

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：83902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16292

研究課題名(和文)知的障害の原因となるSONハプロ不全の分子機構解明

研究課題名(英文)The elucidation of the cellular pathological mechanism of ZTTK syndrome, an intellectual disability, which is caused by SON haploinsufficiency

研究代表者

上田 昌史(Ueda, Masashi)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・リサーチレジデント

研究者番号：90791541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ZTTK症候群は21番染色体に局在する遺伝子SONの変異により生じる知的障害であり、これまでに国内外で31例の患者が報告されている。患者とその両親を対象とした遺伝子配列解析の結果SONの遺伝子変異型は明らかになりつつある。しかし遺伝子変異から知的障害発症に至るメカニズムは不明のままであり、正常な脳形成でのSON蛋白質の役割は研究されていなかった。

本研究では胎生期、生後発達期のマウス脳を対象として脳形成でのSONの役割を解析した。その結果、SON蛋白質の量を人為的に抑えると、(正常な脳形成にとって重要な)神経細胞移動や神経細胞結合部(シナプス)の形成が障害されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により胎生期のSON蛋白質の量的低下が、神経細胞移動やシナプス形成の障害を引き起こす事で知的障害をもたらす可能性が強く示された。またヒトSON蛋白質を補充することによりこれらの細胞障害が改善されるという結果は、ZTTK症候群の治療戦略として薬剤や遺伝子治療によるSON蛋白質量の是正が有効であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：This study has been carried out to clarify a role of SON, a causing gene of ZTTK syndrome, in the brain formation during development. To examine the effects of SON-knockdown on mammalian brain development, we electroporated the shRNA constructs into the lateral ventricles of mouse brain at embryonic day 14 (E14). Neural progenitor cells in a SON-KD state did not effectively migrate to upper cortical plate at E18. Interestingly, at postnatal day 60, the numbers of the dendritic spines of neurons in a SON-KD state were reduced compared with those in normal state. These impairments were rescued by overexpression of human full-length SON, but not with a disease-related truncation mutant, lacking most functional domains.

These data suggest that sufficient SON protein is critical to cortical neuronal migration and dendritic spine formations during development in mouse brain.

研究分野：神経疾患における細胞病態学

キーワード：ZTTK症候群 SONハプロ不全 知的障害 神経細胞移動 樹状突起スパイン形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

スプライシング制御因子 SON と知的障害との関連性

SON は、遺伝子の転写において RNA スプライシングに関わる serine and arginine proteins (SR 蛋白質) の一つである。SR 蛋白質ファミリーは後生動物において広く保存されており、その役割は転写因子としての遺伝子発現制御、RNA スプライシングを初め、mRNA エクスポート、ゲノムの安定化、ナンセンス変異依存性の mRNA 分解、翻訳など多岐にわたっている。

2016 年に研究者の所属する発達障害研究所隣接の愛知県心身障害者コロニー中央病院(現:愛知県医療療育総合センター中央病院)において、知的障害、心疾患、部分的な顔面・四肢の形成異常を有する一患児に SON 遺伝子の変異が見いだされた(Takenouchi T, et al., Am J Med Genet. 2016)。同様の症例が他グループからも報告されており(Zhu X, et al., Genet Med. 2015.)、SON の変異がこの症候性知的障害の原因であると考えられた。これらの症例は共に *de novo* のミスセンス変異を有する SON のハプロ不全であり、両アレルによる十分量の SON の発現が脳の正常発達に必要であることを示唆する。さらに Kim らにより、SON ハプロ不全を原因とする同様の知的障害者 20 例が報告され、そのほとんどに脳回異常や脳室拡大といった脳形成不全を伴うことも示されている(Kim JH et al., Am J Hum Genet. 2016)。その後も同様の症例が相次ぎ現在までに 31 例の患者が報告され、この SON 遺伝子変異によって引き起こされる発達障害は ZTTK(Zhu-Tokita-Takenouchi-Kim)症候群と呼ばれるに至った。

SON による細胞骨格関連分子の発現制御

先行研究によって、SON ノックダウン細胞は細胞分裂時に紡錘体形成異常と中心体不分離を示し、分裂期で細胞周期が停止することが明らかにされていた(Ahn EY, et al., Mol. Cell 2011)。近年では γ -tubulin などの細胞移動時に働く細胞骨格関連分子 mRNA のスプライシングに、SON が必須であることが解明されている。一方、臨床症例の解析においても、SON ハプロ不全の知的障害者では、 γ -tubulin の発現が両親に比べ有意に減少している事が報告されている(Kim JH et al., Am J Hum Genet. 2016)。その他に有意な発現減少を示す分子として、細胞膜の糖タンパク質とアクチン骨格を結び、樹状突起の形態制御に関与する Filamin A (FLNA) などがある(Zhang L et al., Neuron 2014, Kim JH et al., Am J Hum Genet. 2016)。これら γ -tubulin や FLNA はその遺伝子変異がヒト脳皮質形成不全の原因となることが知られており(Poirier K et al., Nat Genet. 2013, Fox JW et al., Neuron 1998)、SON ハプロ不全知的障害者での脳形成不全に関与していることが強く推測される。

しかし、中枢神経系の組織形成・シナプス機能を指標とした SON 機能解析は成されておらず不明のままであった。よって本疾患における知的障害発症機構の解明には、SON 機能についての詳細な理解が必要であると考えられた。

2. 研究の目的

2 - (1) SON の大脳形成に果たす役割

SON ハプロ不全知的障害者の大多数に大脳の構造異常が生じるメカニズムを解明するために、マウス脳形成期(胎生 14.5 日目: E14.5)の神経前駆細胞で SON をノックダウンし、大脳構造異常のモデルとする。複数の shRNA のノックダウン効率を検討した上で、神経前駆細胞の細胞移動への影響を解析する。これにより SON ハプロ不全での大脳形成障害が移動のどの時期の異常で引き起こされるかを明らかにする。

2 - (2) 神経細胞の成熟に SON が果たす役割

SON ハプロ不全の知的障害者には一部ではあるが脳の構造異常が見いだされない者もある(Kim JH et al., Am J Hum Genet. 2016, Takenouchi T, et al., Am J Med Genet. 2016)。そのため、SON ハプロ不全による知的障害の背景には、脳形態や神経細胞形態の変化として顕われない神経ネットワーク形成異常が存在する可能性も考えられる。本研究では、特に(1)で行う SON ノックダウンによるマウス大脳構造異常や神経細胞の形態異常が見られなかった場合、この系で神経投射やシナプス形態を詳細に解析し、SON ハプロ不全が神経ネットワーク形成に影響を及ぼすか否かを明らかにする。具体的には、(1)の大脳構造異常モデルを利用し、*in vivo* において

SON の発現量低下が神経樹状突起シナプス形成へ果たす役割を、生後 60 日目(P60)で細胞形態を詳細に解析し、明らかにする。

3. 研究の方法

平成 29 年度

子宮内胎仔脳での SON ノックダウン実験系を確立し、SON ノックダウンが神経前駆細胞の移動に影響を及ぼすか否かを検討する。さらにヒトで見ついている SON の変異が実際に SON の機能不全を引き起こすかを確認する。

1) SON ノックダウンのための shRNA 作製

マウス脳での SON ノックダウン実験の準備として、適切なマウス培養細胞を選択し内在性 mouse SON に対して様々なノックダウン効果を示す複数の shRNA セットの確立を進める。ノックダウン効果は、SON を認識する抗体を用いたウエスタンブロットにより行うが、市販抗体が使用目的に合わない場合は、平行してポリクローナル抗体の作製を行う。

2) 神経前駆細胞での SON ノックダウンによる神経系譜細胞の移動および増殖の解析

確立した shRNA セットを用いて神経系譜細胞の移動および増殖への影響を検討する。具体的にはコントロールのスクランブル shRNA、50%程度、および 90%以上の SON 発現抑制効果を示す shRNA を in utero electroporation により、胎齢 14.5 日のマウス胎仔脳室帯に存在する神経前駆細胞に導入する。E18.5 で脳組織を採取し shRNA 導入細胞が発現する GFP をマーカーとして SON ノックダウン神経細胞が正常神経細胞と同様に皮質に移動しているかを解析する。

平成 30 年度以降

前年度の研究を継続すると共に、本年度以降は SON ハプロ不全が神経細胞の成長や機能へ関与する可能性を神経細胞の移動、神経ネットワーク、さらにレスキューの観点からの研究を遂行する。

1) 神経細胞の形態および細胞内構造解析

まず前年度と同様の実験方法により、マウス神経前駆細胞において SON ノックダウンを行うが、神経細胞の成長、発達状態を解析するため、E18.5 にエレクトロポレーション後、P60 で SON ノックダウン神経細胞のシナプスの形態や神経投射の状態について、主に免疫組織学的解析により明らかにする。

2) 全ての表現型におけるヒト SON のレスキュー

SON shRNA と同時に行うヒト正常型および疾患変異型 SON 過剰発現系実験を、上記計画で示した、神経細胞の移動、成長、ネットワーク解析実験に適応して行う事で、SON shRNA が示す表現型がそれぞれ改善されるかを検証する。

3) ヒト変異型 SON の機能不全の確認実験

知的障害の原因として見つかった SON の変異が実際に大脳形成障害の原因となっているのかを確認するため、正常および変異型の shRNA 抵抗性ヒト SON 発現コンストラクトを作製し、SON shRNA と同時に導入することで、表現型の回復がみられるか否か、またどの程度回復するかを解析する。

なお上記のマウス SON ノックダウン実験では、ノックダウン効率の高い shRNA も用いることで、ヒトとマウスでの遺伝子量低下に対する感受性の違いにより表現型が再現出来ない場合に対応している。

4. 研究成果

私は研究機関中、ZTTK 症候群の知的障害発症機構解明を目的として Son KD の胎仔期におけるマウス大脳皮質形態形成への影響を主に解析してきた。この間に特異性の高い抗 SON 抗体を作製し、ウエスタンブロット、免疫染色にて質の高い結果を得た。Son に対する 2 つの異なる shRNA ベクターを構築した後、これらをマウス胎仔 E14.5 脳室帯の神経前駆細胞に IUE により導入し内在性 Son KD による神経細胞移動への影響を検討した。その結果、2 つの shRNA を得ることができ、共に E18.5 の Son KD 細胞では lower cortical plate から upper cortical plate への移動が約 20%抑制されるという知見を得た。この Son KD による移動障害が部分的であるという結果

は、ZTTK 症候群患者で認められる大脳皮質形態異常が軽度であることと一致する。

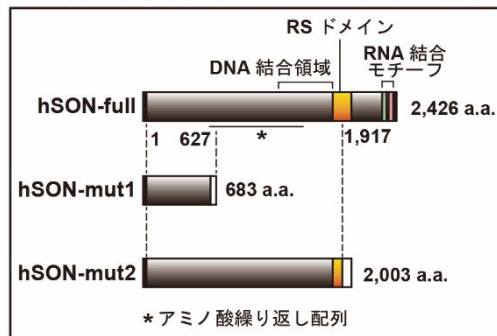
一方で、ZTTK 症候群の本邦初症例となった患児(Takenouchi T, et al., Am J Med Genet. 2016)を含め多くの症例では大脳皮質形態異常が見られず、SON ハプロ不全による、形態形成や細胞移動ではない神経細胞の機能への影響が考えられた。

そこで、Son KD による生後の神経細胞への影響を検討することにした。E14.5 で IUE を行い、P60 の大脳皮質 1 層に到達している細胞を解析したところ Son KD された錐体細胞では樹状突起スパイン密度が正常コントロールに比べ約 30%減少するという興味深い知見を得た。樹状突起スパインの形成不全は一般に知的障害患者でも強く示唆されているため(Purpura DP, Science, 1974)、ZTTK 症候群における知的障害発症機構としてシナプス形成不全が強く示唆される。

また Son KD による胎仔期の細胞移動障害、生後の樹状突起スパイン形成障害は共に shRNA 抵抗性ヒト正常型 SON (図:hSON-full)の過剰発現によってレスキューされたため、これらの障害がマウス内在性 SON によって引き起こされた表現型であることが確認された。興味深いことに疾患型 SON 過剰発現によるレスキューでは変異型によって結果が異なっていた。

つまり SON の機能ドメインの多くを欠損した蛋白質 (図:hSON-mut1)の過剰発現ではレスキューされなかったが、RNA 結合モチーフと RS ドメインの一部を含んだ C 末端のみ欠損した蛋白質(図:hSON-mut2)の過剰発現ではレスキューされた。この結果は、SON 蛋白質が胎仔期の細胞移動、生後の樹状突起スパイン形成を制御するのに DNA 結合領域が重要であることを示唆している。またこれらの結果は、hSON-mut1 をコードする変異が神経発達において機能喪失型変異であることを示しているが、hSON-mut2 をコードする

図：正常型・疾患変異型ヒト SON 蛋白質の概略図



する変異は、hSON-full と同等の機能を維持している事を示している。Kim らは、いくつかの変異型 SON mRNA および蛋白質量が実際に患者の末梢血単核細胞において低下していることを報告している(Kim JH et al., Am J Hum Genet. 2016)。このため ZTTK 症候群で見られる最も頻度が高い変異によってコードされる hSONm2 は、ナンセンス変異介在性分解(nonsense-mediated decay: NMD)を受け、患者の脳で発現しない事が強く示唆される。よって薬剤による NMD 阻害療法は大部分の ZTTK 症候群患者に有効である可能性がある。

発生学の観点からも、SON ハプロ不全が神経発生にもたらす影響は国内・国外含めほとんど解析されておらず、son KD によりゼブラフィッシュで頭部形成障害、脊髄奇形が誘導されることが報告されるに留まっていた(Kim JH et al., Am J Hum Genet. 2016)。私が期間中に得た、1) Son KD による胎仔期の細胞移動障害、2) Son KD による生後の樹状突起スパイン形成障害という結果は、哺乳類の神経発生における SON の機能を最初に示したものである。

これらの研究成果をまとめ第 49 回北米神経科学学会でポスター発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上田昌史, 松木 亨, 江田志磨, 中山敦雄
2. 発表標題 SON haploinsufficiency, a cause of human intellectual disabilities, results in dysregulated neuronal migration in developing mouse brain
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueda Masashi, Matsuki Tohru, Eda Shima, Nakayama Atsuo.
2. 発表標題 SON haploinsufficiency, a cause of human intellectual disabilities, affects the neuronal migrations and dendritic spine formations in the developing mouse brain
3. 学会等名 Society for Neuroscience (49th Annual Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞病態研究部門 愛知県医療療育総合センター発達障害研究所 https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hatatsu/departmen/index.html
--

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
---------------------------	-----------------------	----