

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02537

研究課題名(和文) 脳高次機能の発達と老化の制御に共通する分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism for brain development and aging

研究代表者

岡戸 晴生 (OKADO, Haruo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：60221842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：RP58ヘテロマウスを解析することで、このマウスがRP58ハプロ不全のモデルマウスになりうることを明らかにした。詳細に解析したところ、認知機能低下、逆転学習能低下、小脳学習能低下などの行動異常、脳梁後部欠損、グルタミン受容体発現低下、成熟スパインの成熟不全などが明らかになった。また、物体位置認識テスト、海馬組織解析により、早期に老化する所見が得られたため、早期脳老化モデルマウスになりうる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RP58ハプロ不全のモデルマウスを確立したことで、治療法の開発に役立つ可能性が見出された。すなわち、RP58の発現量の不足が認知機能低下を引き起こすことが実証され、その原因として、興奮性ニューロンの興奮性シナプスのスパイン成熟不全であることが示唆された。このことは、RP58ハプロ不全の認知機能障害の予防法、治療法の開発の糸口になると期待される。また、知的障害が老化の側面を有することが明らかになり、知的障害と老化研究が、相互連環を持ちながら研究できる基礎となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Analysis of the RP58 heterozygous mouse revealed that this mouse could be a model mouse for RP58 haploinsufficiency. Detailed analysis revealed behavioral abnormalities such as impaired cognitive function, reversal learning ability, and cerebellar learning ability, as well as posterior corpus callosum defects, reduced glutamine receptor expression, and maturation failure of the mature spine. In addition, an object location recognition test and hippocampal tissue analysis revealed findings of early aging, indicating that the mice could be used as a model for early brain aging.

研究分野：神経科学

キーワード：RP58 老化 認知機能

1. 研究開始当初の背景

RP58 (別名 ZNF238, Zfp238, ZBTB18) はクロマチンのリモデリングに関与することで知られる POK ファミリー (Siggs & Beutler, 2012) に属し、E-box 配列を内包する特異的な DNA 配列に結合して転写抑制活性を示す (Aoki et al. 1998)。我々は、RP58 は神経前駆細胞で弱く発現し、グルタミン酸ニューロンの発達期に強く発現すること、欠損マウスの解析から RP58 が大脳皮質形成に必須であること (Okado et al., *Dev Biol*, 2009)、神経幹細胞からの分化のために Id1~Id4 の転写を抑制し (Hirai et al., *EMBO J*, 2012)、ニューロンの放射状移動のために Ngn2、Rand2 の転写を抑制する (Ohtaka-Maruyama et al., *Cell Rep*, 2013) ことなどを明らかにした。しかし、RP58 は、その後も発現し続け、新たなターゲット遺伝子の転写を抑制し、未知の機能を果たしていることが推察される。

一方、RP58 ヘテロマウスは野生型と形態的には明確な違いはない。しかし、詳細な行動解析により、多動、作業記憶の低下がみられた。海馬スライスを用いた電気生理学的解析により、学習記憶の基盤と考えられる長期増強 LTP の軽度低下も見出している。ヒトの知的障害の原因遺伝子のひとつとして RP58 が認定された (DDD study *Nature* 2017)。このことは、RP58 の発現量が半減することが、高次脳機能の発達を引き起こす、ということを示している。ヒトの老化前頭葉において、RP58 が劇的に減少し、網羅的解析からは、RP58 が高齢者ヒト前頭葉の転写産物の中で、減少する上位三番目と報告された (表 1、Lu et al., *Nature*, 2004)。RP58 以外は Na チャネルなどの実働因子であり、転写制御因子である RP58 は稀有な存在である。ラット脳の網羅的解析でも、加齢海馬 CA1 領域の RP58 の発現減少が報告された (Kadish et al., 2009)。我々は、RP58 発現を、CamK2-CreER マウスを用いて若年成体時に前脳で誘導的に抑制したところ、恐怖条件付け記憶の減弱を示す予備的なデータを得た。さらに、物体位置認識テストの長期記憶を継続的に検出したところ、RP58 ヘテロマウスでは野生型と比較して、早期に減弱することを見出した。これらの実験は、RP58 減少が脳高次機能の低下を引き起こす、すなわち、加齢性脳障害の原因の一つであることを示唆する。以上のことから、知的障害と加齢性脳障害の両者に RP58 が深く関与し、両病態に共通の分子基盤があると着想し、RP58 の発現量が高次脳機能を規定しているという仮説を立てた。この仮説の実証に向け、因果関係を明らかにするために、RP58 の発現を時間空間的に制御することを試みる。そして、それらの系を用いて RP58 の量とその下流因子の関係を特定し、RP58 がどのように高次機能を制御するのかを明らかにする。

1. Voltage-gated Na channel IIb	-5.1
2. MAP1b	-4.9
3. RP58	-4.6
4. Rap2A	-3.8
5. 14-3-3z	-3.6
6. RAB6A	-3.5
6. Sortilin 1	-3.5
8. P35	-3.4
8. synaptobrevin1	-3.4
8. SynapsinIIb	-3.4
11. MAPKKK	-3.1

表1 ヒト前頭葉(死後)にて減少する転写産物 (Lu et al., *Nature* 2004)

2. 研究の目的

本研究は、脳の発達、機能獲得、その喪失を転写抑制因子 RP58 の量的変化を通じて、連続的に解明することに特徴がある。単なる並行現象ではなく、人為的発現変動法を駆使して、因果関係を明らかにし、RP58 の発現量が決定的に重要となる遺伝子カスケードを同定する。RP58 の発現量減少は知的障害を引き起こし、かつ RP58 の発現低下が加齢性脳障害の一因であることが証明された場合、脳高次機能の発達から退行に関わる同じ経路を、RP58 が制御することになる。発生研究は、即、老化研究になり得ることを示している。これまで、脳の発生に重要な転写因子は数多く報告されている。しかし、発生発達と老化の両者を制御する転写因子の研究はほとんどなく、独自性が高いと考える。この成果は医療的には、RP58 の補充、あるいはその下流産物の機能障害、もしくは RP58 発現低下の抑制法などが、知的障害、高次機能障害の予防法、治療法開発として発展しうることに加え、高次脳機能を向上させる研究の糸口となりうる点で、創造性に富む。

3. 研究の方法

本研究では、様々な RP58 ヘテロ欠損マウス、発現変動マウスを用いて、以下(1)-(3)を明らかにする。

(1) RP58 の発現量が決定的に重要な時期の特定

RP58 発現量と認知機能など、脳高次機能との相関、因果関係を明らかにする。特に発達期に RP58 を減少させた場合、認知機能は影響を受けるのか？成体時に減少させると、脳高次機能障害が惹起されるのか？RP58 を老齢期に減少させると、加齢性脳障害は増強するのか？これら3つが具体的な問いであり、その解決のために、RP58 ヘテロマウスに加えて FAST システム (Tanaka et al., 2010) により、RP58 発現 1/3 マウス、TetO/ tTS を用いて、RP58 の発現を時間空間的に制御(1-100%)することを試みる。tTS マウスのプロモータは CamK2 と actin を用いる。表現型は、行動学的、組織学的、電気生理学的(局所電場電位測定)に解析を行う。

(2) RP58 のターゲット因子の同定

成熟過程、加齢時における RP58 の標的遺伝子の網羅的同定を行う。大脳皮質形成期の標的遺伝子に関しては、これまで複数個同定に成功している。同様の方法を用いて、マイクロアレイを用いた網羅的転写産物の変動解析とモチーフ解析から、ChIP アッセイ、ルシフェラーゼアッセイを用いて、RP58 の標的を同定する。特に、人為的な RP58 の発現低下時期に、発現が増加する転写産物を同定する。

(3) RP58 の補充による機能回復を試みる

加齢脳や RP58 を減少させた知的障害モデルマウス脳に、TetO・tTA系(CamK2-tTAを使用)を用いた改変マウスで老齢期に RP58 を補充することで、RP58 の減少により惹き起こされた脳機能低下を防ぐことを試みる。その結果を見て、アデノ随伴ウイルスで RP58 を部位特異的に補充して、脳高次機能の回復を試みる。また、RP58 のターゲットの shRNA を発現させて機能回復するか否かを明らかにする。

4. 研究成果

(1) RP58 ヘテロマウスは知的障害のモデルマウスになることを示した(Hirai, Miwa, Shimbo et al., *Mol psych*, 2023)

RP58 ハプロ不全のモデル動物として、RP58 ヘテロ欠損マウスを作製した。RP58 ヘテロ欠損マウスでは RP58 の発現が mRNA、蛋白、共に半減していた。クリューバーバレル染色で、脳梁の尾側の形成不全を見出した。その他の脳の構造に顕著な変化は見出せなかった。また、大脳皮質層形成を浅層マーカ Satb2、深層マーカ Ctip2 の染色で検証したが、有意な変化は見られなかった。

上記モデルマウスの行動解析を行い、知的障害類似異常を見出した。具体的には、自発的な活動性の亢進、不安亢進、運動学習能低下、ワーキングメモリー低下が明らかになった。また、水迷路テストでは、空間学習能は正常だったが、逆転学習能の低下が見出され、認知記憶能の柔軟性の低下が示唆された。これらの結果は、知的機能の低下、適応能力の低下に相当すると考えられる。RP58 ハプロ不全患者では、軽度から重度の知的障害、運動発達遅延、注意欠陥多動性障害、自閉的行動、常同行動などを示す。本モデルマウスは、患者で見られる症状とおおむね共通と想定される行動特性を示すことから、本疾患のモデルマウスとして妥当と考えられる。

作製したモデルマウスは、グルタミン酸シグナル伝達の異常を示した。大脳皮質のウェスタンブロット解析により、AMPA 受容体 GluA1-4 の中で GluA1 のみ半減した。NMDA 受容体では、GluN1 及び GluN2B には変化はなく、成熟したスパインに発現する GluN2A は半減して

いた。一方、多くのニューロンに存在する NeuN、グルタミン酸作動性シナプス後部に存在する足場タンパク質 Homer、シナプス前部に存在する VGluT1 に変化はなかった。さらに、上記の脳のシナプス機能を解析し、NMDA 受容体応答不全、シナプス長期増強の飽和度の低下を見出した。具体的には、海馬のスライスを作製し、CA1 錐体細胞の電気生理学的解析により、AMPA 受容体を介した興奮性シナプス後電位のシナプスの入力 出力関係は正常であった。また、ペアパルス比、頻回刺激による応答増強に変化はなかった。このことから、シナプス前部からのグルタミン酸放出に変化はないことが示された。パッチクランプ膜電位固定法により NMDA 受容体と AMPA 受容体応答の比率に変化はないが、NMDA 受容体を介するシナプス後電流量が、最も大きくなる膜電位において、低下していることを見出した。そこで、NMDA 受容体が関与する長期増強を調べたところ、頻回刺激 1 回による長期増強には差がないが、頻回刺激を繰り返した場合、長期増強がより低率で飽和してしまうことを見出した。これは、記憶学習の可塑性の容量が小さいことを示し、可塑性低下の基盤になっていることが示唆される。

樹状突起のスパイン形態を解析したところ、成熟スパインの形態異常が見出された。スパインの形態を見るために一部のニューロンだけに蛍光タンパク質 GFP が発現するマウス (Thy1-GFP マウス) を用いて解析した。海馬の CA1 錐体細胞のスパイン密度に変化はなかった。スパインの長さとお頭の幅で 4 タイプにスパインを分類しても、4 タイプの比率に変化はなかった。しかしスパインお頭の幅の大きいタイプ (太いスパイン) 同士で比較すると、RP58 ヘテロマウスではスパインお頭の幅がより小さく、スパインの長さがより短いことが明らかとなった。一方、スパインお頭の幅が小さいタイプ (細いスパイン) 同士の比較では差はなかった。スパインお頭の幅の大きいタイプにはマッシュルーム型、スタップ型という成熟型スパインと考えられているスパインが含まれていることから、成熟スパインの形態異常と考えられる。

(2) RP58 ヘテロマウスの大脳皮質で、RP58 の下流遺伝子の候補を同定した。

野生型と比較して、RP58 ヘテロマウスの大脳皮質で増加する転写産物の中で、その転写制御領域に RP58 の結合サイトを有するものを RP58 の下流遺伝子の候補として複数同定した (DRD5、FBLN3、Fibcd1、HIF3A)。

(3) RP58 ヘテロマウスは、早期老化のモデルマウスになる可能性を示した。

RP58 ヘテロ欠損マウスで、物体位置認識テストを様々な時期に施行にしたところ、RP58 ヘテロ欠損マウスでは野生型と比較して、加齢早期に認知機能が減弱することを見出し、さらに、組織学的解析により、加齢早期に、DNA 断片化、ミクログリアの活性化、海馬 CA1 領域におけるガンマ波の明確な減弱、ミトコンドリア形態異常など、脳老化表現型が見られた (Tanaka et al., *BioRxiv*, 2021)。以上の実験は、RP58 減少が脳機能の低下を惹起する、すなわち、加齢性脳障害の原因の一つであることを示唆する。そこで RP58 の発現量が、脳の老化を制御しているという仮説を立て、この仮説の実証に向け、因果関係を明らかにするために、RP58 の発現を人為的に制御することを試みた。Tet0 配列を RP58 遺伝子の上流に組み込んだマウスを作製し、CamK2-tTA マウスと交配させ、大脳皮質興奮性ニューロンで RP58 を Dox 餌の有無により自在に増加させる、あるいは Actin-tTS 発現マウスと交配させ、全身で RP58 を Dox 餌の有無により自在に減少させる系を作製した。その結果、RP58 発現を成熟後に減らすと、加齢早期 (4 ヶ月齢) に認知機能が減弱することを見出した。また逆に、大脳皮質興奮性ニューロンで RP58 発現を成熟後に増やすと、興味深いことに、通常、老齢時 (25 ヶ月齢) で見られる認知機能低下が抑制される (岡戸、新保、国際特許申請)。従って、RP58 発現量が認知機能低下を制御するという仮説が支持された。以上のことから、RP58 ヘテロ欠損マウスは早期脳老化のモデルマウスになる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka T, Hirai S, Hosokawa M, Saito T, Sakuma H, Saido T, Hasegawa M, Okado H.	4. 巻 337
2. 論文標題 Early-life stress induces the development of Alzheimer's disease pathology via angiopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Neurol.	6. 最初と最後の頁 113552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2020.113552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okado H.	4. 巻 178
2. 論文標題 Nervous system regulated by POZ domain Kruppel-like zinc finger (POK) family transcription repressor RP58	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 813-826
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.15265.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sanchez-Valpuesta M, Suzuki Y, Shibata Y, Toji N, Ji Y, Afrin N, Asogwa CN, Kojima I, Mizuguchi D, Kojima S, Okanoya K, Okado H, Kobayashi K, Wada K.	4. 巻 116
2. 論文標題 Corticobasal ganglia projecting neurons are required for juvenile vocal learning but not for adult vocal plasticity in songbirds.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 22833-22843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1913575116.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Okado H.	4. 巻 1705
2. 論文標題 Regulation of brain development and brain function by the transcriptional repressor RP58.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.02.042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kita M, Nakae J, Kawano Y, Asahara H, Takemori H, Okado H, Itoh H	4. 巻 12
2. 論文標題 Zfp238 Regulates the Thermogenic Program in Cooperation with Foxo1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 87-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.01.005.	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 Hirai S, Hotta K, Okado H.	4. 巻 40
2. 論文標題 Developmental Roles and Evolutionary Significance of AMPA-Type Glutamate Receptors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 e180028
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bies.201800028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sayaka Hirai, Hideki Miwa, Hiroko Shimbo, Keisuke Nakajima, Masahiro Kondo, Tomoko Tanaka, Chiaki Ohtaka-Maruyama, Shinobu Hirai, Haruo Okado	4. 巻 -
2. 論文標題 The mouse model of intellectual disability by ZBTB18/RP58 haploinsufficiency shows cognitive dysfunction with synaptic impairment.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-023-01941-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirai S, Miwa H, Tanaka T, Toriumi K, Kunii Y, Shimbo H, Sakamoto T, Hino M, Izumi R, Nagaoka A, Yabe H, Nakamachi T, Shioda S, Dan T, Miyata T, Nishito Y, Suzuki K, Miyashita M, Tomoda T, Hikida H, Horiuchi J, Itokawa M, Arai M, Okado H	4. 巻 7
2. 論文標題 High-sucrose diets contribute to brain angiopathy with impaired glucose uptake and psychosis-related higher brain dysfunctions in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abl6077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoko Tanaka, Shinobu Hirai, Hiroyuki Manabe, Kentaro Endo, Yasumasa Nishito, Hiroko Shimbo, Hikari Yoshitane, Haruo Okado	4. 巻 -
2. 論文標題 A tetracycline antibiotic minocycline prevents early aging phenotypes in mice heterozygous for RP58	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.09.18.460879	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomoko Tanaka, Okado Haruo.
2. 発表標題 Mechanism for the maintenance of cognitive function
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新保 裕子、平井 志伸、田中 智子、田中 謙二、岡戸 晴生
2. 発表標題 成体でのRP58発現抑制は認知機能低下を惹起する
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 転写抑制因子RP58の発現制御可能なトランスジェニック非ヒト動物	発明者 岡戸晴生、新保裕子	権利者 公益財団法人東京 京都医学総合研 究所
産業財産権の種類、番号 特許、2019-136490	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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
研究分担者	平井 志伸 (HIRAI Shinobu) (00625189)	公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主任研究員 (82609)	
研究分担者	田中 智子 (TANAKA Tomoko) (40578986)	公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員 (82609)	
研究分担者	新保 裕子 (SHIMBO Hiroko) (50724663)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・研究員 (82729)	
研究分担者	三輪 秀樹 (MIWA Hideki) (80468488)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長 (82611)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関