

令和元年6月28日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10202

研究課題名(和文) ゲノム編集による自閉症モデルiPS細胞の作製と解析

研究課題名(英文) Establishing autism model cells by gene editing technology

研究代表者

中山 敦雄 (Nakayama, Atsuo)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・部長

研究者番号：50227964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(iPS細胞)作製技術により、脳機能障害での神経細胞解析が可能になった。しかし自閉症は症例ごとに遺伝学的原因と背景が多彩で、コントロールiPS細胞・誘導神経細胞と比較しても神経細胞の表現型の差が原因遺伝子に由来するのか遺伝学的背景の差に由来するかはわからない。我々は標準iPS細胞にゲノム編集で既知の自閉症原因遺伝子変異を導入し、コントロールと遺伝学的背景に差がない自閉症モデル細胞の作製を試みた。iPS細胞610B1株でNLGN4X遺伝子ノックアウトに成功したが、神経細胞への分化誘導が困難であった。別に2つのiPS細胞株で同様のノックアウトが完了しモデル細胞として解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症の原因遺伝子は200以上あると言われており、その変異一つ一つがどのような神経細胞の異常を引き起こすのかは必ずしも明らかになっていない。個々の遺伝子の機能を明らかにするためには、遺伝学的背景を揃えた上での神経細胞での比較検討が必要となる。今回標準iPS細胞にゲノム編集の技術で自閉症原因遺伝子の変異を引き起こしたiPS細胞のクローンが得られたことで、自閉症原因遺伝子の機能障害による神経細胞異常を詳細に明らかにすることが可能となる。さらにはその異常を改善するための薬物開発に利用することも可能となる。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells (iPSCs) enabled detailed analyses of human neurons in CNS disorders. However, due to complex genetic abnormalities found in ASD patients, and due to various genetic backgrounds of the human species, the differences between neurons derived from patients' iPSCs and those from control iPSCs can not be readily regarded as a result of genetic alterations causing ASD. Applying genome editing technique, we introduced a single ASD gene disruption in iPSCs, otherwise the identical genetic background with parental iPSCs. We established two independent 610B1 iPSC clones with the NLGN4X gene disruptions. Both clones as well as parental 610B1 cells could not be differentiated to neurons, even by a couple of modified differentiation protocols. Thus, we could not compare neuronal phenotypes of ASD model iPSCs with those of parental iPSCs. We then made NLGN4X KO clones of two other iPSCs that have high efficacy of neuronal differentiation. Analyses are in progress.

研究分野：病理学

キーワード：iPS細胞 ゲノム編集 自閉症 ヒト神経細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症の原因は極めて多様であり、その原因遺伝子だけでも200を数えるに至る。さらに患者それぞれでも単一遺伝子の機能消失変異やコピー数異常に起因するもの、複数の遺伝子や染色体領域の変化に起因するものなどがある。さらに直接は原因にならないが、他の遺伝子変異等による発症に背景となる遺伝子多型が影響する。このため、自閉症での神経細胞機能の異常を明らかにするために自閉症者由来の iPS 細胞を利用しようとしても、適切な比較対象の選択が非常に困難となる。これを回避するためには有意で確実な情報が得られるだけの、極めて多数のサンプル同士(自閉症群と定型発達者群)の比較が必要となる。一方で臨床遺伝学の進歩により自閉症の原因となる単一遺伝子が明らかになっているが、その機能喪失による神経細胞の異常は必ずしも明らかになっておらず、自閉症状改善のため治療法を探索する基盤は十分整っているとは言えない。

### 2. 研究の目的

2003年にニューロリギン(NLGN)4XおよびNLGN3が、最初の自閉症単一原因遺伝子として報告されたが、その異常がどのような神経細胞の機能不全を引き起こすのかは未だに不明である。本研究課題ではNLGN4Xの機能消失がどのように神経細胞機能に影響を与えるかを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

すでに健常者から作製されている iPS 細胞に、ゲノム編集によりNLGN4Xの機能消失変異を導入することにより、自閉症モデル iPS 細胞を作製する。これを分散培養系で神経細胞に分化誘導したもの、浮遊培養でmini-brainとしたもの、さらに可能であればマウス胎児脳へ移植してin vivoで分化させたもの、等を、元のNLGN4X機能消失のないiPS細胞からの分化誘導神経細胞とを形態学的、生化学的に比較、検討する計画とした。

### 4. 研究成果

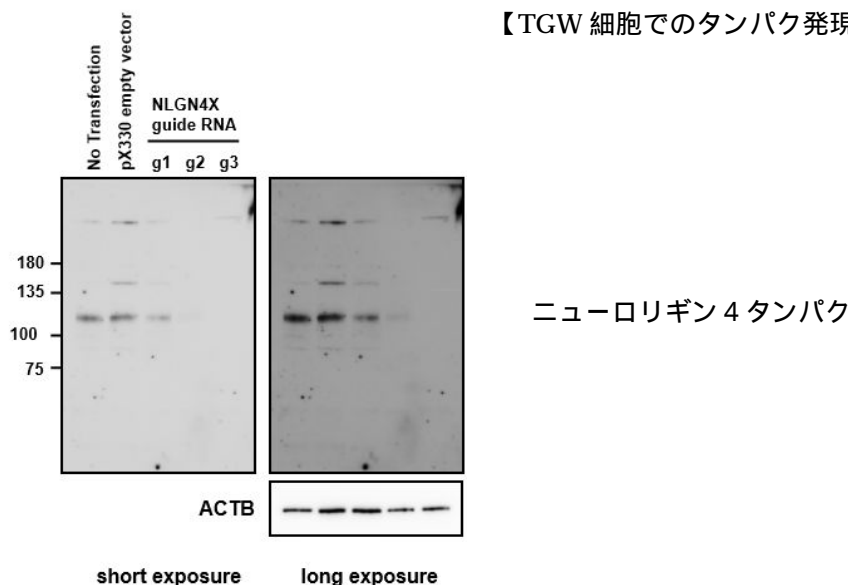
#### 1) NLGN4Xゲノム編集ガイドRNAの作製とTGW細胞(神経芽腫株)での検証

NLGN4X 遺伝子の exon2 にある翻訳開始メチオニン下流に以下の3種のguideRNA(gRNA)をデザインし、まずはニューロリギン4を発現する神経芽腫細胞TGWを用いて、ノックアウト効率の検証を行った。

#### 【NLGN4X mRNA(V.1)塩基配列上でのgRNA標的配列】

```
421 ccacatcact gggacagctg tggatgtgga a tgccagatttg aaccatgtca cggccccagg
                                     翻訳開始コドン
481 gactgctatg gcttcct ttg ttgttcaccc cggtctg ggt catgt taaac tccaatgtcc
                                     sgRNA#3          sgRNA#1          sgRNA#2
541 tcctgtgggtt aactgctctt gccatcaagt tcaccctcat tgacagccaa gcacagtatc
```

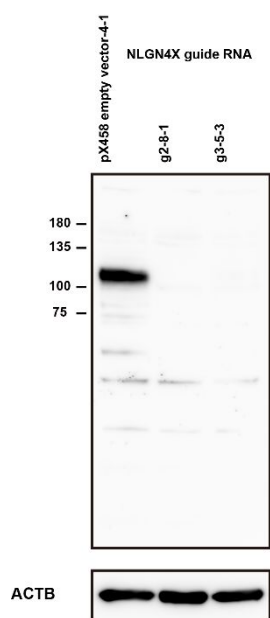
#### 【TGW細胞でのタンパク発現抑制】



その結果、デザインしたガイド RNA のうち、gRNA#3 が最も遺伝子発現抑制効果が強く、次いで gRNA#2 が強かった。これらが遺伝子ノックアウト効率が低いと判断し、iPS 細胞での遺伝子ノックアウト実験に適用した。

## 2) iPS 細胞 610B1 株での NLGN4X ノックアウト実験

NLGN4X が X 染色体上にあることから、男性由来の標準 iPS 細胞 610B1 株を入手し、上記の gRNA#2 および#3 を用いて NLGN4X ノックアウト実験を実施した。

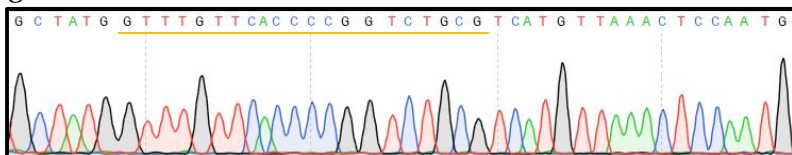


【得られたクローンでタンパク発現抑制】

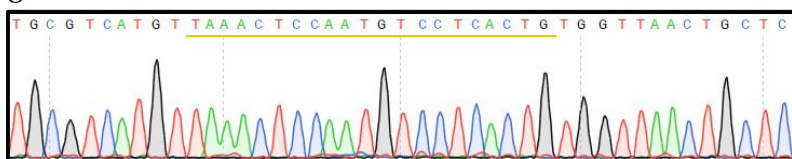
gRNA#2 を導入して得られたクローン g2-8-1 と gRNA#3 を導入して得られたクローン g3-5-3 において、ニューロリギン 4 タンパクの強い発現抑制が確認された。

### 【得られたクローンでのゲノム DNA 塩基配列解析】

#### g3-5-3 クローン



#### g2-8-1 クローン



### 【NLGN4X mRNA(V.1)塩基配列と比較した核クローンの塩基配列変化】

491 gcttcctcttg ttgttcaccc cggctctggt catgttaaac tccaatgtcc tcctgtggtt

sgRNA#3

sgRNA#2

gTtt----- --gttcaccc cggctctgctg

taaac tccaatgtcc tcActg

g3-5-3 クローン

g2-8-1 クローン

ガイド RNA 標的の近傍での 8 塩基脱落

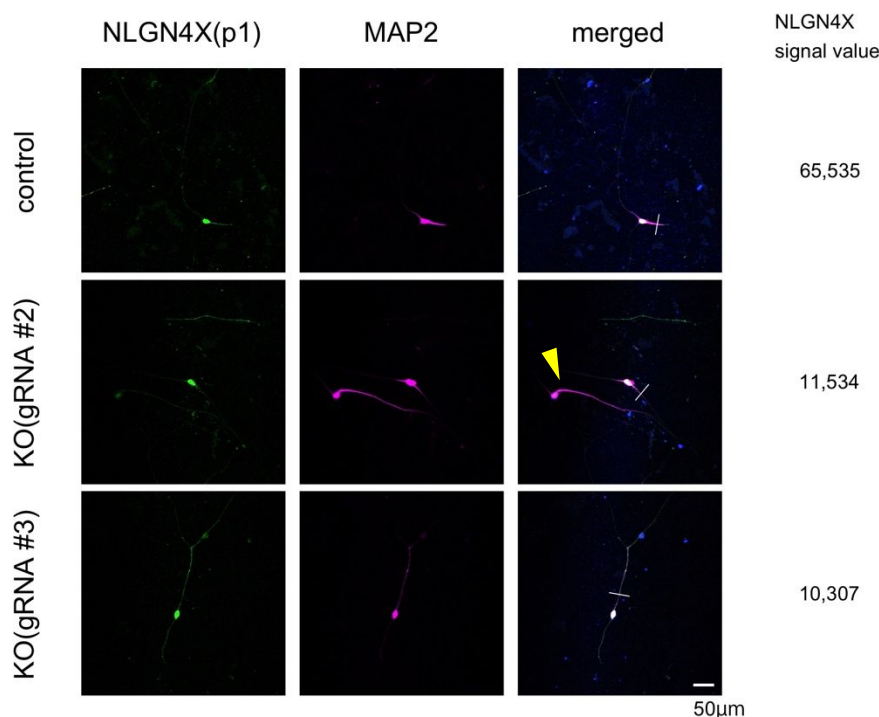
ガイド RNA 標的内での 1 塩基挿入

いずれのクローンも NLGN4X 遺伝子の改変により、premature stop codon が出現する形で遺伝子ノックアウトが達成されていた。

### 3) 610B1NLGN4XKO 株 g2-8-1 と g3-5-3 由来神経細胞でのニューロリジン 4 発現

親株である iPS 細胞 610B1 が長期培養による神経細胞への分化誘導効率が低かったため、ロゼッタ形成をスキップさせる直接神経分化誘導法(Neuron. 2013 June 5; 78(5): 785–798)により神経細胞へ分化させた g2-8-1(KOgRNA#2)、および g3-5-3(KOgRNA#3)iPS クローンをニューロリジン 4 に対する抗体 (p1) おおび MAP2 に対する抗体で染色した。その結果、MAP2 陽性 (マゼンダ) の神経細胞に分化したノックアウトクローンでもニューロリジン 4 の発現 (グリーン) が観察された。ただし、そのシグナル強度は親株 610B1 の 1 / 6 程度に減弱していた (右端の NLGN4X signal value)。またニューロリジン 4 のシグナルがほぼ検出されない神経細胞 (黄色矢頭) も認められた。

細胞染色に利用した p1 抗体は我々の研究室で作製され、ニューロリジン 4 に対する特異性が高くニューロリジン 1 ~ 3 とは交差反応しないことを確認している。ただし Y 染色体上にある NLGN4Y から転写・翻訳されるタンパクには反応するため、NLGN4X のノックアウトにより代償的に NLGN4Y からの遺伝子発現が起きている可能性が考えられた。また p1 抗体がニューロリジン 4 タンパク C 末に近い膜貫通領域近傍部を認識するために、今回ノックアウトした exon2 よりも下流から転写される非全長タンパクが発現している可能性も否定できなかった。



### 4) まとめ

本研究課題では、想定した研究期間 3 年の間にニューロリジン 4 の発現を確実に消失させたと言える神経細胞モデルの完成には至らなかった。ただし iPS 細胞の段階ではゲノム編集による改変で、全長型ニューロリジン 4 の発現はほぼ消失できていた。神経細胞に分化させた時の細胞レベルでのニューロリジン 4 シグナル検出に関しては、上記のような解釈が考えられたため、現在その可能性を検証するための研究を継続している。さらに当初選んだ iPS 細胞株 610B1 が必ずしも神経細胞への分化誘導実験に適さなかったため、神経細胞への分化効率が高い RIKEN-12A および WTC-11 といった iPS 細胞株を新たに入手し、改めてゲノム編集を実施している。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Fukada M., Yamada K., Eda S., Inoue K., Ohba C., Matsuzono N., Saitsu H., Nakayama A. Identification of novel compound heterozygous mutations in ACO2 in a patient with progressive cerebral and cerebellar atrophy. Mol Genet Genomic Med 2019, doi: 10.1002/mgg3.698 [EPIB ahead of print]

2. Shibata A., Machida J., Yamaguchi S., Kimura M., Tatematsu T., Miyachi H., Nakayama A., Shimozato K., Tokita Y. Identification of Nuclear Localization Signals in the Human Homeoprotein, MSX1. *Biochem Cell Biol* 2018, 96(4), 483-489. doi: 10.1139/bcb-2017-0263

3. Machida J., Goto H., Tatematsu T., Shibata A., Miyachi H., Takahashi K., Izumi H., Nakayama A., Shimozato K., Tokita Y. WNT10A variants isolated from Japanese patients with congenital tooth agenesis. *Hum Genome Var.* 2017 Nov 9;4:17047. doi: 10.1038/hgv.2017.47

4. Fukada M., Nakayama A., Mamiya T., Yao TP., Kawaguchi Y. Dopaminergic abnormalities in Hdac6-deficient mice. *Neuropharmacology* 2016, 110(PtA), 470-9, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.018

5. Shibata A., Machida J., Yamaguchi S., Kimura M., Tatematsu T., Miyachi H., Matsushita M., Kitoh H., Ishiguro N., Nakayama A., Higashi Y., Shimozato K., Tokita Y. Characterisation of novel RUNX2 mutation with alanine tract expansion from Japanese cleidocranial dysplasia patient. *Mutagenesis* 2016, 31(1), 61-7, doi: 10.1093/mutage/gev-57

〔学会発表〕(計 3件)

松木亨、飯尾明生、上田昌史、戸谷明恵、中山敦雄  
Stk25 and MS act on neuronal polarization and migration in a compensation manner.  
第41回日本神経科学大会 (2018年7月26日～29日)

川口禎晴、深田齊秀、竹島京子、中山敦雄  
自閉症関連因子 TSC2 の可逆的アセチル化による機能制御  
第41回日本神経科学大会 (2018年7月26日～29日)

Masahide Ueda, Tohru Matsuki, Shima Eda, Atsuo Nakayama  
SON haploinsufficiency, which is causing an intellectual disability, dysregulates neuronal migration in the brain of mouse embryo  
第41回日本分子生物学年会 (2018年11月28日～30日)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：松木亨

ローマ字氏名：Tohru Matsuki

所属研究機関名：愛知県医療療育総合センター（旧：愛知県心身障害者コロニー）発達障害研究所

部局名：細胞病態研究部（旧：発生障害学部）

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：90332329

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。