

機関番号：32612  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2009～2010  
課題番号：21791007  
研究課題名(和文)  
ダウン症における心奇形発症の原因遺伝子の同定  
研究課題名(英文)  
Identification of the responsible gene(s) for congenital heart defect in Down syndrome.  
研究代表者  
宮本 憲一 (MIYAMOTO KEN-ICHI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：00424185

## 研究成果の概要(和文)：

ダウン症は、最も一般的な染色体異常疾患であり精神遅滞、特徴的顔貌をはじめ様々な症状を呈することが知られている。しかしながら、各症状の原因となる遺伝子や発症機序は未だ不明である。そこで、本研究では、ダウン症患者の中でも比較的高頻度に見られる心奇形に焦点を当て、その原因遺伝子および発症メカニズム解明のための第一歩として、原因候補遺伝子の一つである *Zfp295* 欠損マウスの作製を試みた。

## 研究成果の概要(英文)：

Down syndrome (DS) is the most common genetic disease caused by chromosomal aneuploidy, and variable symptoms including the mental retardation and the characteristic face are observed in patients with DS. However, the responsible genes for the incidences of each symptom and their molecular mechanisms have not been cleared. In this study, we focused on the congenital heart defect that is observed with relatively high frequency in DS, and tried to generate the knockout mice of *Zfp295* that is one of the candidate genes for Down syndrome congenital heart defect (DS-CHD) to elucidate the molecular pathogenesis of DS-CHD.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、心奇形、ノックアウトマウス、*Zfp295*

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症(21トリソミー)は、精神遅滞を伴う先天性疾患の中で最も頻度の高い(700～1000人に1人)疾患であり、21番染色体上の

遺伝子のコピー数増加によって引き起こされる遺伝子量効果により特徴的顔貌、精神遅滞、心奇形、四肢の奇形、早期型アルツハイマー病など様々な症状を呈する。また、ダウン症

は原因（遺伝子コピー数の増加）と結果（臨床症状）は非常に明確であるにもかかわらず、その発症機序についてはほとんど明らかにされていない。このような現状から、ダウン症における遺伝子量効果の分子生物学的解明は急務である。

本研究ではダウン症に見られる数ある症状のうち、患者群の間でも 40～50%と比較的高い頻度で見られる心奇形に焦点を絞り、発症の原因となっている遺伝子を同定し、その発症メカニズムを明らかにすることを目指した。ダウン症心奇形の原因遺伝子に関する研究は 1990 年代前半から行われており、それは主に心奇形を発症した部分トリソミー患者らのトリソミー部分の染色体解析を基にした最小オーバーラップ領域として絞られてきた。このような方法を用いて、2001 年には約 5Mb の領域がダウン症心奇形発症に必要な最小領域（DS-CHD region : Down syndrome-congenital heart defect region）として報告された。一方で、ダウン症モデルマウスを用いた表現型解析により、ヒト 21 番染色体全体をマウスに組み込んだ C(#21)-11 や Tc-1 で心奇形が認められた他、2006 年にはそれまで心奇形を発症しないと考えられていたヒト 21 番染色体と相同な領域を含むマウス 16 番染色体の部分トリソミーマウスである Ts65Dn での食殺あるいはネグレクトされ死亡した新生仔マウスの一部にも心奇形が認められたことが報告された。さらにその翌年には、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にしたモデルマウスで心房中隔欠損や心室中隔欠損、両大血管右室起始症、ファロー四徴症などダウン症患者の心奇形と一致する複数の症状が認められた。以上の報告を基に、ダウン症における心奇形発症に必須と考えられる最小候補領域を DS-CHD MCR（DS-CHD minimum candidate region）とし（図 1）同領域に含まれる 20 個のタンパク質をコードする遺伝子の中からダウン症心奇形発症の原因遺伝子の探索を行うこととした。

## 2．研究の目的

本研究では、ダウン症患者に比較的高頻度で見られる心奇形を対象に、症状発症に最も大きく寄与する遺伝子を同定し、その発症機序を明らかにすることを目指した。

## 3．研究の方法

ダウン症は、21 番染色体トリソミーによる遺伝子発現量の増大が予測困難な様々な波及的効果をもたらした結果として引き起こされる疾患である為、個々の症状の原因として大きく寄与する遺伝子を同定するには、個々の遺伝子をトリソミーにしたマウスを作製するよりも、既存の心奇形が確認されたダウン症モデルマウスから候補と考えられる遺伝子のコピー数のみを正常の 2 コピーに戻すことで心奇形の消失を狙った戦略の方がより効率的であると考えた。具体的には、まず候補遺伝子のノックアウトマウスを作製し、そのノックアウトマウスとダウン症モデルマウスとの交配により、産まれた仔マウスで当該遺伝子のコピー数を 3 コピーから正常の 2 コピーに戻った個体について心奇形の消失を確認するという戦略である。その前段階として、公共のデータベースや過去の文献からマウス胎仔期心臓で発現する遺伝子の選別を行った後、IKMC（International Knockout Mouse Consortium）のデータベースでターゲット遺伝子のノックアウト ES 細胞の有無を検索した。その結果、候補遺伝子として選んだ 2 個の遺伝子のノックアウト ES 細胞の購入が可能であったため、IKMC より入手した。当該 ES 細胞は、供給元のプロトコールに従って培養し、マウス胚盤胞への注入法によりキメラマウス作製を行った。

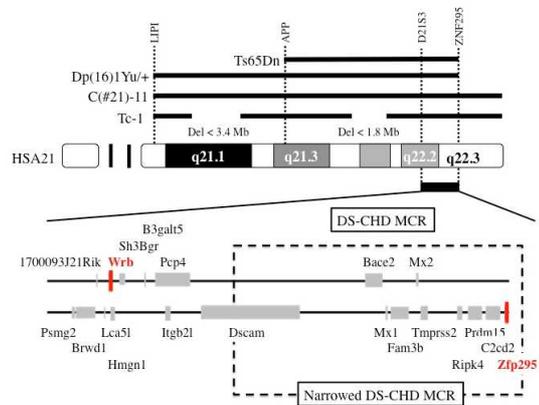
## 4．研究成果

DS-CHD MCR に含まれる 20 個の遺伝子の中から候補遺伝子として有力と考えられた 2 つの遺伝子を選出し、IKMC よりノックアウト ES 細胞を入手した（図 1）。その一つ、Wrb（tryptophan rich basic protein）遺伝子は、心臓を含む様々なヒト胎児組織での発現が確認されており、また最近ではメダカでの

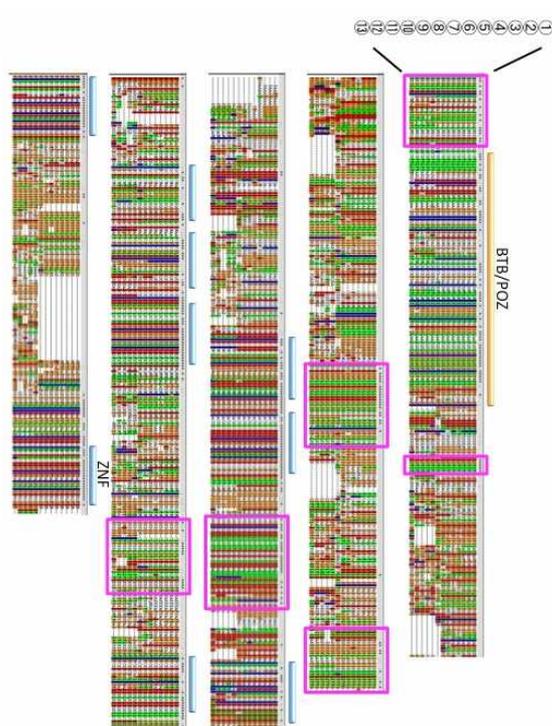
モルフォリノオリゴによるノックダウンの結果、心臓に奇形が生じることが報告されている。これらのことから、この遺伝子は心臓の発生において何らかの役割を担っている可能性が示唆された。一方、もう一つの候補遺伝子、Zfp295 (Zinc finger protein 295) 遺伝子は、元々ヒト 21 番染色体の完全塩基配列解読が行われていた際に、所属研究室で同定されたヒト ZNF295 遺伝子のマウスオルソログである。zinc finger ドメインを持つことから転写因子としての機能を有していると考えられた。また、脊椎動物における ZNF295 オルソログのアミノ酸配列のアライメント解析から、ZNF295 には BTB/POZ と zinc finger ドメイン以外にも霊長類から魚類にまで高度に保存されたドメインが存在していることが見いだされている(図2)。さらに、ヒト ZNF295 遺伝子上のアミノ酸置換を伴う SNP と、様々な種類の機能(細胞周期、細胞分裂、細胞間シグナル、タンパク輸送、シグナル伝達など)を持った遺伝子群の発現量が相関していることが報告されていることから(Windemuth et al., Cold Spring Harb Symp Quant Biol., 68: 89-107, 2003.) ヒト ZNF295 遺伝子は多数の遺伝子の発現調節に重要な役割を担っていることが示唆される。したがって、ヒト 21 番染色体トリソミーによる ZNF295 遺伝子の発現量増加が、同タンパクに制御される多数の遺伝子の発現量にも大きな影響を及ぼしていることが予想される。以上のような理由から、本研究では上記の2個の候補遺伝子についてのノックアウトマウスを作製することとした。

ところが、2009年に Kobel ら(Kobel et al., Proc Natl Acad Sci U S A., 106: 12031-12036, 2009)による高密度 BAC マイクロアレイによる心奇形発症部分トリソミー患者の解析から、心奇形における最小候補領域は約 1.8Mb の範囲にまで狭められた(図1、点線枠内)。この報告によって、それまで候補遺伝子として考えられていた Wrb 遺伝子は候補領域外の遺伝子となったため、Wrb ノックアウトマウスの作製を取り止め、Zfp295 遺伝子のノックアウトマウスの作製を行った。その結果、二十数匹のキメラマウス

スを得ることが出来、さらにその内の4匹は特に ES 細胞の寄与率の高い個体であった(図3)。ES 細胞の個体への寄与率は、それぞれの個体の毛色より判断した。現在、これらキメラマウスと C57BL/6 との交配を行っておりノックアウトアレルの子孫への伝達を確認でき次第、ダウン症モデルマウスとの交配を行い心奇形発症メカニズムの解明を目指す。また、同時に同ノックアウトマウスにおける詳細な解析を進め、Zfp295 によって制御を受けている遺伝子群を明らかにすることで、Zfp295 トリソミーがダウン症モデルマウスに及ぼしている遺伝子量効果を解明する為の基礎を築く。



< 図1 > 図上部の実線は、心奇形の確認されたダウン症モデルマウスのトリソミー部分を示す。図下部は研究開始当初の DS-CHD MCR。点線内は Kobel らによって狭められた DS-CHD MCR (約 1.8Mb)。赤字は本研究で選出した候補遺伝子。



<図2> 脊椎動物の ZNF295 アミノ酸配列の相同性。BTB/POZ、Zinc finger ドメイン以外にも高度に保存された領域の存在が見いだされた（桃色枠内）。比較に用いた生物種は以下の通り。 ヒト、 チンパンジー、 アカゲザル、 マウス、 イヌ、 オポッサム、 ニワトリ、 カエル、 メダカ、 トゲウオ、 ミドリフグ、 トラフグ、 ゼブラフィッシュ



<図3> 得られた4匹の高寄与率キメラマウス。黒い毛色の個体は低寄与率キメラマウス。

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0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 憲一 (MIYAMOTO KEN-ICHI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：00424185

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし