

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23791194

研究課題名（和文） ダウン症モデルマウスを用いた新規心奇形原因遺伝子の同定

研究課題名（英文） Identification of responsible gene(s) for congenital heart defect using the model mice of Down syndrome

研究代表者

宮本 憲一 (MIYAMOTO KENICHI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：00424185

研究成果の概要（和文）：

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を目指し、ダウン症心奇形（DS-CHD）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。しかしながら、ノックアウトマウスの作製が予想以上に困難であった為、別法としてヒト人工染色体（HAC）を用いたトランスジェニックマウスの使用を検討した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we focused on the congenital heart defect that is observed with relatively high frequency in the patients with Down syndrome, and attempted 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. However, generation of the Zfp295 knockout mice was quite difficult. Therefore, we evaluated the mice harboring human artificial chromosome (HAC) as another method to achieve the aim of this study.

交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 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

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症（21トリソミー）は、現在最も認知度の高い精神遅滞を伴う染色体数異常疾患であり、その頻度も約1000人に1人と非常に高い。また、近年の晩婚化、少子化等の問題によりダウン症の発症率は年々増加傾

向にあることから、その詳細な病態解明は今後の症状緩和への治療や新規薬剤開発に必須なことである。しかしながら、現在でもダウン症における症状発症のメカニズムやそれに関わるパスウェイ等の生物学的な病態理解

にはまだまだ多くの研究が必要であり、その理由の一つは、ダウン症が21番染色体上の遺伝子コピー数の増加に伴ったトリソミー遺伝子の高発現とその影響を受けた21番染色体以外の遺伝子発現量の増減が複雑に絡み合った結果として引き起こされる疾患であるためである。

本研究では、ダウン症に数多く見られる症状の中でも患者全体の約50%と比較的高頻度に発症する心奇形に焦点を当て、その原因遺伝子と発症機序を解明しようと試みた。ダウン症心奇形は、房室中隔欠損(AVSD)、心室中隔欠損(ASD)、動脈管開存症(PDA)、ファロー四徴症(TOF)など様々な症状として認められる。これまでも、ダウン症心奇形と21トリソミーとの関係を明らかにすべく、大きく2つのアプローチが行われてきた。一つは、心奇形を発症した21部分トリソミー患者の染色体解析から最小オーバーラップ領域を絞り込み、原因遺伝子を見出すという試みである。そしてもう一つは、ヒト21番染色体と相同なマウス16、17、10番染色体領域をトリソミーにした部分トリソミーマウスやヒト21番染色体そのものを導入したマウスをダウン症モデルとして作製し、心奇形の発症を精査・解析するという試みである。2009年、21部分トリソミー患者の詳細な染色体解析データとそれまでのモデルマウスの知見から、ダウン症における心奇形発症の原因候補領域が10個の遺伝子を含む約1.8 Mbの領域に絞られたことが報告された。本研究を遂行するにあたり、この10個の遺伝子を心奇形原因候補遺伝子とし、正常マウス胎仔心臓由来cDNAを用いた当該候補遺伝子の発現解析から、さらに有力な候補と思われる遺伝子を5個(MX2、RIPK4、PRDM15、C2CD2、ZNF295)に絞った。これらの候補遺伝子のノックアウトマウスを作製し、心奇形

が確認された既存のダウン症モデルマウスとの交配により、候補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表現型消失を精査することで原因遺伝子の同定を試みた。

## 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

### (1) ノックアウトマウスの作製

IKMC (International Knockout Mouse Consortium) より入手したZfp295 (マウスZNF295) ノックアウトES細胞を用いてノックアウトマウスの作製を行った。過剰排卵処理した3週齢BDF1マウスより採取した8細胞期胚を培養用インキュベーターにて胚盤胞にまで培養し、培養しておいたES細胞を胚盤胞に注入した。そうした胚盤胞を一晩培養した後、偽妊娠マウスの子宮に移植した。ES細胞の培養に関しては、供給元であるMMRRC (Mutant Mouse Regional Resource Center) のプロトコールに従った。

### (2) ヒト人工染色体導入マウス

所属研究室で既に確立されたヒト人工染色体(HAC; Human Artificial Chromosome)導入マウスを用いて当該候補遺伝子だけの部分トリソミーマウスを作製する方法も有効ではないかと考え、その有用性を検討した。HAC導入マウスは、目的遺伝子を含むBACクローンがHACに組み込まれたHAC保有ES細胞と過剰排卵処理した3週齢ICRマウスより採取した8細胞期胚との凝集法により作製されたキメラマウスとC57BL/6Jとを交配することで作製された。

#### 4. 研究成果

##### (1) Zfp295 ノックアウトマウスの作製

Zfp295 ノックアウト ES 細胞を用いて、購入元である MMRRRC 推奨のプロトコールに沿ってノックアウトマウスの作製を行ったところ、ES 細胞寄与率の高いと思われるキメラ個体 7 匹は得られたものの、それらのキメラマウスと C57BL/6 マウスとの交配により出生した仔マウス 188 匹の中に ES 細胞由来のものは、一匹も存在しなかった。原因は定かでないが、購入した Zfp295 ノックアウト ES 細胞が、そもそも生殖細胞系列への分化能を失っていた可能性や、Zfp295 の部分モノソミーマウスが発生過程で致死性であった可能性もある。

##### (2) ヒト人工染色体導入マウスの検討

ヒト人工染色体 (HAC) は、ヒト 21 番染色体セントロメア由来のアルフォイドリピート DNA と目的 DNA を組み込むための組み換えサイトを持つエピソーマル型ベクターである。そのような構造から HAC は、宿主細胞の染色体とは独立したミニ染色体として安定に保持されるので、トランスジェニックマウスの様に一度に多数の導入遺伝子断片が挿入されることもなく、導入した遺伝子の発現が組み込まれた染色体部位によって異なることもない。また、導入遺伝子断片の挿入によって、そこに存在した遺伝子が破壊される等の予測不可能な二次的効果が発生することもないため、導入した遺伝子による効果を個体レベルで解析するためのモデルマウスの作製に適している。

所属研究室では既に HAC 導入マウスが作製されており、そのマウスは慶應ヒトゲノム BAC ライブラリーより選ばれた BAC クローンが組み込まれ、*CBS* (Cystathionine  $\beta$ -synthase)、*U2AF1* (U2

auxiliary factor 1)、*CRYAA* (Crystalline  $\alpha$  A) の 3 つのヒト遺伝子を外来遺伝子として持つ。この HAC 導入マウスについてこれまでに解析を行った結果、個体、組織ごとに差は見られるものの、HAC はマウス個体内でも安定に維持され、子孫に受け継がれることが確認されている。しかしながら、マウス個体内でのヒト遺伝子の発現を調べたところ、ヒト *CRYAA* の組織発現パターンは内在性マウス *Cryaa* と一致していたが発現量は顕著に低く、さらにヒト *CBS* については組織発現パターン、発現量比の両方にマウス *Cbs* と明らかな差異が認められた。そこで本研究では、このようなヒトとマウス遺伝子の発現における違いは、それぞれの生物種における発現調節の違いによるものなのか、あるいは HAC ベクターの何らかの構造に起因する違いなのかを検証する為、同じ遺伝子 (*Cbs*、*U2af1*、*Cryaa*) を含むマウス BAC クローンを組み込んだ HAC 導入マウスを作製した。同マウスの作製に用いた HAC 導入 ES 細胞 (TT2F) から抽出したゲノム DNA を用いてマウス *Cbs* 遺伝子の copy number assay を行った結果、HAC 導入 ES 細胞は 3 コピーの *Cbs* 遺伝子を持っていることが確認された (図 1)。したがって、本研究で作製した HAC 導入マウスは *Cbs*、*U2af1*、*Cryaa* 遺伝子を 3 コピー持つ部分トリソミーマウスであることが明らかとなった。

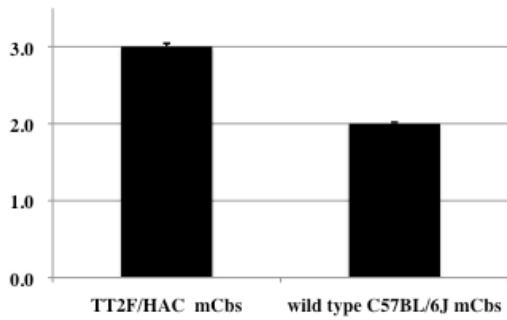


図1 定量PCRを用いたHACに組み込まれたマウス BAC クロンの copy number assay。HAC 導入マウスは内在の遺伝子2コピーに加え、HAC 上に1コピーの遺伝子を持っている。

次に、得られた HAC 導入マウス個体内での HAC の独立性、および各組織での維持率をそれぞれ FISH (Fluorescence in situ hybridization)、定量 PCR にて調べた。その結果、このマウスにおいても HAC はマウス組織で安定かつ独立に維持されていることを確認した (図2、3)。

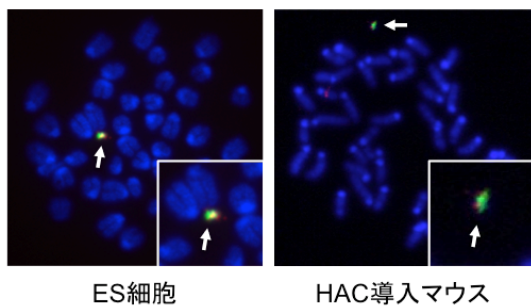


図2 HAC 導入マウス作製に用いた ES 細胞 (左) と HAC 導入マウス脾臓より調製した細胞 (右) における FISH。HAC (矢印)、緑 : アルフォイド、赤 : BAC

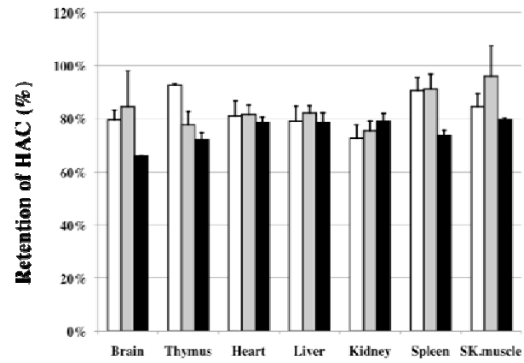


図3 定量PCRによる HAC 導入マウスの各組織における HAC の維持率。各組織の維持率は ES 細胞の維持率を100%として算出した。

次に、各組織での *Cbs*、*U2af1*、*Cryaa* の発現パターンを調べた (図4)。その結果、HAC 導入マウスにおける *Cbs*、*U2af1*、*Cryaa* 遺伝子の発現パターン (上段) は、同胞野生型マウス (下段) の発現パターンと一致した。このことから、HAC に組み込まれたマウス BAC クロンは、*Cbs*、*U2af1*、*Cryaa* 遺伝子発現の組織特異性を保持するのに十分な領域を含んでいると推測された。

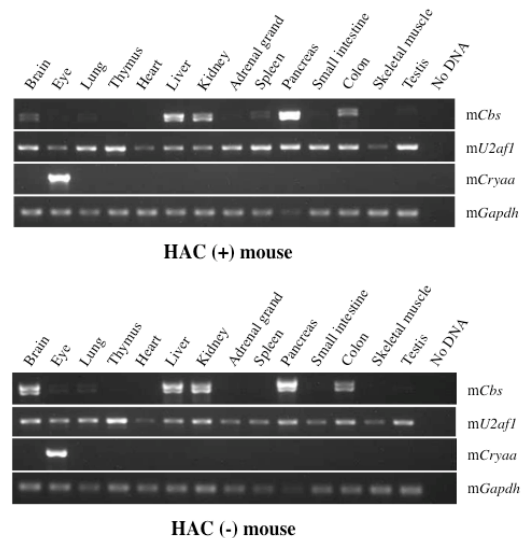


図4 HAC 導入マウス (上) と同胞野生型マウス (下) の各組織における *Cbs*、*U2af1*、*Cryaa* 遺伝子の発現。各組織は6週齢、雄マウスより得られた。Gapdh は内在性コントロール

ールとして用いた。

以上のことから、本研究で作製した HAC 導入マウスは、目的遺伝子 (*Cbs*, *U2af1*, *Cryaa*) を 3 コピー持つ部分トリソミーマウスであり、さらに導入した HAC ベクターはマウス組織内でも独立かつ安定に維持されていることを確認した。このように、HAC による遺伝子導入マウス作製系は目的遺伝子を含む任意の BAC クローンを用いることができ、比較的容易に部分トリソミーマウスを作製することが可能である。このことから HAC 導入マウスはダウン症における遺伝子と表現型との関係を明らかにするのに有用な手段の一つであると考えられる。特に、本研究が対象とした心奇形のように、原因候補領域が非常に狭い範囲にまで絞られている場合、もしくは候補遺伝子が明確な場合には HAC 導入マウスを用いた表現型の精査は非常に有効な手段であると期待される。したがって本研究で得られた成果は、心奇形のみならず将来的な他のダウン症の症状における分子メカニズムの解明にも貢献し得る貴重な成果であると考えられる。

#### 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 1 件)

宮本 憲一, 鈴木 伸卓, 堺 弘介, 浅川 修一, 岡崎 恒子, 清水 信義, 池野 正史, 工藤 純、ヒト人工染色体 (HAC) 導入マウスを用いたダウン症の原因遺伝子と遺伝子量効果解明への試み、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡

[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 KENICHI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：00424185