

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09980

研究課題名(和文)先天性発達障害モワットウィルソン症候群の病態形成の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of Mowat-Wilson syndrome using model mouse

研究代表者

高木 豪 (Takagi, Tsuyoshi)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・主任研究員

研究者番号：70300879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は症候群型の知的障害であるモワットウィルソン症候群の病態形成のメカニズムの理解するために、我々が独自に開発したモデルマウスであるde novo Sip1ヘテロ遺伝子変異マウスを用い解析を行うものである。本モデルマウスの初代大脳皮質神経細胞を使って電気生理学的な解析を行ったところ、mEPSCのamplitudeの低下を見出し、加えてトランスクリプトーム解析を行いモデルマウスでの遺伝子発現の変化を網羅的に同定した。モワットウィルソン症候群が転写因子ZEB2の遺伝子変異により生じることから、本症候群の病態は遺伝子発現の変化を介したシナプス機能の変化が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究のように知的障害や自閉症スペクトラム障害を含む神経発達障害がどのような分子メカニズムの異常により生じるのかを明らかにしてゆくことは、将来の治療や症状緩和の手法開発の基盤となりうる。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to understand how the symptom of Mowat-Wilson syndrome, one of syndromic intellectual disabilities, is developed, using with the model mouse we produced. I found that primary cortical neuron from the model mice showed lowered amplitude of mEPSC. Furthermore, we performed transcriptosome analysis using the model neuron and found the expression change of mRNA comprehensively. Because Mowat-Wilson syndrome is caused by the mutation of ZEB2 gene, which codes transcription factor, these results implicate that the symptom of Mowat-Wilson syndrome would be caused by the change of synaptic function via change of gene expression.

研究分野：小児科学

キーワード：Mowat-Wilson syndrome Zn finger transcription factor haploinsufficiency de novo mutation ZEB2

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

知的障害や自閉症スペクトラム障害を含む神経発達障害の原因となる遺伝子変異が次世代シーケンサーを用いた解析から近年、非常に多く見出されている。これらの原因遺伝子群の変異がどのようにして神経発達障害の発症に関わるのか明らかにすることは、神経発達障害の治療や症状改善の方法の開発に繋がる基盤ともなる。

症候群型の知的障害であるモワットウィルソン症候群は、私が所属してきた愛知県心身障害者コロニー(現愛知県医療療育総合センター)において設立当初の1970年代から同中央病院で未知の症候群型の知的障害の存在の疑いから長年にわたり症例が蓄積されてきた経緯があるものであり、また本症候群が転写因子 ZEB2(別名 Sip1)のハプロ不全により生じることも同発達障害研究所の遺伝学部の若松が2001年に明らかにした。一方、本症候群に対するモデルマウスを用いた解析は2000年代から試みられていたが、その解析は難航していた。その原因の一つは、本症候群のモデルマウスに相当する Zeb2 ヘテロ変異マウスが遺伝背景の影響を強く受けることであった。Zeb2 ヘテロ変異マウスは、クローズドコロニーの系統の一つである ICR の遺伝背景では系統維持が可能であったが、本症候群の診断の指標の一つである顔貌の変化が見られず、脳梁欠損を除き症候群の関連症状をほとんど示さなかった。他方、純系の C57BL/6 の遺伝背景では、Zeb2 ヘテロ変異マウスは戻し交配を行うと次第に系統維持が難しくなり、解析に用いることができなかった。

私は、C57BL/6 遺伝背景の Zeb2 ヘテロ変異マウスが本症候群のモデルマウスとしてより適切であるのではないかと考え、ヘテロ変異マウス自体の交配を経ずにモデルマウスを作るために Cre-LoxP を使い、精子に Zeb2 変異を導入するシステムを作製してきた。この精子 *de novo* 変異導入法は、成長遅延や疾患関連症状のために交配能力の低いハプロ不全型のモデルマウスの安定的な取得を可能にする汎用性のある手法である。本手法を用いて作製した C57BL/6 遺伝背景の Zeb2 ヘテロ変異マウスは、顔貌の変化を含めて本症候群に関連する症状を複数示すことをこれまでに見出してきた。

### 2. 研究の目的

我々が開発した精子 *de novo* 変異誘導法を使って作製したモワットウィルソン症候群のモデルマウスである C57BL/6 遺伝背景の Zeb2 ヘテロ変異マウスなどを用いた解析を行うことにより、本症候群の病態発症の分子メカニズムの一端を明らかにし、加えて本モデルマウスを使用して本症候群の症状緩和法の開発の糸口を掴むことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)モワットウィルソン症候群モデルマウス由来の初代神経細胞を用いた解析

1 本症候群のモデルマウスのニューロン細胞においてどのような変化が起きているのか調べるために、モデルマウス由来の大脳皮質由来の初代神経細胞を用い電気生理学的なパッチクランプの手法で mEPSC を調べ、異常があるかどうか検討する。

2 mEPSC 測定時と同じ条件で培養したモデルマウス由来の初代神経細胞から RNA を回収し、マイクロアレー解析を行うことにより、モデルマウスの初代ニューロンでどのような遺伝子発現の変化が生じているのか網羅的に検討する。

#### (2)モワットウィルソン症候群モデルマウスを用いた電気生理学的解析

本症候群は重度知的障害を伴うため、モデルマウスにおいて学習や記憶の基礎となる LTP の現象に異常があるかどうかを検討する。具体的にはモデルマウスの脳スライスを用いて海馬における LTP の誘導について調べる。

#### (3) 大脳興奮性ニューロンにおける Zeb2 機能とモワットウィルソン症候群の症状発症の関連性の検討

これまでの解析から Zeb2 は大脳の興奮性及び抑制性の両ニューロンにおいて発現、機能していることが明らかになっている。そこで、それぞれのニューロンにおける Zeb2 の機能低下がモワットウィルソン症候群としての全体症状にどのように関わっているのか明らかにするために、本研究では大脳の興奮性ニューロンでのみ Zeb2 の発現の低下のみられる Emx1 Cre Zeb2 +/flox マウスを用いて行動実験を中心にした解析を行う。

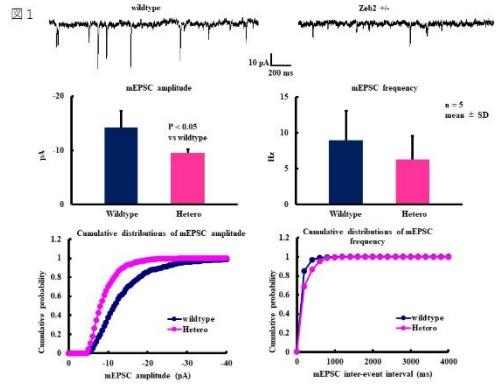
#### (4)モデルマウスを用いた症状改善の候補薬剤の投与効果の検討

Zeb2 は DNA 結合型の転写因子であり、細胞内においてヒストンなどに対してエピジェネティックな制御を行う酵素群と複合体を形成して、分子モジュールとして働くことが予想されている。そのため、本分子モジュールの量的低下が本症候群の発症に大きく関わると考えられる。そこで、本分子モジュールの量的低下をその酵素群の機能向上により補うために薬剤投与をモデルマウスに対して行い、その効果を行動実験により評価する。具体的には Zeb2 を含む CtBP 複合体にはヒストン脱アセチル化酵素の HDAC1/2 が含まれるので、その逆の働きをする HAT の活性を阻害する効果のあるポリフェノールの一つ、Crucumin を妊娠中の母マウスに腹腔内投与することにより行う。

#### 4. 研究成果

(1)モワットウィルソン症候群モデルマウス由来の初代神経細胞を用いた解析

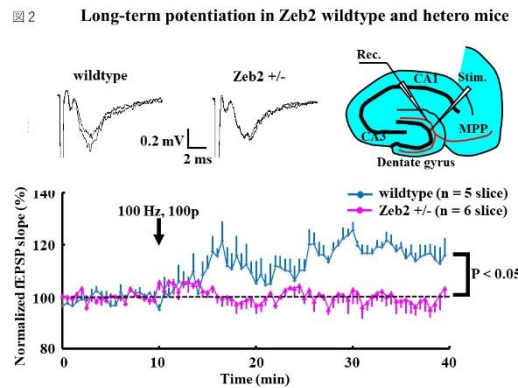
1 E16.5 のモデル及びコントロールマウス由来の大脳皮質初代神経細胞を 13 日間培養後に mEPSC を測定したところ、モデルマウスにおいて mEPSC の頻度に変化は見られなかったが、amplitude の低下が観察された(図 1)。



2 1と同じ培養条件の細胞から RNA を回収してマイクロアレー解析(それぞれ N=3)を行ったところ、モデルマウス由来の初代神経細胞で発現が上昇していた遺伝子が 225 遺伝子(コントロールに比べ発現 1.3 倍以上)、低下していた遺伝子が 44 遺伝子(コントロールに比べ発現 0.7 倍以下)見つかった。

(2)モワットウィルソン症候群モデルマウスを用いた電気生理学的解析

3 週令のモデルマウス由来の脳スライスを用いて海馬においてテタヌ刺激を行い、誘導される LTP を電気生理学的にフィールドポテンシャルとして測定を行ったところ、コントロールマウスで誘導された LTP がモデルマウスでは誘導されなかった(図 2)。



(3) 大脳興奮性ニューロンにおける Zeb2 機能とモワットウィルソン症候群の症状発症の関連性の検討

これまでの本モデルマウスを用いた行動学的な解析から、本モデルマウスは自発行動量の低下、不安様行動の増加などの症状を示すことを明らかにしてきた。今回、大脳の興奮性ニューロンのみで Zeb2 ヘテロ変異を持つ Emx1 Cre Zeb2 +/-flox マウスを作製し、その行動学的な解析を行ったところ興奮性ニューロン特異的な Zeb2 変異マウスは、モデルマウスと異なり、自発行動の低下は観察されず(図 3)、また不安様行動テストでは、モデルマウスとは逆にコントロールマウスに比べ不安様行動の低下が観察された。

図 3

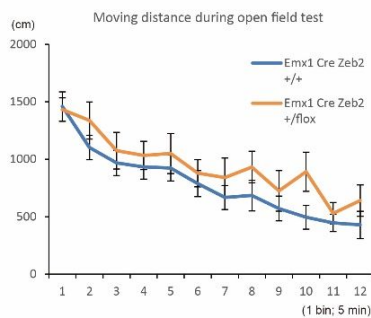
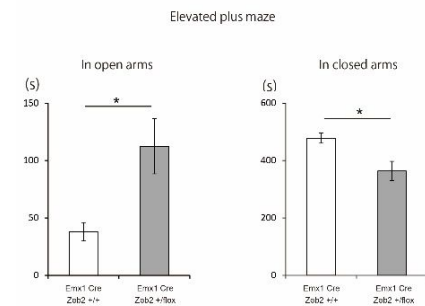


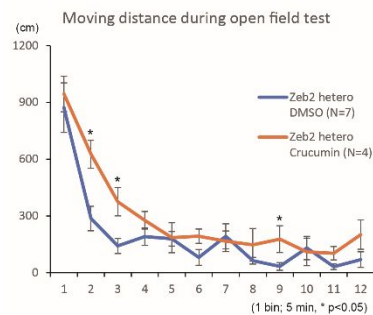
図 4



(4)モデルマウスを用いた症状改善の候補薬剤の投与効果の検討

本症候群の症状緩和法の開発に向けて、候補薬剤の Curcumin を母体を通して胎生期のモデルマウスに投与し、成獣化後にコントロールとして DMSO を投与したモデルマウスと共にその自発行動量の測定を行った。実験はトータル 1 時間の系、5 分ごとの移動距離を計測するもので、その結果、試験開始直後の急速な自発行動量の低下が薬剤により緩和されている結果を得た。

図 5



(5)今回の研究結果の総括と今後の展望

一連の今回の実験により、本症候群のモデルマウスにおいて症状発症の原因に関連するとと思われる電気生理学的な異常を *in vivo*, *in vitro* の両方においてを見出した。実際、*in vitro* の状況でモデルマウスの遺伝子発現プロファイルが変化していたため、この電気生理学的な変化は Zeb2 の転写因子としての機能異常が引き起こしていると考えられた。

興奮性ニューロン特異的な Zeb2 変異マウスは、モデルマウスの有する症候群関連症状を示さ

ない、または逆の結果を示すという結果になった。このことは、本症候群の症状は脳の興奮性ニューロンという単一種のニューロンにおける Zeb2 の異常により引き起こされるのではなく、抑制性ニューロンでの Zeb2 の異常、または興奮性、抑制性の両ニューロンにおける Zeb2 の異常の相互作用により生じる可能性が示唆された。

知的障害の症状緩和法の開発は困難な課題であるが、今回、胎児期からの薬剤投与実験で、一部ではあるが症状緩和が見られた結果の意義は大きい。今後、よりさまざまな関連薬剤の使用や投与時期の検討により、本証拠群の更なる症状緩和の可能性を検討し、将来的な臨床サイドへのフィードバックを目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kobayashi Katsunori, Takagi Tsuyoshi, Ishii Shunsuke, Suzuki Hidenori, Miyakawa Tsuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Attenuated bidirectional short-term synaptic plasticity in the dentate gyrus of Schnurri-2 knockout mice, a model of schizophrenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 56-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1186/s13041-018-0400-9">https://doi.org/10.1186/s13041-018-0400-9</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakao Akito, Miyazaki Naoyuki, Ohira Koji, Hagihara Hideo, Takagi Tsuyoshi, Usuda Nobuteru, Ishii Shunsuke, Murata Kazuyoshi, Miyakawa Tsuyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Immature morphological properties in subcellular-scale structures in the dentate gyrus of Schnurri-2 knockout mice: a model for schizophrenia and intellectual disability	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 60-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1186/s13041-017-0339-2">https://doi.org/10.1186/s13041-017-0339-2</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hagihara Hideo, Catts Vibeke S, Katayama Yuta, Shoji Hirotaka, Takagi Tsuyoshi, Huang Freesia L, Nakao Akito, Mori Yasuo, Huang Kuo-Ping, Ishii Shunsuke, Graef Isabella A, Nakayama Keiichi I, Shannon Weickert Cynthia, Miyakawa Tsuyoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Decreased Brain pH as a Shared Endophenotype of Psychiatric Disorders	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 459 ~ 468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1038/npp.2017.167">https://doi.org/10.1038/npp.2017.167</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木豪、浅井真人、石井俊輔
2. 発表標題 De novo変異型Rubinstein-Taybi syndromeモデルマウスの行動学的解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsuyoshi Takagi
2. 発表標題 De novo変異Rubinstein-Taybi syndromeモデルマウスの作製
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木豪、浅井真人、石井俊輔
2. 発表標題 重度知的障害を伴うRubinstein-Taybi syndromeのde novo変異型モデルマウスを用いた解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知県医療療育総合センター 発達障害研究所 <a href="https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/index.htm">https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/index.htm</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考