

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15726

研究課題名（和文）遺伝子重複モデルマウスを用いた発達障害の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular basis of developmental disorders using a novel mouse model of gene duplication

研究代表者

川村 敦生（Kawamura, Atsuki）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：40898087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：自閉症原因遺伝子であるCHD8を過剰発現させたマウスを作製した。このマウスはいくつかの行動試験において顕著な行動異常を示すことが明らかになった。さらにこのマウスの胎生期脳を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、神経分化の制御に関わる転写因子の発現が変化しており、神経発生遅延が起こることが明らかになった。以上の解析から、CHD8過剰発現による神経発生の異常が行動に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CHD8遺伝子をノックインしたマウスの作製に成功した。さらにこのマウスは様々な行動異常を示すことから、発達障害のモデルマウスとしての有用性が示唆された。今後このモデルマウスを用いて発達障害の発症メカニズム解明や治療応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We generated autism risk factor Chd8 overexpressing mice. Our comprehensive behavioral analysis revealed that the transgenic mice manifested some behavioral abnormalities. Furthermore, we performed RNA-seq analysis with embryonic brains of these mice and found that the expression of genes related to neuronal differentiation was altered in the transgenic mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：発達障害 自閉症 クロマチンリモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症（以下、自閉症）は36人に1人の割合で発症する神経発達障害で、コミュニケーションや社会的相互関係の質的障害、限定的な興味や強いこだわり等の症状を特徴とする。近年、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。われわれはヒト自閉症患者の 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、このマウスが自閉症様の行動異常を再現することを確認した [Katayama et al., *Nature* 537: 675-9 (2016)]。

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。上述のように、CHD8 遺伝子の変異は自閉症と強く関連づけられている一方で、この CHD8 の遺伝子座を含む領域の重複が発達障害の患者から相次いで発見されている。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いる。しかし、CHD8 の過剰発現がなぜヒトの発達障害を引き起こすのかについては、詳しいメカニズムは全く明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、新たに遺伝子重複による発達障害のモデルマウスを確立し、発達障害の発症メカニズムを分子レベルで明らかにすることによって、疾患治療への応用を目指す。また、CHD8 の過剰発現に加えて機能喪失も合わせた両面から解析を行うことで、これまで見出せなかった遺伝子発現や神経発生における CHD8 の本質的な役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

CHD8 を過剰発現させたマウスの作製を行う。このマウスの表現型を解析することより、CHD8 の過剰発現が神経発生や行動に与える影響について検討する。さらに CHD8 欠損マウスの解析も同時に行い、表現型や CHD8 の機能を比較することで、CHD8 の量的変化が神経発生に与える影響についての検討を行う。

## 4. 研究成果

### (1) CHD8 過剰発現マウスの作製

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の作製に成功した。CHD8 遺伝子を 1 アレルから発現させたマウスは少し体が小さいが正常に生まれ、CHD8 が正常の 1.5 倍（重複相当）発現していた。一方で CHD8 遺伝子を 2 アレルから発現させたマウスは出生後に死亡することが判明し、適切な発現量が個体発生に重要であることが分かった。

### (2) CHD8 過剰発現マウスの行動解析

この新規に作製した遺伝子重複マウスを用いて網羅的な行動バッテリーを行ったところ、このマウスはいくつかの行動試験において顕著な行動異常を示し、CHD8 重複症候群の患者で観察される症状の多くを再現していた。われわれの作製した CHD8 過剰発現マウスは発達障害のモデルマウスとしての有用であることが示唆された。

### (3) CHD8 過剰発現マウスの遺伝子発現解析

このマウスの胎生期脳を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、神経分化の制御に関わる転写因子の発現が変化しており、神経発生遅延が起こることが明らかになった。また ChIP-seq 解析から CHD8 は発現が変化していた遺伝子のプロモーター領域に結合していた。さらに、CHD8 過剰発現により神経の機能に関わる遺伝子領域のクロマチンアクセシビリティに変化が見られた。以上の解析から、CHD8 過剰発現によるクロマチン構造異常が神経発生に影響を与える可能性が示唆された。

### (4) CHD8 欠損マウスの遺伝子発現解析

CHD8 の欠損が遺伝子発現に与える影響の解析を行った。CAG-CreER を用いてタモキシフェン誘導型 CHD8 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、有糸分裂後ニューロンや成体で CHD8 を欠損させたときの遺伝子発現やクロマチンアクセシビリティの変化について検討した。その結果、CHD8 欠損により神経活動依存的に発現が誘導される *Fosb* などの最初期遺伝子の発現が低下していることが判明した (図 1 A)。さらに、最初期遺伝子のゲノム領域のクロマチンアクセシビリティは CHD8 欠損により低下していることも明らかになった (図 1 B) [Kawamura et al., *Commun. Biol.* in press]。一方で CHD8 の欠損はヒストン修飾 H3K4me3 や RNA ポリメラーゼ II のリクルートメントには大きな影響を与えていなかった。今後は CHD8 過剰発現によって最初期遺伝子の発現が変化するかどうかなどについても検討し、CHD8 の分子機能の解析を進めていく。

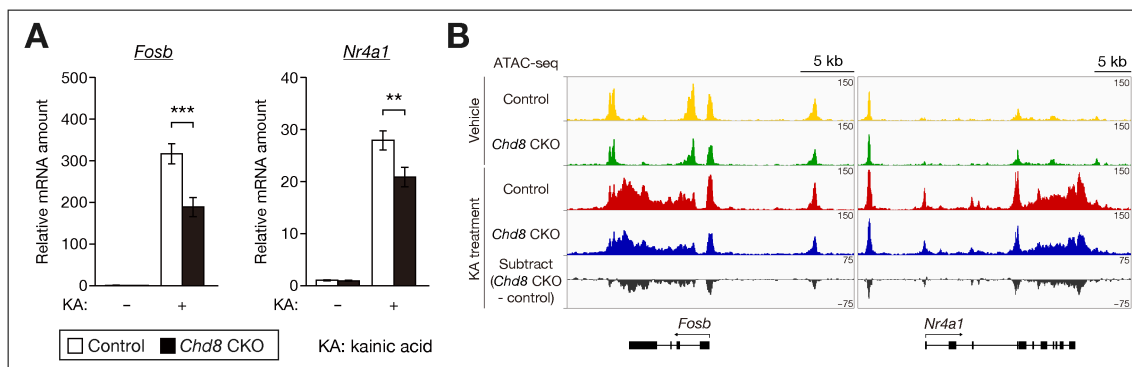


図 1 : CHD8 による最初期遺伝子の発現制御

### (5) CHD8 欠損マウスの行動解析

タモキシフェン誘導型 CHD8 コンディショナルノックアウトマウスを用いて成体で CHD8 をホモ欠損させたマウスを作製し、行動解析を行った。その結果、このマウスでは記憶や学習、不安様行動などの行動には大きな変化が見られなかった。これらの結果から胎生期や生後初期における CHD8 の機能がより重要であることが示唆された。今後は神経発生の早いタイミングにおける CHD8 の役割に着目して解析を進めていく。

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 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 Kawamura Atsuki, Nishiyama Masaaki	4. 巻 in press
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） なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Atsuki Kawamura, Yuta Katayama, Keiichi I. Nakayama, and Masaaki Nishiyama
2. 発表標題 Identification of neural cell types responsible for autistic-like phenotypes by Chd8 mutation
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
---------	---------