

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02847

研究課題名（和文）クロマチンリモデリング異常による発達障害の包括的理解と治療応用

研究課題名（英文）Comprehensive understanding and therapeutic application of developmental disorders caused by abnormal chromatin remodeling

研究代表者

西山 正章（Nishiyama, Masaaki）

金沢大学・新学術創成研究機構・教授

研究者番号：50423562

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000 円

研究成果の概要（和文）：われわれは、Chd8重複が転写、神経解剖学的、行動表現型に及ぼす影響を明らかにするため、Chd8ノックインマウスを樹立した。その結果、Chd8を過剰発現させると、脳の深層ニューロンの産生が障害され、神経発生や精神神経疾患に関連する遺伝子の発現を変化させること、またChd8ノックインマウスの脳における遺伝子発現パターンは、Chd8ヘテロ接合体変異マウスで明らかなパターンと負の相関があることが示された。さらに、行動解析の結果、Chd8の過剰発現は多動と不安様行動の減弱をもたらし、これらの行動変化は遺伝学的と薬理的介入によって改善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

神経発達障害には、自閉スペクトラム症（ASD）、注意欠陥・多動性障害（ADHD）、知的障害などさまざまな疾患が含まれ、遺伝的要素が強い複雑な病因が特徴である。ゲノムの特定領域の増減を伴うコピー数変異は、神経発達障害の根底にある主要な遺伝的要因である。欠失と重複の両方がこれらの病態に関与する個々の遺伝子座が数多く同定されており、適切な遺伝子量が神経発達と脳機能の重要な決定因子であることが示唆されているが、その根底にあるメカニズムは不明である。Chd8ノックインマウスはヒトのCHD8重複症候群のモデルマウスとして適しており、CHD8の発現増加が脳の発達と機能を変化させるメカニズムに光を当てた。

研究成果の概要（英文）：We have now established Chd8 knock-in mice in order to characterize the effects of Chd8 duplication on transcriptional, neuroanatomical, and behavioral phenotypes. We found that Chd8 overexpression impairs the generation of deep-layer neurons in the brain. Transcriptomic analysis showed that Chd8 overexpression alters the expression of genes related to neural development and neuropsychiatric disease, and that the pattern of gene expression in the brain of Chd8 knock-in mice was negatively correlated with that apparent for Chd8 heterozygous mutant mice. Furthermore, behavioral analysis revealed that Chd8 overexpression results in hyperactivity and attenuated anxiety-like behavior, and that these behavioral changes were ameliorated by genetic or pharmacological interventions.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチンリモデリング 発達障害

## 1. 研究開始当初の背景

多くの発達障害の発症には遺伝的要因が強く関与しており、患者を対象としたゲノム解析から発症に関連する単一遺伝子のコピー数の変化(欠失や重複)が多数同定されている。その中でも、例えばMECP2という遺伝子は、欠失するとRett症候群、重複するとMECP2重複症候群という発達障害の原因になる。このように一部の遺伝子についてはコピー数が多くても少なくても発達障害を引き起こすことが明らかになっており、同一遺伝子の欠失と重複の表現型を解析することはその遺伝子の分子機能や発症メカニズムを明らかにする上で重要である。

近年、自閉症患者における大規模な原因遺伝子探索によってクロマチンリモデリング因子CHD8が最も有力な自閉症原因候補遺伝子として同定され、世界中で大きな反響を呼んでいる。自閉症は胎生期における神経発生の異常が原因と考えられているが、自閉症は脳の疾患であるため、ヒト患者の生体サンプルの入手が困難であり、また介入的治療実験も困難であることから、本質的な病態の解明には至っていない。そこで自閉症を含む発達障害研究においてモデル動物は非常に重要な実験ツールである。申請者らのグループは、自閉症患者で報告されたCHD8変異を模倣した全身CHD8ヘテロ欠損マウスを作製し行動解析を行ったところ、自閉症を特徴付ける行動異常が再現されることを確認した。さらに遺伝子発現解析によって神経発生の重要な制御因子であるRESTが異常活性化しており、ヒトでの知見と同様に神経発生遅延が起こることを実証した。その後も、世界中の多くの研究者がCHD8ヘテロ欠損マウスを解析した論文を報告している。

多くの研究により、CHD8の機能喪失変異と自閉症の発症との強い関連が明らかになる一方で、CHD8の遺伝子座を含む領域の重複が発育遅滞の原因になる(CHD8重複症候群)ことが相次いで報告されている。以上のことから正常な脳機能にはCHD8の適切な発現量が重要であることが示唆されており、CHD8発現量の減少(機能喪失)や増加(機能獲得)による神経発生の異常が自閉症や発育遅滞などの発達障害発症の根底にあることが予想される。

そこで申請者はこれまで用いていたCHD8機能喪失型変異マウスに加えて、予備的研究において新たにCHD8過剰発現マウスの作製を行った。この2種類のマウスを用いて機能喪失と機能獲得の両面から分子、細胞、回路レベルでの異常を明らかにすることで、CHD8の量的変化に起因する発達障害の発症メカニズムを明らかにし、最終的には疾患治療への応用に繋げたい。

## 2. 研究の目的

自閉症を含む発達障害の患者の多くは社会生活に支障をきたしており、社会的に大きな問題となっているため、病態の解明と科学的根拠に基づいた治療法の確立が急務となっている。近年クロマチンリモデリング因子CHD8が自閉症の最も有力な原因候補遺伝子として報告された。申請者らは長年にわたりCHD8の研究を続けてきたが、自閉症患者のCHD8変異を再現したモデルマウスを作製し行動解析を行ったところ、自閉症様の行動異常を再現することに成功した。このようにCHD8の機能喪失が自閉症の発症に強く関連している一方で、CHD8の遺伝子座を含む領域の重複も発育遅滞の原因になる可能性が報告されている。そこで、本研究ではCHD8機能喪失型マウス(ノックアウトマウス)とCHD8機能獲得型マウス(トランスジェニックマウス)の表現型を比較することで、分子-細胞-回路-行動の階層縦断的に、そして構成的に発達障害の病態生理を明らかにし、発達障害の発症メカニズムの解明と新しい治療法の確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) CHD8機能獲得型マウスの作製

遍在的に発現しているROSA26遺伝子座にCHD8のcDNAをノックインし、内因性のROSA26プロモーター下にCHD8が発現誘導されるマウスを作製する。このCHD8過剰発現マウスを用いて網羅的な行動テストバッテリーを行い、ヒトのCHD8重複症候群と同様の行動異常を示すかどうかを明らかにする。CHD8重複症候群の患者では発育遅滞や学習障害、攻撃的行動が観察されているため、特にこれらの行動異常に着目して解析を行う。

### (2) CHD8機能喪失/機能獲得が遺伝子発現に与える影響の解析

CHD8機能喪失型マウスおよび機能獲得型マウスを用いて、胎仔脳から神経幹細胞を単離し、RNA-seq解析により遺伝子発現パターンを調べる。また同様に神経幹細胞を用いて抗CHD8抗体によるChIP-seq解析を行い、CHD8の標的遺伝子を明らかにする。標的遺伝子候補の中で、CHD8のヘテロ欠損と過剰発現で発現レベルが逆相関している遺伝子は、真のCHD8標的遺伝子であると推察される。このように解析結果を比較することでCHD8の真の標的遺伝子を同定し、その量的変化が神経発生に与える影響を明らかにする。

### (3) CHD8 機能喪失/機能獲得がニューロンやグリア細胞に与える影響の解析

CHD8 機能喪失型マウスおよび機能獲得型マウスの特定の脳領域における電気生理学的解析を行う。CHD8 を機能喪失/機能獲得させた神経の電気生理学的特性を比較し、共通点と相違点を明らかにする。さらに、ニューロンやグリア細胞の形態や細胞数の変化、神経細胞同士のシナプス形成やスパインの数などの変化を病理学的解析により明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 神経前駆細胞/幹細胞における Chd8 のアブレーションは、成長遅延と小脳低形成をもたらす

まず、様々な発生段階におけるマウスの大脳および小脳における Chd8 の発現を調べた。大脳における Chd8 mRNA の量は、生後 (P) 0 日目と比較して生後発生中に減少し、これまでの観察結果と一致した。一方、小脳における Chd8 の発現は、出生後に徐々に増加した。脳の発生における CHD8 の役割を調べるため、Chd8 対立遺伝子をフロックスしたマウスと、神経前駆/幹細胞で活性を示すマウス Nestin プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウスを交配し、Nestin-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスを作製した。その結果、大脳および小脳において、Chd8 フロックス化対立遺伝子が Cre により効率的に欠失することが確認された。Nestin-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスはほぼ予想されるメンデル比で生まれたが、これらの動物はその後、対照同腹子と比較して成長遅延と体重減少が現れ、そのほとんどが 3 週齢前に死亡した。Nestin-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスの脳もコントロールの同腹子に比べ小さく、P14 で著しい小脳低形成を示した。小脳の病理組織学的解析では、出生後の Nestin-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスにおいて、葉状化の顕著な異常と、基底部分および半球の小脳低形成が認められた。これらの結果は、CHD8 が小脳の正常な発生に必須であることを示唆するものであった。

### (2) 小脳顆粒ニューロン前駆細胞 (GNP) における Chd8 の欠損が小脳奇形を生む

小脳発生における CHD8 の機能をさらに検討するため、Chd8<sup>F/F</sup> マウスを GNP 特異的 Atoh1 プロモーターまたはプルキンエ細胞特異的 Pcp2 プロモーターの制御下で Cre トランスジーンを保有するマウスと交配した。その結果、Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> および Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスは成体まで生存し、体重も正常だった。しかし、脳の全体的な大きさや大脳の重量は正常に見えたのに対し、小脳の重量は Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスで対照動物と比較して著しく減少した。Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスでは、小脳重量の同様の減少は明らかでなかった。病理組織学的解析の結果、Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスでは、P0 から小脳虫部の小葉 I~V の顆粒層のサイズが著しく減少し、小脳の前部への Atoh1-Cre 発現の局在と一致する。また、成体 Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスの小脳小葉 I~V の顆粒層における一部のプルキンエ細胞 (カルビンディン陽性細胞) の異常分布が観察された。ゴルジ染色した脳切片の Sholl 解析により、Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスのプルキンエ細胞の樹状突起の複雑さがコントロールマウスと比較して著しく減少していたことから、CHD8 欠損による顆粒層の異常が副次的に影響していると考えられた。Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスとは対照的に、Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスは小脳低形成やプルキンエ細胞の異常表現型が認められなかった。これらのデータから、Nestin-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスで見られる小脳低形成は、Chd8 変異によって誘導された GNP 自律的な異常の結果であることが示唆された。

Atoh1-Cre は GNP に加えて耳毛細胞、前庭神経細胞、蝸牛神経細胞にも発現していることが示されていることから、Atoh1-Cre による Chd8 切除が内耳毛細胞や蝸牛神経細胞の発生に影響を与えるかどうかを検討した。ファロイジン染色で可視化した有毛細胞の形態は、コントロールマウスと Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスの間で区別がつかないことが判明した。さらに、20~80 dB の刺激に対する聴性脳幹反応は、コントロールマウスと Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスの間で差はなかった。このように、Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスでは、耳毛細胞や蝸牛ニューロンの発生は正常であるように見え、これらの細胞における Chd8 欠失が小脳発生に及ぼす影響は小さいことが示唆された。

### (3) CHD8 は GNP の増殖と分化を制御する

次に、Chd8 欠失によって引き起こされる小脳低形成のメカニズムを探った。GNP の増殖を評価するために、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) パルスチェイス解析を実施した。BrdU で 2 時間パルス標識したところ、Pax6<sup>+</sup> GNP のうち BrdU 取り込みが陽性な細胞数は、胎生 (E) 17.5 日目では変化しなかったが、Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスでは P0、P3 とともにコントロール動物と比較して少なかった。小脳におけるカスパーゼ 3 の切断型に陽性な細胞 (アポトーシス細胞) の頻度は、コントロールと Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスの間で差がなかった。また、P7 のコントロールマウスと Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスにおいて、BrdU で 48 時間パルス標識し、GNP の分化能を調べた。EGL において最近細胞周期から外れた GNP (BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup>) の頻度は、変異マウスではコントロール動物よりも有意に低かった。このように、EGL における BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup>細胞の割合は変異体マウスで再び低くなったが、小脳皮質における BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>+</sup>または BrdU<sup>+</sup>/Pax6<sup>+</sup>細胞の数は Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスで著しく増加した。GNP は EGL で活発に増殖し、細胞周期から外れた後に大脳皮質に移動することを考えると、これらの細胞集団の変化は、Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup> マウスにおいて GNP の細胞周期終了が進み、EGL から早期に剥離したことを示していると考えられる。

次に、EGL の前駆細胞プールから離脱したこれらの細胞が成熟した神経細胞になったかどうかを調べた。大脳皮質の NeuN<sup>+</sup>/Pax6<sup>+</sup>成熟ニューロンの数は、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスではコントロールマウスに比べて著しく減少した。これは、CHD8 欠損 GNP は早期の分化を行うが完全に成熟しないことを示唆している。これらの結果から、*Chd8* 欠損に伴う小脳低形成は、CHD8 欠損 GNP の増殖抑制と早期分化の結果、EGL の前駆細胞プールが早期に枯渇したことに起因すると考えられる。

#### (4) CHD8 は小脳顆粒ニューロン (CGN) のシナプス前およびシナプス後の完全性に必要である

小脳の形態異常が *Chd8* 変異マウスの生理的表現型と関連している可能性があるかどうかを調べるため、電気生理学的解析を行った。まず、成体コントロールマウスと *Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの小脳において、CGN の平行線維 (PF) からプルキンエ細胞への神経伝達を検討した。PF 刺激により誘発される興奮性シナプス後電流 (EPSC) は、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスのプルキンエ細胞ではコントロールマウスのそれよりも著しく小さかった。*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスのシナプス前機能を評価するために、様々な刺激間隔における EPSC のペアパルス比を測定した。ペアパルス促進は、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの PF-プルキンエ細胞シナプスで増加していることがわかり、シナプス前神経伝達物質放出の確率が低下していることを示唆する。次に、コントロールマウスと *Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの CGN から、小型 EPSC (mEPSC) と小型抑制性シナプス後電流 (mIPSC) の記録を行った。*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスでは、mEPSC のイベント数ではなく、振幅が有意に減少した。また、mIPSC の振幅とイベント数の両方が有意に減少した。これらの結果は、CGN における *Chd8* のアブレーションが、シナプス後受容体の機能を変化させることを示唆している。以上のことから、電気生理学的解析により、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの CGN において、シナプス前およびシナプス後の機能が低下していることが明らかになった。

#### (5) GNP 特異的な *Chd8* 欠損マウスが運動行動障害を示す

小脳が運動協調や学習だけでなく ASD 関連行動にも寄与することを踏まえ、GNP 特異的およびプルキンエ細胞特異的 *Chd8* 欠損マウスに運動または他の行動異常が現れるかどうかを検討した。ワイヤーハングテストにおける握力および転倒までの潜伏時間は、遺伝子型間で差がなかった。オープンフィールド試験においても、総移動距離や中央空間での滞在時間に遺伝子型間の差は検出されなかった。ロータロッドテストでは、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスが加速するロータロッド上で転倒せずにいられる時間がコントロールマウスと比較して著しく減少しており、運動行動の異常が示唆された。*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスは、試行回数が増える (ロータロッドから落ちるまでの時間が長くなる) ほど成績が良くなり、運動学習に異常がないことが示唆された。一方、このテストでは、*Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* とコントロールマウスの間に有意な差は見られなかった。また、床面より高く設置され、ゴールにつながる幅の広いまたは狭い梁に沿ってマウスが歩行するバランスビーム試験では、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスでは、コントロールマウスと比較してゴールへの到達時間が長くなり、運動協調性とバランス感覚の異常が示唆された。*Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスのゴール到達遅延時間は、コントロールマウスと同程度であった。

次に、ASD の顕著な特徴である社会的行動の障害を評価するために行動試験を実施した。全身 *Chd8* ヘテロ接合体変異マウスは社会的相互作用の異常を示すが、社会的相互作用試験中の社会的接触回数および総接触時間は、対照マウスと *Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* または *Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスとの間に差がなかった。また、社交性や社会的新奇性への選好性などの社会的行動を評価するために、三部屋式社会性行動試験を実施した。三部屋式社会性行動試験では、変異体および対照動物は新規マウスに対して有意な選好を示し、選好指数は遺伝子型間で差がなかった。社会性-新規性選好試験では、対照動物 (*Chd8<sup>+/+</sup>* および *Atoh1-Cre/Chd8<sup>+/+</sup>*) および変異体 (*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>*、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>*、*Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* および *Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>*) マウスは、見慣れたマウスよりも見知らぬマウスを有意に選好し、選好指数もまた遺伝子型間で差がなかった。これらの結果から、これらの変異マウスは、社会性や社会的新規性選好に関して正常であることが示唆された。さらに、高架式十字迷路試験による不安様行動の評価では、オープンアームにいる時間や入場回数に遺伝子型間の差は見られなかった。反復掘削行動の程度を評価するため、20 個のビー玉を入れた寝具を入れたケージに被験マウスを入れ、マウスが埋めたビー玉を数えた。埋まったビー玉の数は、遺伝子型間で有意な差は見られなかった。これらの結果から、*Chd8* 変異による小脳の機能異常は、運動行動障害をもたらすが、ASD 関連行動には結びつかないことが示唆された。

#### (6) CHD8 は GNP 分化時の神経系遺伝子の発現に必要である

小脳発生における CHD8 の機能をさらに検討するため、*Chd8<sup>F/F</sup>* マウスを GNP 特異的 *Atoh1* プロモーターまたはプルキンエ細胞特異的 *Pcp2* プロモーターの制御下で *Cre* トランスジーンを保有するマウスと交配した。その結果、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* および *Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスは成体まで生存し、体重も正常だった。しかし、脳の全体的な大きさや大脳の重量は正常に見えたのに対し、小脳の重量は *Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスで対照動物と比較して著しく減少した。*Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスでは、小脳重量の同様の減少は明らかでなかった。病理組織学的解析の結果、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスでは、P0 から小脳虫部の小葉 I~V の顆粒層のサイズが著しく減少し、小脳の前部への *Atoh1-Cre* 発現の局在と一致する。また、成体 *Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの小脳小葉 I~V の顆粒層における一部のプルキンエ細胞 (カルビンディン陽性細胞) の異常分布が観察

された。ゴルジ染色した脳切片の Sholl 解析により、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスのプルキンエ細胞の樹状突起の複雑さがコントロールマウスと比較して著しく減少していたことから、CHD8 欠損による顆粒層の異常が副次的に影響していると考えられた。*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスとは対照的に、*Pcp2-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスは小脳低形成やプルキンエ細胞の異常表現型が認められなかった。これらのデータから、*Nestin-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスで見られる小脳低形成は、*Chd8* 変異によって誘導された GNP 自律的な異常の結果であることが示唆された。

CHD8 が GNP の遺伝子発現を制御する可能性のある分子メカニズムについて理解を深めるため、CHD8 に対する抗体を用いて、これらの細胞のクロマチン免疫沈降-配列決定 (ChIP-seq) 解析を実施した。CHD8 との結合を示す全ピークのかかなりの割合が、プロモーター (転写開始部位 (TSS) に対して -1~+1 kb) 周辺で検出された。これらの結果を、GNP から抽出した全 RNA を用いて行った RNA-sequencing (RNA-seq) 解析の結果と統合すると、CHD8 は活発に発現する遺伝子の TSS 周辺に優先的に濃縮されていることが明らかになった。次に、P7 の *Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* およびコントロールマウスから単離した GNP を用いて、RNA-seq 解析を実施した。*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの GNP では、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>+/+</sup>* マウスの GNP と比較して 317 遺伝子の発現レベルが低下し、196 遺伝子の発現レベルが上昇した。発現量の異なる遺伝子のうち、75 個のダウンレギュレーション (23.7%) および 14 個のアプレギュレーション (7.1%) の遺伝子は、ChIP-seq データによって特定された CHD8 ターゲットだった。ダウンレギュレートされた 75 個の CHD8 標的遺伝子のジーンオントロジー (GO) 解析では、「シナプス」および「シナプス後膜」、*Slc17a7*、*Snap25*、*Cadps2*、*Cbln1*、*Kcnd2*、*Gabra2*、*Gabrb3* などの神経機能に関する用語に有意な濃縮が見られた。*Slc17a7* 遺伝子にコードされ、PF-プルキンエ細胞シナプスにおける特異的なシナプス前マーカーである VGLUT1 タンパク質の発現は、P7 において *Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの小脳で著しく減少した。一方、登上線維-プルキンエ細胞シナプスにおける特異的なシナプス前マーカーである VGLUT2 の発現は、両遺伝子型間で差がなかった。さらに、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスでは、分子層における VGLUT1 陽性パングタが *Atoh1-Cre/Chd8<sup>+/+</sup>* マウスと比較して有意に減少しており、CHD8 欠損 GNP におけるシナプス関連遺伝子の発現低下により PF シナプス欠損が生じることを示していると考えられた。また、CGN で選択的に発現する 50 の遺伝子について、RNA-seq データの遺伝子セット濃縮解析 (GSEA) を行った。これらの CGN 特異的遺伝子の発現は、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの細胞では、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>+/+</sup>* マウスの細胞と比較して低下していた。また、GSEA により、CHD8 欠損 GNP において、神経細胞の移動に関連する遺伝子の発現が有意に低下していることが明らかになった。これらの結果から、CHD8 は多くのシナプスや CGN 関連遺伝子の発現を制御し、それによって GNP の分化を促進している可能性が高いことが示唆された。

また、RNA-seq データから、CHD8 欠損 GNP では E2F 標的遺伝子の発現が著しく低下しており、CHD8 欠損 GNP の増殖抑制と一致している。転写因子の E2F ファミリーは、細胞周期の進行や細胞増殖に必要な遺伝子の発現に必須の役割を果たし、CHD8 は細胞周期の G1-S 移行に必要である。さらに、免疫プロット解析の結果、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの小脳細胞では、プロテアソーム阻害剤 MG132 で 6 時間処理してもサイクリン D1 の発現が低下しており、サイクリン D1 のプロテアソーム依存分解が *Chd8* 切除により促進されていないことが示唆された。その代わりに、*Chd8* のアブレーションにより、小脳におけるサイクリン D1 の存在量は減少した。これらの結果から、CHD8 の欠損は、細胞周期制御因子の発現を転写レベルで阻害することにより、前駆細胞の増殖能を減弱させることが示唆された。

#### (7) CHD8 は GNP の分化を促進するアクセシブルなクロマチンランドスケープを形成している

次に、GNP の CHD8 結合部位が、ヒストン修飾部位やアクセシブルな DNA 領域と一致するかどうかを検討した。そこで、GNP の CHD8 ChIP-seq データを、以前に発表されたヒストン 3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac、活性クロマチンマーカー) または CHD7 の ChIP-seq データ、さらにはトランスポザーゼアクセシブルクロマチンシーケンス (ATAC-seq) プロファイルと比較した。高信頼度の CHD8 ChIP-seq ピーク周辺のヒートマップおよび密度プロファイルは、CHD8 が CHD7、H3K27ac、およびアクセシブルなクロマチン部位と著しく共局在することを明らかにした。また、*Cadps2*、*Pax6*、*Reln* などの GCN 関連遺伝子を含む遺伝子の TSS 周辺領域において、CHD8 ピークが H3K27ac ピークやアクセシブルなクロマチンサイトと重なることがわかった。FAIRE (ホルムアルデヒドによる調節要素の分離) 解析により、*Atoh1-Cre/Chd8<sup>F/F</sup>* マウスの小脳では、コントロールマウスと比較して、これらの遺伝子のプロモーターにおけるオープンクロマチンの範囲が減少していた。さらに、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、CHD8 の過剰発現が *Neuro2A* 細胞におけるこれらの遺伝子のプロモーター活性を上昇させることが示された。これらの結果から、CHD8 によるクロマチンアクセシビリティと遺伝子の転写活性の制御が、GNP の発生に寄与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8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 7件）

1. 著者名 Shiraishi Taichi, Katayama Yuta, Nishiyama Masaaki, Shoji Hiroataka, Miyakawa Tsuyoshi, Mizoo Taisuke, Matsumoto Akinobu, Hijikata Atsushi, Shirai Tsuyoshi, Mayanagi Kouta, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 -
2. 論文標題 The complex etiology of autism spectrum disorder due to missense mutations of CHD8	5. 発行年 2024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/s41380-024-02491-y	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 Nitahara Kenta, Kawamura Atsuki, Kitamura Yuka, Kato Kiyoko, Namekawa Satoshi H, Nishiyama Masaaki	4. 巻 52
2. 論文標題 Chromatin remodeler CHD8 is required for spermatogonial proliferation and early meiotic progression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2995 ~ 3010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad1256	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

1. 著者名 Tanaka Yudai, Nakata Takuto, Hibino Hiroshi, Nishiyama Masaaki, Ino Daisuke	4. 巻 18
2. 論文標題 Classification of multiple emotional states from facial expressions in head-fixed mice using a deep learning-based image analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0288930	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 Kawamura Atsuki, Nishiyama Masaaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Deletion of the autism-related gene Chd8 alters activity-dependent transcriptional responses in mouse postmitotic neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	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/s42003-023-04968-y	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 Ino Daisuke, Tanaka Yudai, Hibino Hiroshi, Nishiyama Masaaki	4. 巻 19
2. 論文標題 A fluorescent sensor for real-time measurement of extracellular oxytocin dynamics in the brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Methods	6. 最初と最後の頁 1286 ~ 1294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-022-01597-x	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 Nita Akihiro, Muto Yoshiharu, Katayama Yuta, Matsumoto Akinobu, *Nishiyama Masaaki, *Nakayama Keiichi I. (*Corresponding authors)	4. 巻 34
2. 論文標題 The autism-related protein CHD8 contributes to the stemness and differentiation of mouse hematopoietic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108688 ~ 108688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108688	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 Kawamura Atsuki, Katayama Yuta, Kakegawa Wataru, Ino Daisuke, Nishiyama Masaaki, Yuzaki Michisuke, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 35
2. 論文標題 The autism-associated protein CHD8 is required for cerebellar development and motor function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108932 ~ 108932
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108932	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 Cherepanov Stanislav M., Gerasimenko Maria, Yuhi Teruko, Furuhashi Kazumi, Tsuji Chiharu, Yokoyama Shigeru, Nakayama Keiichi I., Nishiyama Masaaki, Higashida Haruhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Oxytocin ameliorates impaired social behavior in a Chd8 haploinsufficiency mouse model of autism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Neuroscience	6. 最初と最後の頁 32 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12868-021-00631-6	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8件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masaaki Nishiyama
2. 発表標題 Identification of neural circuitry in autism spectrum disorder using human-animal models
3. 学会等名 第64回日本神経病理学会総会学術研究会 / 第66回日本神経化学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西山 正章
2. 発表標題 ヒト型モデル動物を用いた自閉症の神経回路の同定と治療法開発への応用
3. 学会等名 第17回自閉症学研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 西山正章
2. 発表標題 自閉症の発症メカニズムの解明と創薬開発への応用 自閉症は大人になっても治せるか？
3. 学会等名 第7回連合大学院小児発達学研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西山正章
2. 発表標題 ヒト型モデル動物を用いた自閉症の神経回路の同定と治療法開発への応用
3. 学会等名 浜松医科大学研究戦略セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 西山 正章
2. 発表標題 自閉症の発症メカニズムの解明と創薬開発への応用：自閉症は大人になっても治せるか？
3. 学会等名 第18回日本予防医学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西山 正章
2. 発表標題 自閉症の発症メカニズムの解明と創薬開発への応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川村 敦生、片山 雄太、中山 敬一、西山 正章
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子Chd8の変異による自閉症発症に關与する神経細胞種の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本 康寛、川村 敦生、魏 威凜、Ayhan Yurtsever、白石 大智、中山 敬一、古寺 哲幸、福間 剛士、西山 正章
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子の動態觀察による自閉症の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西山正章	4. 発行年 2022年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 288
3. 書名 論文図表を読む作法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学医薬保健研究域医学系 組織細胞学 <a href="http://ana1.w3.kanazawa-u.ac.jp/">http://ana1.w3.kanazawa-u.ac.jp/</a>
---

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