

令和 3 年 4 月 16 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15682

研究課題名（和文）Schaaf-Yang症候群の発症メカニズム解明と治療法開発

研究課題名（英文）Analyses of the onset mechanism of Schaaf-Yang syndrome

研究代表者

根岸 豊（Yutaka, Negishi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・研究員

研究者番号：40798344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：私たちはCRISPR/Cas9システムによりSchaaf-Yang症候群（SYS）モデルマウスを作成した。このモデルマウスは脳でのインプリンティングは保持されており、Magel2 mRNAは視床下部の室傍核や視交叉上核に発現が保たれていることを証明した。モデルマウスは新生児期では野生型に比べて有意に低体重であったが、生後4,8週ではキャッチアップがみられ、主に乳児期のみには哺乳不良が認められるSYSのヒトでの表現型を部分的に呈していた。関節拘縮や重度精神運動発達遅滞は再現できなかったが、軽症のSYSを再現したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Schaaf-Yang症候群（SYS）患者のモデルとなるフレームシフト変異によるモデルマウスの作成に世界に先駆けて成功した。主に乳児期のみには哺乳不良が認められるSYSのヒトでの表現型を再現できたが、関節拘縮や重度精神運動発達遅滞は再現できなかった。表現型の一部しか示せず、治療法に関する検討まではできなかったが、新しいモデルマウスはSYSの病態解明に重要な役割を果たすことが期待できると考えられ、学術的意義は大きいと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We generated genome-edited model that carried a truncating variant in Magel2 generated using the CRISPR/Cas9 system. The imprinted expression and spatial distribution of truncating Magel2 transcripts in the brain were maintained. Although neonatal mice were lighter than wildtype littermates, males and females weighed the same as their wildtype littermates by eight and four weeks of age, respectively. However, they did not show arthrogryposis and severe developmental delay. Collectively, the genome-edited mouse model maintains genomic imprinting and distribution of truncated Magel2 transcripts in the brain, but only partially recapitulates SYS phenotypes.

研究分野：小児科

キーワード：Schaaf-Yang症候群 MAGEL2 CRISPR/Cas9 モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

**MAGEL2** 遺伝子は 15 番染色体の長腕(15q11.2)に位置し、父由来アレルのみ発現するインプリンティング遺伝子である。**Schaaf-Yang** 症候群(**SYS**)は父由来 **MAGEL2** 遺伝子の短縮型変異により発症する。一方、**Prader-Willi** 症候群(**PWS**)は **MAGEL2** 遺伝子を含む **PWS** 領域(15q11.2-q13)の父由来アレルが欠失することで発症する。**SYS** と **PWS** は乳児期の筋緊張低下、経口摂取困難、精神運動発達遅滞など共通の臨床症状を呈するが、**SYS** はしばしば関節拘縮や自閉症を合併する。私たちは過去に **PWS** 様症状を示すが、遺伝学的に **PWS** が否定された 100 名を解析し、同胞例 1 組を含む 6 名に **MAGEL2** の短縮型変異 (ナンセンス変異 5 名、フレームシフト変異 1 名) を同定した。変異同定例の症状は、有意語の獲得がない、関節拘縮の存在など独自の所見を認め、興味深いことに、6 例中 4 例に原因不明の脳症罹患歴を認めた。さらに、**MAGEL2** 遺伝子の c.1996delC 変異は胎児死亡の原因であることが知られている。一方、**MAGEL2** 遺伝子の欠失例は軽度の知的障害を呈するのみで、**SYS** よりも軽症である。これらのことから、**MAGEL2** 蛋白は重要な機能を持たないが、短縮型変異により作られる変異 **MAGEL2** 蛋白は何らかの機能を獲得し、生体内で毒性を示すという仮説を立てた。この仮説を検証するために、ヒトの **MAGEL2** 遺伝子に相当するマウスの **Magel2** 遺伝子を標的とし、遺伝子工学の手法を用いてモデルマウスを作成し、表現型の解析を計画した。

## 2. 研究の目的

これまでに報告されている **Magel2** のノックアウトマウスは **Magel2** 全域を欠失している機能喪失マウスであり、**MAGEL2** 遺伝子の短縮型変異が原因である **SYS** の病態と異なる。本研究はヒト病態により近いマウスモデルを **CRISPR/Cas9** システムで作成し、モデルマウスを用いた発症メカニズムの解明を行い新規の脳機能障害分子機構を明らかにし、ひいては病態に基づく治療法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

**CRISPR/Cas9** システムによるモデルマウスの作成は名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物研究教育センターにて実施した。**pX330** ベクターに **Magel2** 遺伝子の一部(c.1702-1724, c.1720-1742, c.1810-1832, c.1882-1904, c.1900-1922)を標的とする **gRNA** 配列を導入したコンストラクトを作成し、**C57BL/6N** マウスの受精卵にマイクロインジェクションした。**CRISPR/Cas9** システムにより内在性 **Magel2** 遺伝子に非相同末端結合を起こし、フレームシフト変異を有するマウスをファウンダーとする **Magel2** 編集モデルを作成し、表現型解析を行った。

## 4. 研究成果

### 1) **Magel2** 編集モデルマウスの作成

6 匹の仮親から、24 匹の新生仔を得た。24 匹中 20 匹の新生仔に、内在性 **Magel2** 遺伝子の変異導入を確認し、フレームシフト変異(c.1690\_1924del;p(Glu564Serfs\*130))を持つオスマウ

スをファウンダーとした。父由来アレルに変異を有するマウスを **Magel2<sup>P:fs</sup>**、母由来アレルに変異を有するマウスを **Magel2<sup>M:fs</sup>** と名付けた (図 1)。

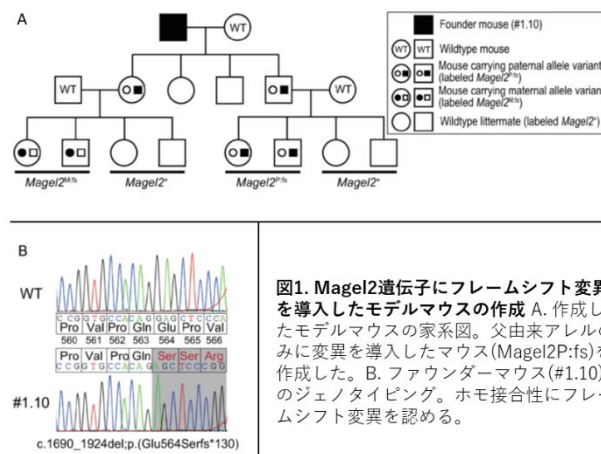


図1. **Magel2**遺伝子にフレームシフト変異を導入したモデルマウスの作成 A. 作成したモデルマウスの家系図。父由来アレルのみに変異を導入したマウス (**Magel2<sup>P:fs</sup>**) を作成した。B. ファウンダーマウス (#1.10) のジェノタイピング。ホモ接合性にフレームシフト変異を認める。

## 2) **Magel2** mRNA 発現解析

マウスの脳から RNA を抽出し、**RT-PCR** 法にて **Magel2** 遺伝子の発現を確認した。**Magel2<sup>P:fs</sup>** では変異 **Magel2** のみが発現し、**Magel2<sup>M:fs</sup>** では正常 **Magel2** のみが発現していたことから、モデルマウスのインプリンティングは保持されていた (図 2)。

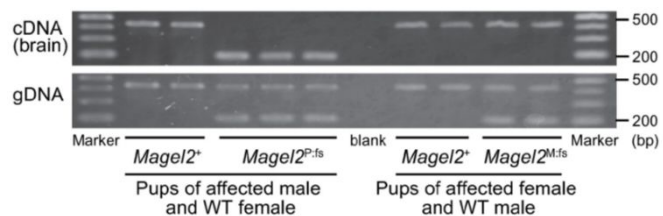


図2. マウス脳の **Magel2** 遺伝子発現

RT-PCR法にて、**Magel2<sup>P:fs</sup>**では変異**Magel2** (短縮型) のみが発現し、**Magel2<sup>M:fs</sup>**では正常**Magel2**のみが発現していることがわかる。

次に **Magel2<sup>P:fs</sup>** と **WT** の脳切片を作成し、**in situ hybridization** 法により **Magel2** mRNA の分布を調べた。両群とも視床下部の視交叉上核と室傍核に **Magel2** mRNA は発現しており、明らかな違いは認めなかった (図 3)。

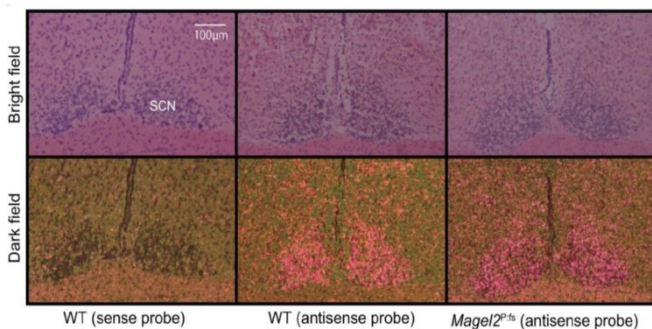


図3. マウス脳の **Magel2** mRNA の分布

**in situ hybridization**法により **Magel2** mRNA は、両群とも視床下部の視交叉上核 (SCN) と室傍核に **Magel2** mRNA は発現していることがわかる。

## 3) モデルマウスの表現型解析

**Magel2<sup>P:fs</sup>** と野生型同腹仔 (**Magel2<sup>+/+</sup>**) の体重を比較した。離乳前 (日齢 10) は、**Magel2<sup>P:fs</sup>** は  $5.44 \pm 0.12\text{g} (n=17)$  で、**Magel2<sup>+/+</sup>** は  $6.11 \pm 0.13\text{g} (n=20)$  であり、**Magel2<sup>P:fs</sup>** は体重増加不良を認めた。離乳後も経時的に体重の比較を行ったところ、オスでは生後 8 週で、メスでは生後 4 週で **Magel2<sup>+/+</sup>** の体重に追いついた (図 4)。しかし、**SYS** で認める関節拘縮や重度精神運動発達遅滞は再現できなかった。**MAGEL2** 変異の種類と **SYS** 患者の表現型には相関が認められており、**Magel2** の **c.1690\_1924del** 変異は軽症の **SYS** を再現したと考えられる。

本研究のモデルマウスでは表現型の一部しか示せず、研究期間中に変異 **Magel2** 蛋白が生体内

で毒性を示すメカニズムを解明することはできなかったが、ヒト患者のモデルとなるフレームシフト変異によるモデルマウスの作成に世界に先駆けて成功した意義は大きいと考える。

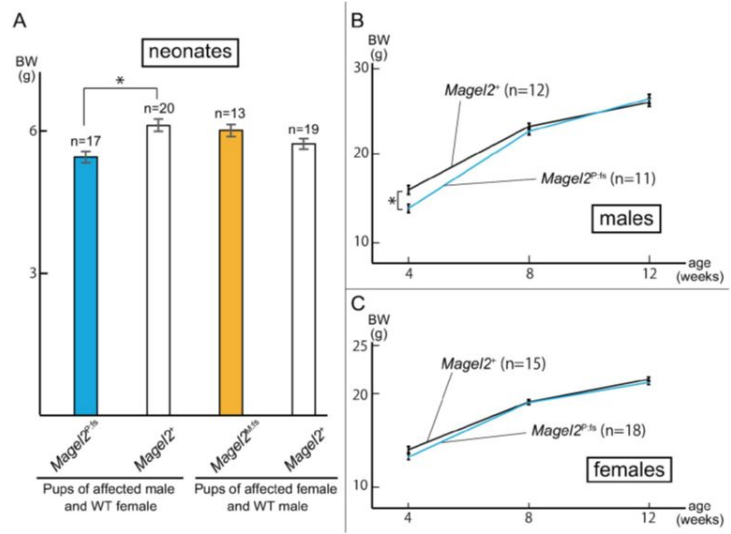


図4 モデルマウスの体重比較

A. 新生仔期はモデルマウスで体重は有意に小さい。 B,C. 生後4-8週で体重はキャッチアップしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Negishi Yutaka, Ieda Daisuke, Hori Ikumi, Nozaki Yasuyuki, Yamagata Takanori, Komaki Hirofumi, Tohyama Jun, Nagasaki Keisuke, Tada Hiroko, Saitoh Shinji	4. 巻 14
2. 論文標題 Schaaf-Yang syndrome shows a Prader-Willi syndrome-like phenotype during infancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases	6. 最初と最後の頁 277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-019-1249-4	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 Ieda Daisuke, Negishi Yutaka, Miyamoto Tomomi, Johmura Yoshikazu, Kumamoto Natsuko, Kato Kohji, Miyoshi Ichiro, Nakanishi Makoto, Ugawa Shinya, Oishi Hisashi, Saitoh Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Two mouse models carrying truncating mutations in Magel2 show distinct phenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0237814
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0237814	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 -

〔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 Daisuke Ieda, Yutaka Negishi, Tomomi Miyamoto, Natsuko Kumamoto, Kohji Kato, Shinya Ugawa, Hisashi Oishi, Shinji Saitoh
2. 発表標題 Generation of a mouse model carrying mutation in Magel2
3. 学会等名 第61回日本小児神経学会学術集会 日本-台湾 新生児・小児神経ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 根岸豊, 家田大輔, 中村勇治, 堀いくみ, 服部文子, 野崎靖之, 小牧宏文, 遠山潤, 長崎啓佑, 多田弘子, 大石久史, 齋藤伸治
2. 発表標題 Schaaf-Yang症候群の臨床像検討とトランスジェニックマウスを用いた病態解析
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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