

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
総括研究報告書

転写因子の欠損による疾患モデルマウスの作製と解析

主任研究者名 前川利男（理化学研究所）

研究要旨

ヒトの疾患の治療法を検討するためには、疾患モデル動物の開発は大変有用である。転写因子CRE-BP1（ATF-2とも呼ばれている）遺伝子のノックアウトマウスを作製・解析した。変異マウス出生直後に肺に空気が入らず、ヒト新生児の死因の大きな割合を占める胎便吸引症候群と同様の症状によって生後すぐに死亡することが分かり、この変異マウスがヒト胎便吸引症候群のモデル動物と成り得ることを示した。この変異マウスでは胎盤のトロホプラスト細胞の増殖に重要なPDGF受容体遺伝子の発現レベルが低下し、胎盤の形成が不全となり、その結果胎児が低酸素状態となり、胎便を含む羊水を吸引することが明らかにされた。ヒトの胎便吸引症候群の中には、CRE-BP1ノックアウトマウスと同様なメカニズムにより生じる症例がある可能性がある。従って、本研究において得られた成果はこのような疾患の診断・治療に役立つと考えられる。また、CRE-BP1と構造の類似する2つの転写因子CRE-BPa, ATF-aの欠損マウスの作製・解析も行った。一連の結果から、CRE-BP1ファミリーの3つのメンバーは胎盤・肺の形成において、重要な役割を果たしていることが示された。

分担研究者 なし

A. 研究目的

ヒトの疾患の治療法を検討するためには、疾患モデル動物の開発は大変有用である。最近の遺伝子ターゲティング技術の確立により、特異的遺伝子欠損マウスの作製が可能となり、種々の変異マウスの作製・解析がようやく可能となってきた。そして種々の疾患のモデル動物となる変異マウスは、

発症メカニズムの解析や治療法の検討のための研究用材料として、多くの研究者にとって、ますます重要になりつつあるが、その作製・解析技術の高度化もまた研究の基盤として大変有用なものになると期待される。CRE (cAMP response element) と呼ばれる特異 DNA 配列は種々の遺伝子の転写制御領域内に存在するが、この配列に結合する転写因子はCREBファミリーとCRE-BP1（ATF-2とも呼ばれている）ファミリーの

二つのファミリーに分けられる。CRE-BP1 は私達が世界で最初に同定したもので、がん遺伝子産物 Jun とヘテロダイマーを形成して CRE に結合して転写を活性化する。CRE-BP1 ファミリーのメンバーとしては他に CRE-BPa と ATFa が存在する。これらの転写因子の活性は細胞内の cAMP 濃度とは関係なく、ストレスに応答する Jun キナーゼ (JNK) で直接リン酸化されることによって活性化される。このように CRE-BP1 ファミリーメンバーは細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしているため、その生理的な役割を理解するために、本研究では CRE-BP1 変異マウスの作製・解析を行うと共に、CRE-BP1 と構造の類似する 2 つの転写因子 CRE-BPa, ATF-a の欠損マウスの作製・解析を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

ノックアウトマウスの作製は常法通り ES 細胞での相同組み換え法を用いて行った。また、変異マウスの解析は病理学的手法や組織学的手法を用いて行った。

## C. 研究結果

CRE-BP1 ノックアウトマウスは出生直後に肺に空気が入らず、ヒト新生児の死因の大きな割合を占める胎便吸引症候群と同様の症状によって生後すぐに死亡することが分かった。従って、この変異マウスはヒト胎便吸引症候群のモデル動物と成り得ることが示された。この現象の原因を探るため、変異マウスの病理学的解析を行った結果、胎生 18.5 日目において変異マウスの胎盤トロホブラスト細胞の増殖が抑制され、胎児が低酸素状態となり、このため胎児が胎便を含む羊水を吸引することが分かった。トロホブラスト細胞の増殖抑制が起こるメカニズムを解明するために転写因子

CRE-BP1 の制御下にある下流の標的遺伝子を同定することを試みた。具体的には野生型と変異体の胎盤から mRNA を精製して cDNA を作製し、サブトラクション法を用いて標的遺伝子を検索した。その結果、トロホブラスト細胞の増殖因子 PDGF の受容体遺伝子が同定された。実際に PDGF の受容体遺伝子の発現を *in situ* 法を用いて野生型と変異体の胎盤で比較検討すると、明らかに変異体の胎盤においてこの遺伝子の発現レベルが低下していることが確認された。また、CRE-BP1 が直接 PDGF 受容体遺伝子のプロモーター活性を活性化していることを分子生物学的手法を用いた実験により確認した。これらの結果から、CRE-BP1 変異マウスにおいてはトロホブラスト細胞の増殖に重要な PDGF 受容体遺伝子の発現レベルが低下し、胎盤の形成が不全となり、その結果胎児が低酸素状態となり、胎便を含む羊水を吸引することが明らかにされた。ヒトの胎便吸引症候群の中には、これと同様なメカニズムにより生じる症例がある可能性があり、この研究成果はこの疾患の診断・治療に役立つと考えられる。

CRE-BP1 変異体は体重・形態形成などは野生型と全く変わらない。これは異常が胎生の非常に後期に生じるためと考えられる。したがって、出生直前の低酸素状態を緩和することができれば、胎児の胎便吸引を防ぎ、変異マウスをレスキューすることができると考えられる。胎生後期に種々の呼吸抑制剤を様々な条件で投与することにより、治療法の検討を行った。しかし、本年度の実験においては胎児の胎便吸引を完全に防ぐことのできる薬剤を見いだすことはできなかった。将来、さらに種々の条件を検討する必要がある。

CRE-BPa KO マウスを作製・解析した所、変異マウスは胎生 17 日目から出生後 24

時間の間に死亡することが分かった。メカニズムを明らかにするため詳細な病理学的解析を行った。その結果、胎盤および肺の形成に異常があり、その結果呼吸不全のため致死となることが明らかとなった。

また、ATFa KO マウスを作製・解析した所、変異マウスは正常なマウスと一見変わらないことが分かった。ATF-aの発現レベルは脳の海馬で高いので記憶や学習といった脳の高次機能と関係している可能性が有る。そこで一連の行動解析を行った結果、音に対して異常に反応することが突き止められた。

さらに、CRE-BP1ファミリー全体の生理的役割を解析するため、CRE-BP1, CRE-BPa, ATF-a の3種類の遺伝子のトリプルノックアウトマウスを作製・解析した。その結果、胎盤・肺の形成が著しい異常が観察され、胎児は11日目の段階で致死となった。この結果から、CRE-BP1ファミリーの3つのメンバーは胎盤・肺の形成において、重要な役割を果たしていることが示された。

#### D. 考察

ヒトの疾患の治療法や診断法を検討するためには、疾患モデル動物の開発は大変有用である。CRE-BP1 ノックアウトマウスは出生直後に肺に空気が入らず、ヒト新生児の死因の大きな割合を占める胎便吸引症候群と同様の症状によって生後すぐに死亡することから、この変異マウスはヒト胎便吸引症候群のモデル動物と成り得る。本研究において、CRE-BP1 変異マウスでは胎盤のトロホブラスト細胞の増殖に重要なPDGF受容体遺伝子の発現レベルが低下し、胎盤の形成が不全となり、その結果胎児が低酸素状態となり、胎便を含む羊水を吸引することが明らかにされた。ヒトの胎便吸

引症候群の中には、CRE-BP1 ノックアウトマウスと同様なメカニズムにより生じる症例がある可能性がある。従って、本研究において得られた成果はこのような疾患の診断・治療に役立つと考えられる。CRE-BP1 ノックアウトマウス変異体は、異常が胎生の非常に後期に生じるため体重・形態形成などは野生型と全く変わらない。従って、胎生後期に種々の呼吸抑制剤を投与する条件を検討するなどにより、治療法の検討をうことができる。

#### E. 結論

CRE-BP1 ノックアウトマウスは出生直後に肺に空気が入らず、ヒト新生児の死因の大きな割合を占める胎便吸引症候群と同様の症状によって生後すぐに死亡することから、この変異マウスはヒト胎便吸引症候群のモデル動物と成り得る。本研究において、CRE-BP1 変異マウスでは胎盤のトロホブラスト細胞の増殖に重要なPDGF受容体遺伝子の発現レベルが低下し、胎盤の形成が不全となり、その結果胎児が低酸素状態となり、胎便を含む羊水を吸引することが明らかにされた。ヒトの胎便吸引症候群の中には、CRE-BP1 ノックアウトマウスと同様なメカニズムにより生じる症例がある可能性がある。従って、本研究において得られた成果はこのような疾患の診断・治療に役立つと考えられる。CRE-BP1 ノックアウトマウス変異体は、異常が胎生の非常に後期に生じるため体重・形態形成などは野生型と全く変わらない。従って、胎生後期に種々の呼吸抑制剤を投与する条件を検討するなどにより、治療法の検討をうことができる。一方、CRE-BP1と構造の類似する2つの転写因子CRE-BPa, ATF-aの欠損マウスの作製・解析も行った。CRE-BPa KO マウスは胎生17日目から出生後24時間

の間に死亡した。一連の病理学的解析の結果、胎盤および肺の形成に異常があり、その結果呼吸不全のため致死となることが明らかとなった。また、ATFa KO マウスは正常なマウスと一見変わらないが、一連の行動解析を行った結果、音に対して異常に反応することが突き止められた。そして、CRE-BP1ファミリー全体の生理的役割を解析するため、CRE-BP1, CRE-BPa, ATF-a の3種類の遺伝子のトリプルノックアウトマウスを作製・解析した。その結果、胎盤・肺の形成が著しい異常が観察され、胎児は11日目の段階で致死となった。これらの結果から、CRE-BP1ファミリーの3つのメンバーは胎盤・肺の形成において、重要な役割を果たしていることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Sano, Y., Tokitou, F., Dai, P., Maekawa, T., Yamamoto, T. & Ishii, S. (1998). CBP alleviates the intramolecular inhibition of ATF-2 function. *J. Biol. Chem.* 273, 29098-29105.

Tokitou, F., Nomura, T., Khan, M. M., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Yasukawa, T., Kohno, I. & Ishii, S. (1998). Viral-Ski inhibits retinoblastoma protein-mediated transcriptional repression in a dominant negative fashion. *J. Biol. Chem.* 274, 4485-4488.

Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M. & Ishii, S. (1999). Sonic hedgehog-induced activation of the *Gli1* promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* 274, 8143-8152.

Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. & Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common

nuclear target of Smad and TAK1 pathways in TGF- $\beta$  signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 8949-8957.

Maekawa, T., Bernier, F., Sato, M., Nomura, S., Singh, M., Inoue, Y., Tokunaga, T., Imai, H., Yokoyama, M., Reimold, A., Glimcher, L. H. & Ishii, S. (1999). Mouse ATF-2 null mutants display features of severe type of meconium aspiration syndrome. *J. Biol. Chem.* in press

### 2. 学会発表

佐野佑治、原田純、田代茂樹、後藤良子、前川利男、石井俊輔：TGF- $\beta$  のシグナル伝達系におけるCRE-BP1/ATF2 の機能解析、第21回日本分子生物学会年会

前川利男、Francois Bernier、佐藤宗彦、野村慎太郎、Mandavi Singh、井上芳郎、小倉博雄、徳永智之、今井裕、横山峰介、秦野修、相沢慎一、石井俊輔：CRE結合蛋白質 CRE-BP1 遺伝子ファミリー CRE-BP1 (ATF2)、CRE-BPa、ATFa 欠損マウスにおける呼吸不全、第21回日本分子生物学会年会

戴平、秋丸裕司、田中康範、前川利男、中福雅人、石井俊輔：Shhシグナル伝達におけるGLI3の役割、第21回日本分子生物学会年会

田中康範、成瀬一郎、前川利男、石井俊輔：コアクティベーターCBPの機能解析、第21回日本分子生物学会年会

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

19980045

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌の時は雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
J. Biol. Chem. 273, 29098-29105 CBP alleviates the intramolecular inhibition of ATF-2 function	1998年10月12日	Cadmus Press	佐野佑治、時任文乃 戴平、前川利男 山本雅、石井俊輔
J. Biol. Chem. 274, 8143-8152 Sonic hedgehog-induced activation of the <i>Gli1</i> promoter is mediated by GLI3	1999年2月10日	Cadmus Press	戴平、秋丸裕司 田中康範、前川利男 中福雅人、石井俊輔
J. Biol. Chem. 274, 8949-8957 ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in TGF- $\beta$ signaling	1999年3月1日	Cadmus Press	佐野佑治、原田純 後藤良子、前川利男 石井俊輔