

# ゲノム資源とノックアウトマウスを用いた22q11.2症候群の成因の 解明

●三浦 直行

浜松医科大学医学部

## ＜研究の目的と進め方＞

DiGeorge症候群は口蓋裂、心大動脈異常、副甲状腺異常、胸腺異常、特異的顔貌を特徴とするヒト先天性奇形で、その患者の90%に一方の2番染色体の22q11.2領域に欠失（約3 Mbp）が認められることから、22q11欠失症候群と呼ばれるようになった。申請者はMFH-1 (Foxc2) 遺伝子のノックアウトマウスを作製した。ヌルマウスは心大血管形成異常、口蓋裂、頭蓋顔面骨の形成異常などを呈し、DiGeorge症候群の症状と酷似していることが明らかになった。

ヒト22番染色体の全塩基配列が決定された。また、22q11領域（マウスでは16番染色体）にあるTbx1遺伝子とCrkl遺伝子のノックアウトマウスが相次いで作製され、心大動脈異常や副甲状腺異常、胸腺異常の症状が観察された。以前には、ヒト22番染色体にはないが、DiGeorge症候群の主症状を示すエンドセリン受容体A (ETA) ノックアウトマウスが報告されている。しかし、DiGeorge症候群患者はヘテロで症状を呈するに対し、ノックアウトマウスではホモにした時のみ典型的な症状が出現するという矛盾点がある。そこで、ノックアウトマウスと22q11.2領域のゲノム資源を利用して、複雑なDiGeorge症候群の原因遺伝子群の包括的解明をすることにした。

本研究では、DiGeorge症候群のモデル動物と考えられるMFH-1, Tbx1, Crkl, ETAノックアウトマウスにおいてヒト22q11領域の約50個の全遺伝子の発現を包括的に検討し、DiGeorge症候群の成因・病態の統括的解明を目指したい。

## ＜研究開始時の研究計画＞

1) MFH-1, Tbx1, Crkl, ETAヘテロマウスどうしを交配し、ホモマウスと正常マウスを得る。心大血管異常がおこる胎生期12.5日を中心に、10.5日、11.5日、12.5日、13.5日、14.5日の胎児からそれぞれ mRNAを抽出する。ヒト22番染色体の22q11.2領域に存在する全遺伝子約50個に対応するマウス遺伝子の塩基配列情報からそれぞれ特有のプライマーを合成しPCRすることで、均一な長さのマウス遺伝子をそろえる。約50個のPCR産物をチップ状に個相化する。ある胎生期のホモマウスmRNAと正常マウスmRNAからプローブを作製し、それらを用いて、上記で作製した遺伝子チップにハイブリダイズさせ、発現プロファイルを統括的に判定する。

2) MFH-1, Tbx1, Crkl, ETAの各ヘテロマウス同士を交配し、ダブルヘテロマウスを作製し、症状を観察する。さらに、トリプルヘテロマウス、テトラヘテロマウスも同様に作製する。これは、ヒト患者ではヘテロで症状が出ているので、複数個の遺伝子のヘテロ状態が症状をおこすという可能性を検討するものである。ホモマウスで発現が著明に低下している遺伝子のノックアウトマウスを作製し、DiGeorge症候群の症状が観察されるかどうかを判定する。

3) 22q11領域の遺伝子の発現プロファイルおよび種々の組みあわせのノックアウトマウスの症状の解析から

DiGeorge症候群の症状の原因遺伝子を明らかにする。

## ＜研究期間の成果＞

1) ヒト染色体22q11にある遺伝子約50個に相当するマウス遺伝子をゲノム情報から抽出し、その塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを合成し、固相化した。MFH-1, Tbx1, Crkl, ETAの各ヌルマウスからのmRNAの発現パターンは野生型マウスからのmRNAの発現パターンと有意な差異を示さなかった。もちろん、Tbx1ヌルマウスではTbx1が検出できず、CrklヌルマウスではCrklが検出できなかった。このことは、22q11領域の約50個の遺伝子はTbx1遺伝子やCrkl遺伝子の下流にはないことが明らかになった。

2) MFH-1, Tbx1, Crkl, ETAヘテロマウス同士を交配し、ダブルヘテロマウスを作成した。その結果、MFH-1とTbx1のダブルヘテロマウス、Tbx1とCrklのダブルヘテロマウス、CrklとETAのダブルヘテロマウスはシングルヘテロマウスと顕著な差異を認めなかった。しかし、MFH-1とCrklのダブルヘテロマウスは両シングルマウスより生存数が少なく、MFH-1遺伝子とCrkl遺伝子の間には何らかの相互作用があることが示唆された。

3) MFH-1ヌルマウスにおけるETA遺伝子の発現およびETAヌルマウスにおけるMFH-1遺伝子の発現に変化はなかった。このことから、MFH-1遺伝子とETA遺伝子は互いに独立して大動脈弓血管の形成に関与していることが明らかになった（文献8）。

4) 以上より、各遺伝子の関係は、下図のようにまとめられる。



5) MFH-1 (FOXC2) 遺伝子が、ヒト先天性リンパ水腫-睫毛重生症候群 (LD) の原因遺伝子であることが判明し、MFH-1 (Foxc2) ノックアウトマウスがヒトリンパ水腫のよい動物モデルになることを証明した（文献5）。また、Foxc2ホモマウスの皮膚の毛細リンパ内皮細胞の観察により、Foxc2ホモマウスおよびLD患者の皮膚のリンパ管内皮細胞が蛇行し、厚い基底膜に囲まれ、周皮細胞に取り囲まれ、またリンパ集合管では逆流防止のための弁が欠損していることが明らかになった（文献7）。

## ＜国内外での成果の位置づけ＞

22q11症候群の症状が多彩であることから、TBX1遺伝子を中心とする複合遺伝子病であることが考えられるようになった。単に、22q11領域にあるTBX1遺伝子とCRKL遺伝子の欠損による症状に加え、22番染色体以外にあるFOXC2遺伝子やETA遺伝子が間接的にTBX1遺伝子やCRKL遺伝子に影響を与えているという概念が明らか

かになりつつある。本研究課題はこれら4つの重要遺伝子の相互作用を明らかにした研究として世界から注目を浴びた。

特に、MFH-1 (Foxc2) ノックアウトマウスを用いて、LD患者におけるリンパ管の異常を明らかにしたことは世界に誇れる研究成果であった。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

22q11領域に対するマウス遺伝子約50個に対する各モデルマウスにおける遺伝子発現に有意な増減は見出せなかった。これは、胎生中期のマウス胎児の鰓弓が小さく、十分なRNAを抽出するために組織を大きめにとらざるを得なかったことが一つの理由として考えられる。各遺伝子の発現細胞をセルソーターなどの方法を用いて分離し、T7 RNAポリメラーゼによりRNAを増加させる方法などの工夫が必要と思われる。

また、ヘテロマウスを用いる解析では、4つの遺伝子はMFH-1遺伝子とCrkL遺伝子に相互作用がある以外はお互いに独立であるという結果が出たことは意外であった。似た症状を呈するMFH-1, Tbx1, CrkL, ETAの相互関係がいまひとつ明らかにならなかったのは、生体では多様な制御系が存在していることを暗に示唆しているのかもしれない。

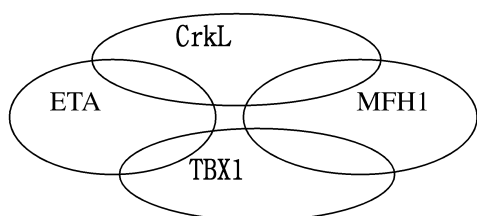
#### 〈今後の課題〉

本研究を通じて、MFH-1 (Foxc2), Tbx1, CrkL, ETA遺伝子の相互関係が少し明らかになったが、全貌を理解するには至っていない。たとえば、ETA遺伝子やCrkL遺伝子は神経堤細胞に発現しているとされているが、MFH-1遺伝子やTbx1遺伝子は中胚葉細胞に発現していると想定されている。これらの仮説を明らかにするにはヒトゲノムやマウスゲノムで明らかにされた遺伝子調節領域の塩基配列の比較を行い配列保存部位を指標に、遺伝子調節部位にレポーター遺伝子を連結させたコンストラクトでトランスジェニックマウスを作成し、各遺伝子の上流にある発現調節因子の同定する必要がある。

また、各遺伝子の発現細胞を生体蛍光蛋白質でマーキングしたマウスを作成し、4つの遺伝子の発現細胞が発生個体内でどのような位置関係を占め、どのような相互作用をしていくかを明らかにする必要がある。そして、蛍光蛋白質を指標にセルソーターで分離された細胞からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイにて遺伝子発現パターンを明らかにすることも重要だと思われる。

さらに、4つの遺伝子のうち2つは転写因子であるので、その標的遺伝子を同定することが次なる課題となる。このためには、両転写因子に対するモノクロナル抗体を作製し、クロマチン免疫沈降を行い、そこで得たDNA断片をDNAマイクロアレイにて検討する、いわゆるChip on chipアッセイが重要な解析法になるとと思われる。

このようにして、MFH-1, Tbx1, CrkL, ETA遺伝子の上流制御蛋白の同定、およびMFH-1, Tbx1遺伝子の標的遺伝子の同定、そして各遺伝子の発現細胞の相互作用と遺伝子発現パターンの違いの解析などからDiGeorge症候群の多彩な症状の原因を明らかにする。



#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文

##### 1. 未登録

Yang, X-L., Matsuura, H., Fu, Y., Sugiyama, T., and Miura, N.: MFH-1 is required for Bone-Morphogenetic Protein-2-induced osteoblastic differentiation of C2C12 myoblasts. FEBS Letter 470, 29-34, (2000).

##### 2. 未登録

Nifuji, A., Miura, N., Kato, N., Kellermann O. and Noda, M.: Bone morphogenetic protein regulation of forkhead/winged helix transcription factor, Foxc2 (Mfh1) in a murine mesodermal cell line C1 and in skeletal precursor cells. J. Bone & Mineral Res. 16, 1765-1771, (2001).

##### 3. 未登録

Gronning, L.M., Cederberg, A., Miura, N., Enerback, S., and Tasken, K.: Insulin and TNF $\alpha$  induce expression of the forkhead transcription factor gene Foxc2 in 3T3-L1 adipocytes via PI3K and ERK1/2-dependent pathways. Mol. Endocrinol. 16, 873-883, (2002).

##### 4. 未登録

Dahle, M.K., Gronning, L.M., Cederberg, A., Blomhoff, H.K., Miura, N., Enerback, S., Tasken, K.A., and Tasken, K.: Mechanisms of FOXC2 and FOXD1-mediated regulation of the RI $\alpha$  subunit of PKA include release of transcriptional repression and activation by PKBa and cAMP. J. Biol. Chem. 277, 22902-22908, (2002).

##### 5. 未登録

Kriederman, B.M., Myloyde, T.L., Witte, M.H., Dagenais, S.L., Witte, C.L., Rennels, M., Bernas, M.J., Lynch, M.T., Erickson, R.P., Caulder, M.S., Miura, N., Jackson, D., Brooks, B.P. and Glover, T.W.: FOXC2 haploinsufficient mice are a model for human autosomal dominant lymphedema-distichiasis syndrome. Hum. Mol. Genet. 12, 1179-1185, (2003).

##### 6. 未登録

Wang, T., Tamakoshi, T., Uezato, T., Shu, F., Kanzaki-Kato, N., Fu, Y., Koseki, H., Yoshida, N., Sugiyama, T. and Miura, N.: Forkhead transcription factor Foxf2 (LUN)-deficient mice exhibit abnormal development of secondary palate. Dev. Biol. 259, 83-94, (2003).

##### 7. 未登録

Petrova, T.V., Karpanen, T., Norrmen, C., Mellor, R., Tamakoshi, T., Finegold, D., Ferrell, R., Kerjaschki, D., Mortimer, P., Yla-Herttuala, S., Miura, N. and Alituro, K.: Defective valves and abnormal mural cell recruitment as a mechanism for the lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. Nature Medicine 10, 974-981, (2004).

##### 8. 未登録

Kanzaki-Kato, N., Tamakoshi, T., Fu, Y., Chandra, A., Itakura, T., Uezato, T., Tanaka, T., Clouthier, D.E., Sugiyama, T., Yanagisawa, M. and Miura, N.: Roles of forkhead transcription factor Foxc2 (MFH-1) and endothelin receptor A in cardiovascular morphogenesis. Cardiovasc. Res. 65, 711-718, (2005).

##### 9. 未登録

Tamakoshi, T., Itakura, T., Chandra, A., Uezato, T., Yang, Z., Xue, X-D., Wang, B., Hackett, B.P., Yokoyama, T. and Miura, N.: Roles of the Foxj1 and Inv genes in the left-right determination of internal organs in mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 339, 932-938, (2006).

10. 未登録

Ormestad, M., Astorga, J., Landgren, H., Wang, T., Johansson, B.R., Miura, N. and Carlsson, P.: Foxf1 and Foxf2 control murine gut development by limiting mesenchymal Wnt signaling and promoting extracellular matrix production. Development, in press.