

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2009

課題番号：19209038

研究課題名（和文）ヒト人工染色体保有マウスを用いたダウン症原因遺伝子の解明

研究課題名（英文）Identification of genes responsible for Down syndrome using mice harboring a human artificial chromosome (HAC).

研究代表者

工藤 純 (KUDOH JUN)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：80178003

研究成果の概要（和文）：

本研究においては、申請者等が 10 数年来磨き抜いたヒト 21 番染色体の遺伝子地図と細菌人工染色体(BAC)クローンを基盤とし、近年開発されたヒト人工染色体（HAC: Human Artificial Chromosome）ベクターを駆使して、新規ダウン症モデルマウスの作製を試みた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we attempted to produce novel Down syndrome model mice. We therefore took advantage of gene map of human chromosome 21 which we have brushed up over a decade, bacterial artificial chromosome (BAC) clones, and human artificial chromosome (HAC) which has been developed recently.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2008 年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
2009 年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ダウン症、トリソミー21、ヒト 21 番染色体、疾患モデルマウス、HAC、BAC、マウス 16 番染色体、顕微注入法

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は、出生 1000 人に一人の割合で見られ、21 番染色体の不分離によって起こるトリソミーが原因となる最も頻度の高い先天性疾患の一つである。本症候群の罹患率は母親の出産年齢に依存する（高齢出産での罹患率は 700 人に一人）ため、晩婚化、高齢出産、少子化傾向が進む我が国においてダウン症候群の原因遺伝子群と発症機序の解明、さらにエビデンスに基づく画期的な治療

法の開発への社会的ニーズが益々高まっている。それまでの研究により、藤田保健衛生大学岡崎恒子教授の研究室で池野正史講師等が開発したヒト人工染色体（HAC）と工藤等が 10 数年来磨き抜いた 21 番染色体の遺伝子地図と染色体をカバーする細菌人工染色体(BAC)クローンを基盤とし、任意の BAC クローンをマウス ES 細胞が保持する HAC ベクターに部位特異的組換えを利用して組み込むシステムを開発し、またそこから HAC 保有

マウスを作製することにも成功した。この手法を用いて HAC 保有マウスを系統的に作製し、ダウン症患者に見られる様々な症状の発症に必須な最小単位での遺伝子（群）の同定を目指した。

HAC ベクターは、宿主染色体には挿入されず、独立したミニ染色体として安定に保持されるので、従来の BAC トランスジェニックマウスのような、(1) 導入される BAC のコピー数を 1-2 コピーに抑えることが困難なこと、(2) 染色体中の挿入部位によって周囲からの影響により導入された BAC 内の遺伝子の発現が影響されること、また、(3) BAC の挿入によって、そこに存在した無関係な遺伝子が破壊される、周辺の遺伝子発現が影響を受ける、などの副作用が発生する心配がない。以上のような理由から HAC 保有マウスは、遺伝子量効果を解析するのに非常に優れており、信頼性の高い貴重な情報が得られるという点において、理想的なモデル動物となることが期待された。

しかしながら、実際にマウスを作製してみると、ヒト 21 番染色体由来 BAC から作製した HAC 保有マウスの体内においては一部の組織では HAC が失われやすかったり、導入したヒト遺伝子の発現が、対応する内在のマウス遺伝子の発現（発現量、組織特異性）を反映しない場合もあることなどの問題が示唆され、マウス個体の各組織における HAC 上のヒト遺伝子発現を定量的に精査することと、ヒト 21 番染色体のダウン症候補遺伝子に相同なマウス候補遺伝子を持つ BAC を用いて、新たに HAC を作製することが課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究においては、細菌人工染色体(BAC)クローンと近年開発されたヒト人工染色体(HAC)ベクターを駆使して、新規ダウン症モデルマウスを作製することを試みた。ヒトの 21 番染色体長腕は、マウスゲノムでは 16 番染色体の約 23Mb、17 番染色体の約 1.1Mb、10 番染色体の約 2.3Mb に相当するため、85% を占める 16 番染色体の一部をトリソミーで持つダウン症のモデルマウスが作製され、顔貌異常および行動異常などの症状を呈することが報告されている。一方、マウス 17 番染色体領域にも、メチオニン由来のホモシステインからシステインを合成するのに必須の酵素である CBS(シスタチオニンβシクターゼ)の遺伝子など有力な候補遺伝子がある。また、ヒト 21 番染色体と相同なマウス 16 番染色体の全領域をトリソミーとしたマウス Dp(16)1yu/+で心奇形が見られることが報告され、マウス 16 番染色体との相同染色体領域内に心奇形の原因遺伝子が存在することが確実にされた。一方、部分トリソミーで心奇形を発症しているダウン症患者の染色体

解析から、約 5 Mb (21q22.2-q22.3) の領域 (DS-CHD region) が心奇形発症に必要であると提唱されており、これらの知見を統合すると心奇形の候補遺伝子はわずか 20 個にまで絞られた。これらの遺伝子の中から有力な候補遺伝子に焦点を絞り、HAC への導入と HAC 保有マウスの作製を目指した。

3. 研究の方法

(1) HAC 保有マウス組織における HAC の安定性とヒト遺伝子の発現解析

HAC 保有マウスの各臓器からゲノム DNA および RNA を抽出した。HAC 上のヒトゲノム DNA あるいはマウスゲノム DNA に特異的なプライマーを用いて定量 PCR により、各組織中での HAC の維持率を求めた。また、ヒト遺伝子 mRNA あるいはマウス相同遺伝子 mRNA に特異的なプライマーを用いた定量 PCR により、各組織における両遺伝子の発現量を比較した。

(2) HAC 保有マウスの作製

本研究の研究分担者でもある池野らが近年開発したヒト人工染色体 (HAC) ベクターと我々が共同開発した任意の BAC クローンをマウス ES 細胞が保持する HAC ベクターに部位特異的組換えを利用して組み込み HAC 保有マウスを作製するシステム (平成 16-18 年度基盤研究 B、研究代表者: 工藤 純) を用いて、新規 HAC 保有マウスの作製を試みた。

① ヒト 21 番染色体のダウン症候補遺伝子と相同なマウス候補遺伝子を含む BAC クローンの選定

ヒト 21 番染色体のダウン症候補遺伝子と相同なマウス候補遺伝子についてマウス 10、16、17 番染色体のゲノムシーケンスと転写物の構造・配列および文献情報から、遺伝子構造を推定した。また、マウス BAC の高精度塩基配列情報や挿入断片の末端配列情報をデータベースから取得し、マウス候補遺伝子を丸ごと含む可能性のあるマウス BAC クローンを RPCI-23 マウス BAC ライブラリーから選定し、入手した。得られた BAC クローンについては、挿入されたマウスゲノム DNA に欠失・挿入がないことを確認するため、各クローンについて少なくとも 8 個の独立コロニーを単離後、それぞれの大腸菌を培養し、BAC の DNA を精製した。BAC の DNA は制限酵素で切断後、アガロースゲル電気泳動で切断パターンを確認した。また、データベースから取得した当該マウス BAC クローンの塩基配列あるいはマウスゲノムデータベースから、当該マウス BAC の末端配列に基づいて切り出して来た当該マウス BAC の仮想的塩基配列から推定される仮想的制限酵素断片パターンと比較して、当該マウス BAC クローンが目的のものと間違いないこと、

及び大きな欠失・挿入がないことを確認した。

② HACの作製

独自に開発したHAC基本ベクターの特異的挿入部位に任意のBACを部位特異的組換えを利用して導入するシステムを用いてBACクローンを含むHACを保有するマウスES細胞を作製した。すなわちRed/ET相同組み換えを利用して、大腸菌内のBACベクターにlox66組換え部位配列を組み入れた後、BACのDNAを精製し、マウスES細胞TT2F(B6/CBA1)にDNAトランスファーで導入し、TT2F細胞に保持させたHAC基本ベクターのlox71組換え部位配列にCre/lox配列特異的組換えを利用してBACを丸ごと挿入した。このようにして得られたHAC保有マウスES細胞について、BACの挿入がHACのみであること、および核型を確認した後、キメラマウスの作製に用いた。

③ HAC保有マウスの作製と維持

常法に従い、HACを保有するマウスES細胞を白色のICRマウスより回収した8細胞期胚とアグリゲーション法により融合させてキメラマウスの作製を行った。キメラマウスあるいは、既に得られたHAC保有マウスは純系マウスC57BL/6Jとの戻し交配を行った。

(3) マウス受精卵の前核への顕微注入によるHAC保有マウスの作製法の開発

レポーターとしてCMV-EGFP発現遺伝子を搭載したHACを保有するCHO細胞を培養し、コルセミド処理により分裂中期染色体を調製した。また、調製した染色体全体から、約2Mbと推定されるミニ染色体であるHACをそれ以外のCHO染色体とサイズの違いに基づいて分離精製するために、ショ糖密度勾配遠心法による分画を行った後、ポリアミン緩衝液に懸濁して、マウス受精卵の前核への顕微注入に供した。

4. 研究成果

本研究では、(1)ヒトの3遺伝子(CBS、U2AF1、CRYAA)を組み込んだHAC保有マウスの各組織におけるHACの安定性やヒト遺伝子の発現を解析し、(2)ヒト21番染色体のダウン症候補遺伝子と相同なマウス候補遺伝子を含むBACクローンの選定とマウスES細胞が保持するHACへの導入、そしてマウスBACクローンを組み込んだHAC保有マウスの作製を試みた。(3)さらにHAC保有マウスの迅速作製法の開発を目指し、マウス受精卵へのHAC顕微注入法の開発も試みた。

(1) HAC保有マウス組織におけるHACの安定性とヒト遺伝子の発現解析

我々は、既にヒトBACクローンを組み込んだHAC保有ES細胞よりマウスを作製することに成功した。マウス組織内でもHACが本来のミニ染色体として独立して振る舞っているかを再度確認するために、Fluorescence in situ hybridization (FISH)を行った(図1)。

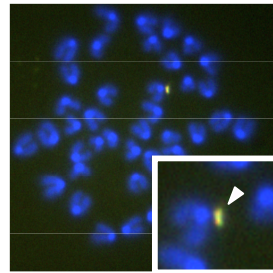


図1 マウス脾臓より抽出した白血球を用いて行ったFISHの結果。マウス染色体に組み込まれることなく、独立に存在していることがわかる。緑：ヒト21番染色体由来アルフォイドリピート、赤：KB2007G4、青：マウス染色体(DAPI染色)

また、各組織で維持されるHACのコピー数を詳細に調べたところ、HACは各組織で概ね維持されていた(図2)。

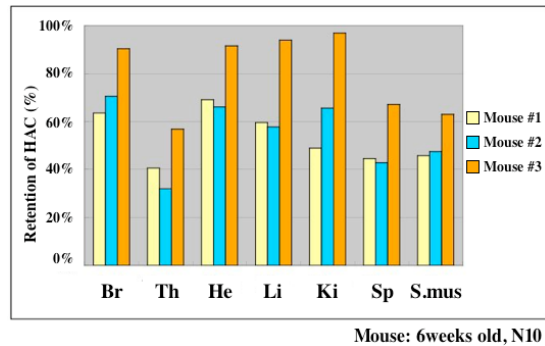
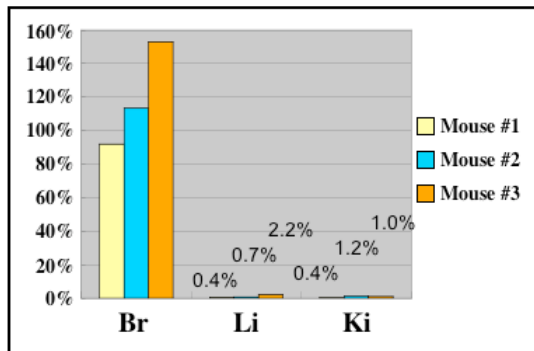
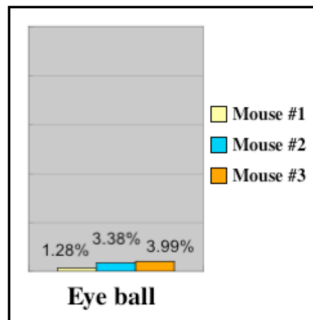


図2 各組織におけるHACの維持率。HAC保有マウス各組織中でHACを保持する細胞の割合を示す。Br: Brain, Th: Thymus, He: Heart, Li: Liver, Ki: Kidney, Sp: Spleen, S.mus: Skeletal muscle

一方、導入したヒトの3遺伝子(CBS、U2AF1、CRYAA)のマウス各組織における発現をRT-PCRで定量したところ、ハウスキーピング遺伝子であるU2AF1についてはマウス相同遺伝子と同等の発現を認めましたが、CBSについては脳においてはマウスと同等であったが本来高い発現量を示すと予想されていた肝臓や腎臓においては、少量しか発現しておらず、CRYAAについても眼球における発現が低いことが明らかとなった(図3)。



CBS



CRYAA

図3 導入ヒト遺伝子の主なマウス組織における発現量の定量結果CBS(上)CRYAA(下)。発現量については、各組織におけるマウスオルソログの発現量を100%としてその相対量を示した。Br:Brain、Li:Liver、Ki:Kidney

このような結果から、マウスの転写装置とヒト遺伝子プロモーターとの相性が遺伝子ごとだけでなく、組織ごとにも異なるということが示唆された。

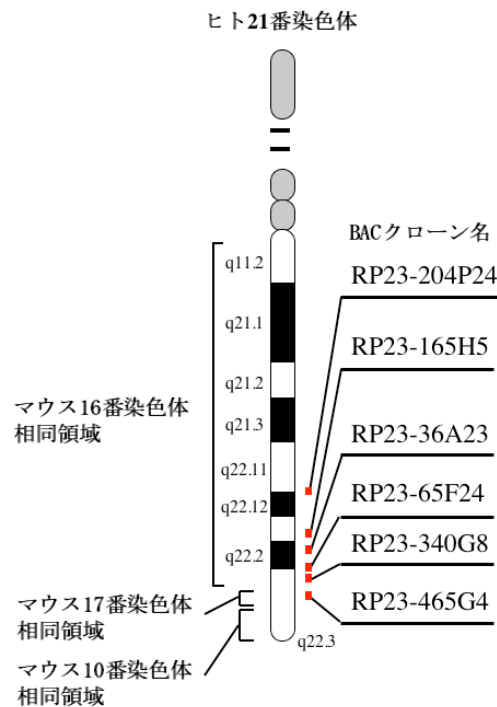
(2) HAC保有マウスの作製

以上のようなマウス組織におけるヒト/マウス遺伝子間での遺伝子発現量の相違を克服するため、様々なダウン症候補遺伝子のマウス相同遺伝子を含むマウスBACクローンをデータベース検索から選定した。その中でも重要度から選択した6クローンについてマウスBACのDNAの精製、検定を進め、マウスES細胞が保持するHAC基本ベクターへの挿入を行った。これらマウスBAC6クローンに相当するヒト遺伝子の位置をヒト21番染色体に当てはめて示した(図4)。

① ヒト21番染色体のダウン症候補遺伝子と相同なマウス候補遺伝子を含むBACクローンの選定

ヒトBACクローンKB2007G4と同じ遺伝子セット(*Cbs*、*U2af1*、*Cryaa*)を含むマウスBACクローン、RP23-465G4を入手し、単一コロニー8個よりそれぞれDNAを抽出しチェックを行った結果、これらのクローンに大きな

欠失や挿入はないものと判断された(図5)。



RP23-204P24	<i>Kcne1</i> , <i>Dscr1</i> , <i>2410124H12Rik</i> , <i>Clic6</i>
RP23-165H5	<i>Dyrk1a</i>
RP23-36A23	<i>Brwd1</i> , <i>1700093J21Rik</i> , <i>Hmg1</i> , <i>Lca51</i>
RP23-65F24	<i>Bace2</i> , <i>Mx1</i>
RP23-340G8	<i>Fam3b</i> , <i>Mx2</i> , <i>Tmprss2</i>
RP23-465G4	<i>Cbs</i> , <i>U2af1</i> , <i>Cryaa</i>

図4 マウスBACクローンのヒト21番染色体上の相対位置。左にはヒト21番染色体と相同なマウス16,17,10番染色体に相当する領域を示した。また、下には各マウスBACクローンに含まれる遺伝子を示した。

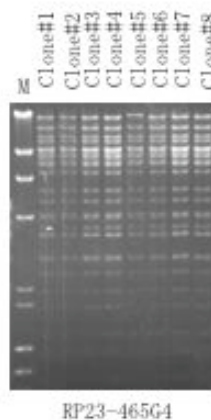


図5 マウスBACクローンRP23-465G4の制限酵素EcoRIによる消化後の各クローンのバンドパターン。

また、ダウン症の心奇形発症に必須な遺伝子を含むと考えられる最小候補領域内の 20 個の遺伝子の中から公共のデータベースと過去に報告された文献を元に、心臓に発現の見られる遺伝子を選び出し、その全エクソンおよび発現調節領域を含むと考えられる 3 つのマウス BAC クローン、RP23-36A23、RP23-65F24、RP23-340G8 を入手し、図 5 と同様の方法による確認を行った。特に RP23-36A23 に含まれる Tryptophan rich basic protein (Wrb) 遺伝子は、ヒト胎児心臓でも発現が確認されており、メダカを用いたモルフォリノオリゴによるノックダウンの結果、心房や心室の形成異常が報告されていることもあり、心臓形成過程において重要な役割を担っていることが示唆される。

さらに、2006 年にカルシニューリンシグナル経路のインヒビターとして機能していることが知られている Down syndrome critical region 1 (DSCR1) と Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A (DYRK1A) が同シグナル経路において転写因子 NFATc の核内への移行を制御していることが報告された。カルシニューリンシグナル経路は脳だけでなく、骨や心臓、造血組織など様々な組織で重要な機能を担っていることが知られている。従って、これらの遺伝子が及ぼす遺伝子量効果を解明することはダウン症の病態理解の上で重要な手掛かりとなると予想される。そこで我々は、これらの遺伝子を含むマウス BAC クローン (RP23-165H5、RP23-204P24) も入手し、単一コロニー 8 個よりそれぞれ DNA を抽出しチェックを行った結果、これらのクローンに大きな欠失や挿入はないものと判断された (図 6)。

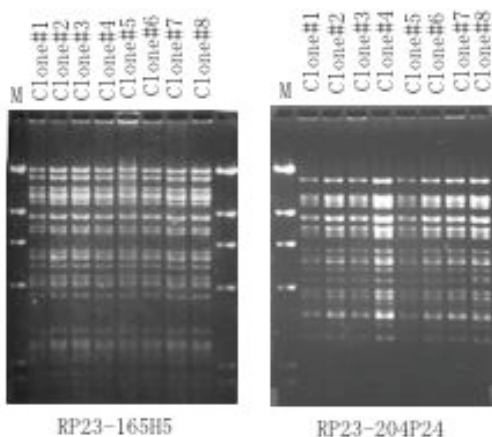


図 6 マウスBACクローンRP23-165H5、RP23-204P24の制限酵素EcoRIによる消化。

② HACの作製

以上の 6 クローンについては、すべてマウス ES 細胞が保持する HAC 基本ベクターへの組み込みを行い、HAC 保有 ES 細胞をそれぞれ作製した。

③ HAC保有マウスの作製

上記マウス BAC 挿入 HAC 保有 ES 細胞からのキメラマウスの作製、HAC 保有マウスの作製は現在も進行中である。

(3) マウス受精卵の前核への顕微注入による HAC 保有マウスの作製法の開発

HAC のマウス受精卵の前核への顕微注入を試みた。これに成功すれば、ES 細胞を介さずに、任意のマウス系統への HAC の迅速な導入が可能となり、現在行っている純系マウスへの戻し交配が不要となり、HAC を用いたモデル動物の作製全般にわたる重要な技術開発となる。

シヨ糖密度勾配遠心法にて HAC を回収した後、通常のポリアミン緩衝液に懸濁し、これをマウス受精卵に顕微注入したが 2 日後には細胞毒性が見られ 2 細胞期で卵割が停止した (図 7、左)。その後ポリアミン緩衝液の組成を改変したところ卵割の停止はおこらなくなった (図 7、右)。しかしながら、まだ本法を用いた HAC を保持する個体の作製には成功していない。

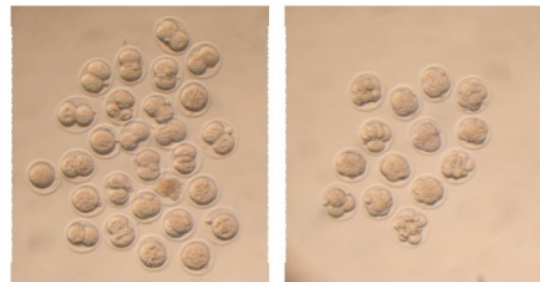


図 7 シヨ糖密度勾配遠心法にて精製した HAC のマウス受精卵への顕微注入。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 7 件)

国内学会

- ① Miyamoto K., Suzuki N., Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Shimizu N., Ikeno M., Kudoh J.; Production of mice

harboring a human artificial chromosome (HAC) and expression of human genes in mouse tissues. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Dec 9-12, 2009

- ② Miyamoto K., Suzuki N., Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Shimizu N., Ikeno M., Kudoh J.; Production of Down syndrome mouse model harboring a human artificial chromosome (HAC) including a bacterial artificial chromosome (BAC). The 54th Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics, Shinagawa, Sep 23-26, 2009
- ③ Miyamoto K., Suzuki N., Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Shimizu N., Ikeno M., Kudoh J.; Expression of human genes on a human artificial chromosome (HAC) transduced into mice., BMB2008 Biochemistry and Molecular Biology, Kobe, Dec 9-12, 2008
- ④ Miyamoto K., Suzuki N., Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Shimizu N., Ikeno M., Kudoh J.; Identification of genes responsible for Down syndrome using mice harboring a human artificial chromosome (HAC)., BMB2007 Biochemistry and Molecular Biology, Yokohama, Dec 11-15, 2007

ワークショップ

- ⑤ Miyamoto K., Suzuki N., Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Shimizu N., Ikeno M., Kudoh J.; Identification of genes responsible for Down syndrome using mice harboring a human artificial chromosome (HAC)., G-COE Workshop, Shinanomachi, Feb 29- Mar1, 2008

国際学会

- ⑥ Kudoh J., Miyamoto K., Suzuki N., Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Shimizu N., Ikeno M.; Novel method to produce partial trisomy mice using a human artificial chromosome (HAC): an application to Down syndrome. The 59th Annual Meeting of ASHG, Honolulu, Hawaii, October 20-24, 2009
- ⑦ Kudoh J., Miyamoto K., Suzuki N.,

Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Shimizu N., Ikeno M.; Production of Novel Down Syndrome Mouse Model using Human Artificial Chromosome (HAC)., Expert Workshop on the Biology of Chromosome 21 Genes. Washington D. C., Sep 28- Oct 1, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 純 (KUDOH JUN)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：80178003

(2) 研究分担者

池野 正史 (IKENO MASASHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80298546

渋谷 和憲 (SHIBUYA KAZUNORI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90296723
(平成 20 年度末まで)

堺 弘介 (SAKAI KOSUKE)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70245463

(3) 研究協力者

清水 信義 (SHIMIZU NOBUYOSHI)
慶應義塾大学・名誉教授

浅川 修一 (ASAKAWA SHUICHI)
東京大学・農学部・教授

岡崎 恒子 (OKAZAKI TUNEKO)
名古屋大学・名誉教授

鈴木 伸卓 (SUZUKI NOBUTAKA)
株式会社 クロモリサーチ・研究員

宮本 憲一 (MIYAMOTO KENICHI)
慶應義塾大学・医学部・助教