

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23744

研究課題名(和文) 鏡一緒方症候群におけるPEG11のin vivoノックダウン治療法の開発

研究課題名(英文) Development of in vivo knockdown treatment for PEG11 in Kagami-Ogata syndrome

研究代表者

北澤 萌恵 (KITAZAWA, Moe)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：40801965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：父親性発現インプリント遺伝子Peg11/Rtl1(以下Peg11)は真獣類特異的遺伝子であり、発現量異常により疾患を引き起こすことがわかっている。これまでの胎盤胎児毛細血管の維持に必須であることの報告に加え、骨格筋の分化・強化に重要であること、脳の真獣類特異的部位である脳梁で発現していることを明らかにした。また、マウス胎児にPeg11 siRNAを投与したところPeg11欠損様症状を示すことから、Kagami-Ogata症候群の治療にsiRNAを用いることが有効であることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Peg11の欠損あるいは過剰発現はそれぞれTemple症候群およびKagami-Ogata症候群の主な原因であることから、Peg11の機能解析を行うことは両疾患の病態解明に貢献でき、疾患の新規治療法に繋がることを期待できる。また、Peg11は真獣類特異的遺伝子でもあるため、私たちヒトを含む真獣類の進化の過程を探ることに貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The paternal expressed imprinted gene, Peg11/Rtl1, is a eutherian-specific gene and is known to cause disease due to abnormal expression. In addition to previous reports that it is essential for the maintenance of placental fetal capillaries, it has been clarified that it is important for differential and strengthening of skeletal muscle and that it is expressed in the corpus callosum, which is a eutherian-specific part of the brain. Moreover, to administered Peg11 siRNA to mouse fetus, it showed Peg11 deficiency-like symptoms, confirming that siRNA is effective for the treatment of Kagami-Ogata syndrome.

研究分野：発生生物学、分子生物学

キーワード：Peg11 Rtl1 真獣類特異的遺伝子 骨格筋 脳 ゲノムインプリンティング疾患 ヒト14番染色体二倍体症候群

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

指定難病疾患であるヒト 14 番染色体父親性二倍体症候群 (Kagami-Ogata 症候群) は胎盤過形成、腹直筋乖離、肋骨形態異常を伴う呼吸不全による新生児致死、重度の知的障害を特徴とするヒト先天性疾患であり、*PEG11* の過剰発現が主な原因であると考えられている。一方、*PEG11* を欠失すると Temple 症候群を発症し、成長遅延、筋緊張低下、軽度の知的障害、発話の遅れを引き起こす。

申請者らは真獣類特異的の遺伝子 *Peg11* の欠損あるいは過剰発現が胎盤形成異常、機能不全を引き起こし、胎児期中期から新生児期にかけて致死となることをマウス疾患モデルを用いて報告した。しかし、胎盤以外での機能は不明であり、疾患の有効な治療法も確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Kagami-Ogata 症候群および Temple 症候群の症状である筋肉の異常および知的障害に着目し、筋肉と脳における *Peg11* の機能解析を行うとともに、Kagami-Ogata 症候群の発症機序の解明を通じて新規治療法開発の可能性を探ることである。

3. 研究の方法

- 1) Temple 症候群の筋緊張低下、Kagami-Ogata 症候群の筋肉の異常が原因であると考えられる呼吸不全や腹直筋乖離の原因を探るために、胎児期から新生児期までの筋肉組織 (肋間筋、横隔膜、腹壁、四肢の筋肉) での *Peg11* の mRNA およびタンパク質の発現時期・局在を明らかにする。
両疾患のモデルである *Peg11* 欠損および過剰発現マウスを用いて、骨格筋の組織学的解析を行い、構造異常を観察する。
- 2) Temple 症候群および Kagami-Ogata 症候群は運動発達遅延、知的障害、摂食障害がみられるため、脳での *Peg11* の mRNA およびタンパク質の発現時期・部位を特定する。
マウス疾患モデルを用いて行動解析を行う。明暗箱選択テストおよび高架式十字迷路による情動性、オープンフィールドテストによる自発活動性、モリスの水迷路および恐怖条件付けテストによる学習・記憶を調べることで疾患との関係を解析する。
- 3) Kagami-Ogata 症候群の原因遺伝子である *PEG11* はヒト 14 番染色体にコードされているインプリンティング遺伝子で、父親由来の染色体から選択的に発現する。一方、母親由来の染色体から発現する *antiPEG11* からは *PEG11* を抑制する microRNA (以下 miRNA) が生産される。この仕組みを利用し、*Peg11* 過剰発現マウスに miRNA を投与することで発現量を抑制し、治療法の開発に繋げる。

4. 研究成果

1) *Peg11* 欠損および過剰発現マウスでの骨格筋異常

胎児期から成体まで発生段階を追って筋肉組織での *Peg11* mRNA の発現を調べたところ、*Peg11* は胎児期から新生児期の骨格筋 (特に呼吸に関する筋肉である肋間筋、横隔膜、腹壁) で時期特異的に発現し、生後 2 週目以降の筋肉では発現しないことを確認した。そこで、*Peg11* 欠損および過剰発現マウスの新生児で組織学的解析を行うと、どちらも呼吸に重要な肋間筋、横隔膜、腹壁の筋線維の構造異常 (筋線維の収縮または肥大) がみられた (図 1)。また、免疫染色により、*PEG11* タンパク質は筋線維の強化や収縮に関わる DESMIN タンパク質と共局在することを確認した (図 2)。さらに、*Peg11* は筋肉の幹細胞である筋衛星 (サテライト) 細胞の増殖・分化の制御に関わり、欠損すると増殖速度が上昇し、過剰発現すると増殖速度が減少した。サテライト細胞から分化する筋芽細胞では *Peg11* 欠損および過剰発現のどちらでも構造の脆弱化が見られた。

以上のことより、Temple 症候群にみられる筋緊張低下や Kagami-Ogata 症候群にみられる呼吸不全、腹直筋乖離は *PEG11* の発現量異常が主な原因であると考えられる。

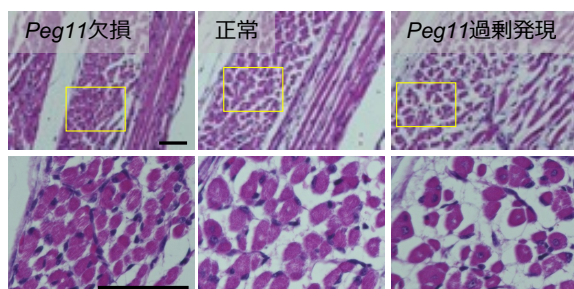


図 1: 新生児肋間筋の異常

正常マウス(中央)に比べ、*Peg11* 欠損マウス(左)は筋線維が収縮し、*Peg11* 過剰発現マウス(右)は筋線維が肥大している(固定後筋膜から剥がれ収縮)。

scale bar: 1mm(上), 50µm(下)

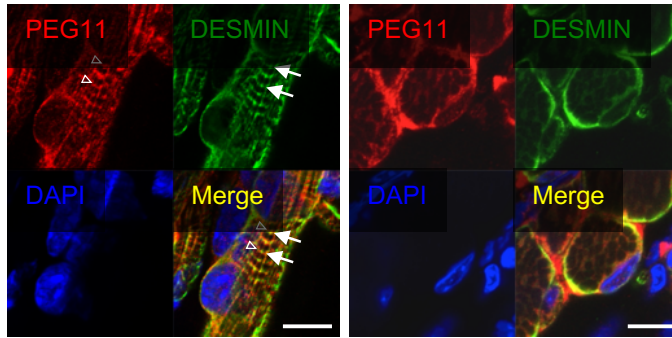


図 2: 新生児筋線維での PEG11 の発現
PEG11 (赤; 矢頭)、DESMIN (緑; 矢印)、
DAPI (青) の蛍光免疫染色像。PEG11 と
DESMIN は共局在する。縦断面(左)と横
断面(右)。Scale bar: 20 μ m

(2) 神経症状と *Peg11* の関係

脳において *Peg11* mRNA は胎児期から新生児期の脳、脊髄で発現していることが確認できた。PEG11 タンパク質は新生児の大脳皮質第 V~VI 層から大脳脚、脳幹を通り脊髄に至る皮質脊髄路で発現しており、これらは哺乳類特異的構造である。また、真獣類特異的構造である脳梁 (左右の半球を繋ぐ構造) でも発現していることから、構造的な進化への寄与が示唆された (図 3)。さらに、*Peg11* 欠損および過剰発現マウスの行動解析を行い、それぞれ自発運動の低下、不安様行動の増加、記憶障害を観察した。これらのことより、両疾患にみられる運動発達遅延、知的障害などの神経・精神症状に *PEG11* の発現量が影響することが示唆された。

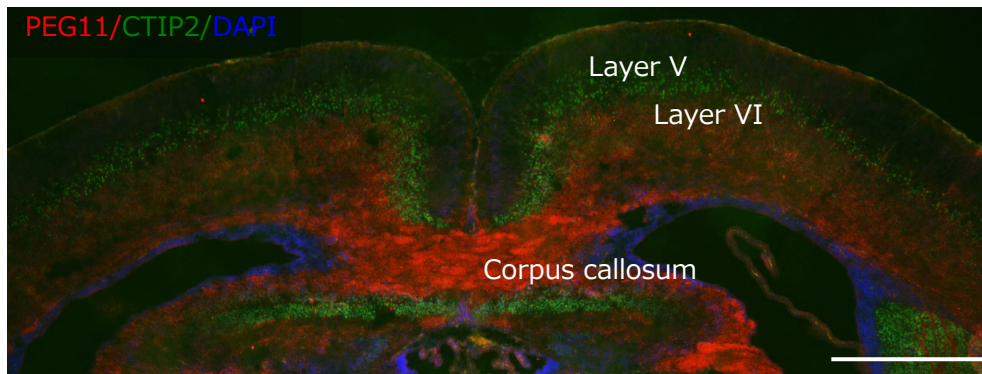


図 3: 新生児脳での PEG11 の発現

PEG11 (赤)、CTIP2 (緑; 大脳皮質第 V 層マーカー)、DAPI (青) の蛍光免疫染色像。

PEG11 は大脳皮質第 V~VI 層、脳梁で発現している。Scale bar: 500 μ m

(3) *Peg11* siRNA 投与による *Peg11* 欠損様症状の確認

妊娠 14.5 日目のマウス胎児に miRNA 配列をもとに作製した siRNA を投与した。その結果、胎児の肋間筋で筋肉の発生が遅れていることを確認し、siRNA の効果を確認することまではできた。今後は *Peg11* 過剰発現マウスに siRNA を投与し、*Peg11* のノックダウンと表現型の回復 (致死性の回復、胎盤・筋線維での *Peg11* の発現量の低下および異常構造の回復) を試みる。

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 2件）

1. 著者名 Kitazawa M., Sutani A., Kaneko-Ishino T. and Ishino F.	4. 巻 26
2. 論文標題 The role of eutherian-specific RTL1 in the nervous system and its implications for the Kagami-Ogata and Temple syndromes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to cells.	6. 最初と最後の頁 165-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12830	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 Kitazawa M., Hayashi S., Imamura M., Takeda S., Oishi Y., Kaneko-Ishino T. and Ishino F.	4. 巻 147
2. 論文標題 Deficiency and overexpression of Rtl1 in the mouse cause distinct muscle abnormalities related to Temple and Kagami-Ogata syndromes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.185918	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北澤萌恵、金児-石野知子、石野史敏
2. 発表標題 マウスにおけるPeg11/Rtl1の欠損と過剰発現はTemple症候群とKagami-Ogata症候群に関連した異なる筋肉異常を引き起こす
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石野史敏、北澤萌恵、金児-石野知子
2. 発表標題 Peg11/Rtl1は哺乳類の胎児・新生児の骨格筋発生に関する鏡-緒方症候群・テンプル症候群の主要原因遺伝子である
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------