個人差、体質差、民族差等の遺伝的背景を考慮した高脂血症・動脈硬化症研究に対応するモデルセットといえる。例えば、降コレステロール剤の効果を判定する場合に、動脈硬化感受性系である C57BL/6 マウスを遺伝的背景にした B6.KOR-*ApoE*<sup>shl</sup> と動脈硬化抵抗性系である C.KOR-*ApoE*<sup>shl</sup> の 2 系統マウスを用いて、投与後に TC、HDL、LDL などの測定値および起始部動脈硬化巣の面積を比較して検討する。

高脂血症のモデルマウスとしてはアポ EKO マウスが先行していて、これまでに世界中で膨大な匹数が用いられ、多くの論文が報告されている。しかし、平成 17 年 9 月 1 日に厚生労働省から「動物の輸入届出制度」が導入され、また同年 10 月 1 日付けで遺伝子組換え生物規制法の施行規則が改正された。アポ EKO マウスなど、遺伝子組換え動物を実験に用いるには、マウスの輸送、飼育環境、死体の処理に至るまで、種々の法規制と手続きが必要となり、また米国のジャクソン研究所から購入するので、高額な経費と入手までの時間を要する。しかし、SHL マウスは前述のようにアポ E の自然突然変異動物に由来し、これらの規制とは無縁である。

SHL マウスは、既に多くの研究者が自由に利用できるように体制になっている。オリジナルの SHL マウスは理化学研究所筑波研究所バイオリソースセンター URL:<http://www.brc.riken.go.jp> に寄託済みで

あり、国内外の研究者に分与が可能になっている。また、3 系統のコンジェニック SHL マウスは、一昨年(株)日本エスエルシー URL:<http://www.jslc.co.jp> より市販されている。

## おわりに

SHL マウスとそのコンジェニックマウスは、日本産野生マウスに発見され、世界初の自然発症高脂血症モデルとして樹立された。SHL マウスを用いた研究によって、日本発の独創性豊かな成果が生まれるならば、SHL マウスの開発者として望外の喜びであり、野生ハツカネズミの採取や日々の動物管理に協力していただいた多くの方々にそれを伝える日の来ることもまた夢である。

## 文 献

- 1) 近藤恭司 監修. 富田 武, 江崎孝三郎, 早川純一郎編 実験動物の遺伝的コントロール, ソフトサイエンス社, 東京, 1983.
- 2) Matsushima Y. Ikemoto S. Genetic analysis of mouse salivary protein system-1 (Msp-1) Jpn J Zootech Sci **53** : 617-621, 1982.
- 3) Matsushima Y. Ikemoto S. Genetic analysis of mouse tear protein system-1 (Mtp-1) Jpn J Zootech Sci **54** : 269-274, 1983.
- 4) Ikemoto S. Matsushima Y. Sex and strain differences of mouse variant salivary proteins. Differentiation **2** : 55-58, 1984.
- 5) Matsushima Y. Imai T. Ikemoto S. Evidence for X linkage of the mouse tear protein system-3 (Mtp-3) with mosaic expression in heterozygous females. Biochem Genet **22** : 577-585, 1984.
- 6) Matsushima Y. Hayashi S. Tachibana M. Spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice : Japanese wild mice with apolipoprotein E deficiency. Mamm Genome **10** : 325-357, 1999.
- 7) Matsushima Y. Sakurai T. Ohoka A. Ohnuki T. Tada N. Asoh Y. Tachibana M. Four strains of spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice : phenotypic distinctions determined by genetic backgrounds. J Atheroscler Thromb **8** : 71-79, 2001.