

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06458

研究課題名(和文) 先天性腓骨神経欠損マウスの原因遺伝子同定と発症機序の解明

研究課題名(英文) Genetic analysis of a mutant mouse with motor axon defects

研究代表者

榎 和子 (Keino-Masu, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50344883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路は、発生期に神経軸索が誘引・反発因子により標的へ正しく誘導されることにより形成される。本研究は、腓骨神経の形成異常をもつ突然変異体マウスの原因遺伝子を同定することにより、脊髄運動神経の新しい軸索誘導機構を明らかにすることを目的としている。これまでに、次世代シーケンサーを用いてゲノム異常を発見し、ゲノム編集を用いて表現型を正常化することに成功している。本研究では、原因と想定される遺伝子を破壊したマウスを作製し、その表現型を観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

突然変異マウスの分子遺伝学的解析により、脊髄運動神経の軸索形成に関与する新規の遺伝子を同定することが出来た。今後、この遺伝子の働きを明らかにすることにより、神経回路形成の新しい分子機構を明らかにすることができる可能性がある。内反尖足は、ヒトにおいて最も高頻度で見られる先天性異常であるが、その発症機序や遺伝的メカニズムは不明である。本研究の成果がヒト内反尖足の診断や治療につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neural circuits are formed during development by the combined actions of chemoattractants and chemorepellents in guiding axons towards their targets correctly. This study aimed to elucidate the molecular mechanism that regulated the axon guidance of the spinal motor neurons by examining the genomic abnormalities in a spontaneous mutant mouse that showed defects in the peroneal nerve. I performed next generation sequencing to identify abnormalities in the genome of the mutant mouse and then used genome editing to examine whether the phenotype is restored.

研究分野：神経科学

キーワード：マウス 運動神経 軸索ガイダンス 変異 ゲノム異常 ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄運動神経は特定の筋を支配し運動を制御する。この特異的な神経投射は、発生期に誘引分子と反発分子の相互作用によって形成される。これまでの研究から、後肢の背側筋へ投射する腓骨神経は、後肢芽の腹側に発現する*ephrinA*の反発と背側に発現する*EphA*・*GDNF*の誘引によって背側へ誘導されることが分かってきた。しかし、運動神経の投射制御機構は未だ不明な点が多く、軸索誘導の分子機構に関する更なる研究が必要である。

本研究では、腓骨筋萎縮マウス (*peroneal muscular atrophy: pma*) を用いて神経回路形成機構を調べている。*pma*マウスは、1980年代に日本で発見された自然突然変異マウスであり、ホモ接合体で腓骨神経が欠損するため腓骨筋が萎縮し先天的に内反尖足を示す。研究代表者は、*pma*マウスで腓骨神経が形成されず、代わりに腰部に伸びる異常な軸索が存在することを明らかにしている (未発表データ)。この異常は腓骨神経が欠損する他の変異マウスで報告されていないことから、*pma*マウスの原因同定により運動神経軸索ガイダンスの新たな分子機構の解明に繋がると期待される。

研究代表者は、これまでに、連鎖解析により原因遺伝子の候補領域を約1.1 Mbpに絞り込み、この領域内に存在する20遺伝子の全エクソンの塩基配列を決定した。*Pma*マウスは近交系由来ではないため、多数のSNPが存在したが、遺伝子機能を喪失するようなフレームシフト変異やナンセンス変異、およびスプライス部位の異常などは無かった。次いで、次世代シーケンサーを用いて候補ゲノム領域のリシーケンスおよび胎児のRNA-seq解析を行い、候補領域内に存在するある遺伝子に約8キロ塩基対の異常配列が挿入されていることを明らかにした (未発表データ)。この異常配列の挿入により、挿入部位に存在する遺伝子の発現が顕著に減少していたことから、異常配列の挿入が*pma*遺伝子の原因であると考えられた。そこで、CRISPR/Cas9法を用いて*pma*マウスからその異常配列を除去した系統を作製したところ、表現型が回復することが分かった (未発表データ)。以上の結果から、異常配列の挿入が*pma*の原因であることが明らかになったが、発症機序については不明であった。

2. 研究の目的

上述の通り、CRISPR/Cas9法を用いて*pma*マウスから異常配列を除去した結果、表現型が回復することが分かった。その際、挿入配列が逆方向に挿入された系統も得られたが、それらでも表現型が回復していたことから、挿入配列内に存在するエンハンサーによる内在性遺伝子の異常活性化によるものではないことが明らかになった。しかしながら、異常配列の挿入による挿入部位の遺伝子の発現低下が原因なのか、異常配列挿入による機能獲得が原因なのかは明らかではなかった。そこで、さらに複数のゲノム編集系統を作製した結果、挿入部位の遺伝子の発現低下が原因であると考えに至った。本研究では、近交系マウスにおいて当該遺伝子をCRISPR/Cas9法を用いて破壊して、その表現型を調べ、腓骨神経形成に対する影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6JおよびFVB系統のマウスで、CRISPR/Cas9を用いて当該遺伝子のノックアウトを行った。前者は神経科学研究で用いられる標準系統マウスであり、後者は*pma*系統に最も遺伝的に近いことを見出した近交系マウス系統である。以前の研究において、ガイドRNAなどは全てのマウス系統で使用可能な配列を選んであるので、これまでに用いて実績があるものを使った。また、当該遺伝子には多数のスプライシングバリエントが存在するが、全てのスプライシングバリエントに共通する複数のエクソンを除去することができるものであり、完全な機能喪失型変異体を作製できると期待される。必要なベクターを*pma*マウス受精卵に微量注入した。得られたマウスの尻尾からゲノムDNAを抽出し、PCRにより予想される編集が起こったマウスを選択し、次に切断部位の配列を通常のシーケンシングにより決定した。卵割の途中で遺伝子組換え時期が起こる結果、最初の世代では異なる組換えを起こした細胞が混在したキメラ状態となることがあるため、表現型の観察には、F1世代以降を用いてホモ接合体マウスを作製した。CRISPR/Cas9法を用いたゲノム編集は、新学術領域研究「先端技術基盤支援プログラム」の「先端モデル動物支援プラットフォーム」による支援を受けて、筑波大学生命科学動物資源センターの水野聖哉博士との共同で実施した。

4. 研究成果

C57BL/6J 系統では、F0 で 31 匹が得られた。PCR を実施して、予想される DNA 断片長が得られ系統の内、Cas9 陽性の系統などを除き、13 系統の遺伝子解析を行った。FVB 系統では、F0 で 103 匹が得られた。PCR を実施して、予想される DNA 断片長が得られ系統の内、Cas9 陽性の系統などを除き、25 系統の遺伝子解析を行った。組換え部位の配列を通常のシーケンサーで決定したところ、切断部位が正しく除去され結合された系統は少数であり、切断部位から数塩基～10 数塩基が除去された系統が多かった。以前に pma マウスで CRISPR/Cas9 法を用いて当該遺伝子をノックアウトした時に得られた系統における切断部位の配列（欠損した塩基対）と同一のものを得るべく多くの系統の遺伝子解析を実施したが、同一のものは得られなかった。

上記の全てのマウス系統で、当該遺伝子はノックアウトされた状態にあると考えられる。いずれの系統でも、成獣マウスにおける尖足の有無を観察する限り、pma の表現型を示すマウスはいなかった。従って、近交系マウスでは当該遺伝子の破壊のみでは pma と同じ表現型が出現しないものと考えられ、pma マウスの遺伝的背景が表現型表出の基盤にあるものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miya Ken, Keino-Masu Kazuko, Okada Takuya, Kobayashi Kenta, Masu Masayuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Expression of Heparan Sulfate Endosulfatases in the Adult Mouse Brain: Co-expression of Sulf1 and Dopamine D1/D2 Receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 726718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2021.726718	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 Kerever Aurelien, Nagahara Fumina, Keino-Masu Kazuko, Masu Masayuki, van Kuppevelt Toin H, Vives Romain R, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 31
2. 論文標題 Regulation of fractone heparan sulfate composition in young and aged subventricular zone neurogenic niches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwab081	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 Tsuji Yusuke, Kerever Aurelien, Furukawa Toshiki, Kamagata Koji, Saito Yuya, Aoki Shigeki, Hata Junichi, Okano Hideyuki, Kobayashi Kenta, Okada Takuya, Miya Ken, Keino-Masu Kazuko, Masu Masayuki, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 88
2. 論文標題 Diffusion magnetic resonance tractography-based evaluation of commissural fiber abnormalities in a heparan sulfate endosulfatase-deficient mouse brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance Imaging	6. 最初と最後の頁 123 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mri.2022.01.017	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 Takahashi Aki, Durand-de Cuttoli Romain, Flanigan Meghan E., Hasegawa Emi, Tsunematsu Tomomi, Aleyasin Hossein, Cherasse Yoan, Miya Ken, Okada Takuya, Keino-Masu Kazuko, Mitsui Koshiro, Li Long, Patel Vishwendra, Blitzer Robert D., Lazarus Michael et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Lateral habenula glutamatergic neurons projecting to the dorsal raphe nucleus promote aggressive arousal in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-31728-z	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 辻祐介、Kerever Aurelien、齋藤勇哉、鎌形康司、青木茂、畑純一、榎正幸、榎和子、平澤恵里
2. 発表標題 Sulf1/2欠損マウスにおける拡散テンソル画像による脳梁異常の解析
3. 学会等名 日本神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuko Keino-Masu, Takuya Okada, Sayaka Hashimoto, Masayuki Masu
2. 発表標題 Sulf1/2 double-knockout mice show the tendency not to lose in the tube test
3. 学会等名 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Okada, Marika Kato, Satoshi Aizawa, Kazuko Keino-Masu, Akira Tamaoka, Masayuki Masu
2. 発表標題 Bilateral projection and motor control of the corticospinal tract in mice lacking the heparan sulfate endosulfatases Sulf1/2
3. 学会等名 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学医学医療系 分子神経生物学グループ
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/molneurobiol/>

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	榑 正幸 (Masu Masayuki) (20243032)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	岡田 拓也 (Okada Takuya) (60451697)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

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