

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 6 日現在

機関番号：83902
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2011～2014
 課題番号：23591525
 研究課題名(和文)モワット-ウィルソン症候群原因遺伝子SIP1の脳組織とその機能構築における役割

 研究課題名(英文)The study on the role of SIP1, the causative gene for Mowat-Wilson syndrome in human, in structural and functional development of brain using mouse system

 研究代表者
 東 雄二郎(Higashi, Yujiro)

 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・部長

 研究者番号：30181069

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1) SIP1-EGFPレポーターノックインマウスを作製し、SIP1の脳における発現領域、発現細胞を詳細に解析し検討した。(2) モワットウィルソン症候群モデルマウスの作製を検討するために、コンディショナルノックアウト法を用いて、de novo型の変異モデルマウスを作出し、近交系マウスのgenetic backgroundを有した形でその表現型を検討した。(3) 種々のCreマウスを用いて、脳神経細胞においてSIP1を欠失させ、その表現型をみることで、脳におけるSIP1の機能について検討した。

研究成果の概要(英文)：1) We made the SIP1-EGFP knock-in reporter mouse and analyzed the SIP1-EGFP expression pattern in detail during pre- and post-natal brain development. 2) To make the model mouse for Mowat-Wilson syndrome, we used the conditional knockout of the SIP1 gene in male germ cells to escape the difficulty in maintaining the heterozygous SIP1 knockout mice and to mimic the de novo mutation in human. We then analyzed this model mouse if they showed the relevant phenotype in relation to the symptoms in Mowat-Wilson syndrome. 3) By crossing the various Cre mouse line with SIP1 flox mouse, the SIP1 gene was deleted in the specific regions or cells in mouse brain, and we analyzed the resulting phenotype from the morphological and functional viewpoints.

研究分野：分子生物学

キーワード：SIP1 zeb2 zfhx1b モワットウィルソン症候群 ノックアウトマウス ZFH1転写因子ファミリー 脳の構造と機能 脳

1. 研究開始当初の背景

Mowat-Wilson 症候群は、神経堤症の一つであるヒルシュプルング病患者の一部において、特徴的な顔貌など、一定の症状を共有する患者らの中から明らかにされてきた。即ち、その患者らのゲノム DNA の解析の結果、転写制御因子をコードする Smad- interacting protein 1 (以下 SIP1 と略す) 遺伝子に変異を生じていることが、申請者らの所属する発達障害研究所の若松らにより 2001 年に初めて明らかにされた(文献 1)。現在までの日本及び欧米からの報告をもとにすると、その有病率は必ずしも高くないが、精神遅滞、小頭症、てんかん等を伴う極めて重篤な疾患であり、胎生期における早期診断方法の開発や、また本症候群の理解と治療に向けた基礎的研究は必須である。また Mowat-Wilson 症患者は常に SIP1 遺伝子のヘテロ欠損 (ハプロ不全) であり (ホモ欠損は、後述するマウスの解析結果等から胎生致死と推察される)、このことは SIP1 が生命の維持にとっても極めて重要な因子であることを示している。本症候群の症状の中でも、全ての患者に共通して観察される最も重篤で特徴的な症状は精神遅滞であり (右表、枠内) SIP1 は脳の高次機能、特に記憶や学習などの知的能力に必須の因子であることを示している。本研究ではこのような SIP1 の脳における機能に注目し、個体レベルで明らかにすることを目標とする。

SIP1 転写制御因子は、その相同因子である δ -crystalline enhancer factor 1 (以下 δ EF1 と略す) と共に ZFX1 転写制御因子ファミリーを構成する。その構造は、このファミリーに特徴的なタンパク分子の構造をしている。申請者らのグループでは従来からこの ZFX1 転写制御因子ファミリーに関して、発生過程を含めたマウス個体レベルでの機能解析を行ってきた (文献 2, 3)。SIP1 因子は初期胚から胎児期を通じて神経組織での発現が高く、出生後においても脳、脊髄などの中枢神経系組織や神経堤細胞由来の末梢神経組織等で特に発現が高い。ヒトの Mowat-Wilson 症候群と遺伝子型的に同等である SIP1 ヘテロノックアウト (以下、KO と略す) マウスは、近交系 C57BL/6 系統への戻し交配を行うと、1, 2 週齢で致死となる。従って近交系 C57BL/6 系統では維持できず解析も不可能で

あった。そこで組織特異的なコンディショナル KO (以下、cKO と略す) マウス作製に必要な flox マウスを用い、これまでに神経堤細胞特異的 KO (Wnt1-cre (cre は Cre recombinase の略、以下同様) との交配)、前脳特異的 KO (Emx1-cre との交配) を行い、それぞれの組織で重要な役割を担っていることを報告してきた。Wnt1-cre を用いた神経堤細胞特異的 KO においては、ヒトのヒルシュプルング病に見られるような、遠位腸管神経節の欠損が観察された。また Emx1-cre を用いた前脳特異的 KO マウスの解析においては、SIP1 が海馬や脳梁の形成に何らかの役割を担っていることが示唆された (文献 4)。しかしながら、これらの cKO マウスでは、いずれも出生に至らない (Wnt1-cre の場合) か、出生後の成長が極度に悪くおよそ 3 週齢までに全て致死 (Emx1-cre の場合) となり、出生後の脳に関する詳細な解析は不可能であった。一方最近申請者らは、SIP1 タンパクの発現する組織、細胞、および細胞内局在を確実に同定するために、ジーンターゲティングを用いたノックイン法により、SIP1 の C 末端側に EGFP を融合させたタンパクを発現するマウス (SIP1-EGFP マウス) を作製した (未発表)。このマウスを用いて、生後 8 週齢の成熟した脳における SIP1 の発現部位を EGFP により可視化した。その結果、EGFP (即ち SIP1) の発現は海馬に強く発現していることが明らかとなった。このことはマウスにおいても SIP1 が脳の高次機能に関連する海馬において何らかの役割を担っている可能性を示唆する。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、まず上述した SIP1-EGFP マウスを用いて、脳の発達段階を追ったその発現の場所を詳細に調べる。脳組織での部位、細胞の種類、細胞内局在性を調べることは、SIP1 の機能を知る上で必須の情報である。これまでに、抗 SIP1 抗体による観察はあるが、上述した SIP1 の相同因子である δ EF1 との交差反応を起こすものが多く、正確な SIP1 の発現場所は記述されていない。また SIP1 は転写制御因子であり核内に存在するケースが多いと考えられるが、最近の報告では細胞質での局在が見られるという報告もある。そのような点を明確にするためにも、SIP1-EGFP マウスを用いる解析

は最終的な結論を得る有効な方法である。SIP1-EGFP マウスを作製しているのは申請者らのグループのみであり、本研究で初めて SIP1 の特異的な発現場所とその動態が明らかにされる。

(2) 本研究では、出生後の脳における SIP1 転写因子の機能に関して、マウス個体を用いて明らかにする。そのためには、出生後あるいはそれと前後して cre の活性を誘導可能な (変異核内レセプターと cre を融合した人工遺伝子を有し、ステロイドホルモン類似体投与によりその活性を誘導できる) マウスを用いる。具体的には、興奮性神経細胞を含む、特に海馬での cre 活性を誘導できる CamKIIa-creERT2 マウスや、神経細胞特異的に cre 活性を誘導する tau-crePR マウスを用いて、組織学的、行動学的解析等を行い、SIP1 転写因子の脳における機能について検討を行う。同様に SIP1 と同じ Zfhx1 転写制御因子ファミリーに属する δ EF1 は、SIP1 と重複した機能を持つ可能性は高い。そこで δ EF1 についても flox マウスを作製し、出生後の脳における機能について検討する。SIP1 と δ EF1 については、出生後の脳の機能に関する検討は未だ報告はなく、本研究が新規となる。

(3) 転写因子の機能はその標的遺伝子がどのようなものかによる。この点について、(2) で用いる cKO の変異マウスと野生型について、脳組織、あるいは海馬等に局限した材料で DNA マイクロアレイの比較解析を行い、どのような分子が制御されているかを明らかにすることで、SIP1 (あるいは δ EF1) の脳の高次機能における役割について何らかの示唆が得られると期待される。

3. 研究の方法

上記の目的のために、以下の研究方法を用いた研究計画を立てた。

① すでに作製している SIP1-EGFP マウスを利用して、特に出生後の脳における SIP1 の発現パターンを、組織、細胞、および細胞内局在を含めて詳細に解析する。

② SIP1 flox/flox (または flox/+) ; CamKIIa-creER/+ マウス、および SIP1 flox/flox (または flox/+) ; tau-crePR/+マ

ウスを用いて、出生後の脳の構築と機能に関して組織学的、行動学的解析を行う。

③ 上述 ② のそれぞれの変異マウスからの脳 (あるいは脳の一部の) 組織を用いて、マイクロアレイ等の解析を行い、SIP1 の制御する遺伝子候補を探索する。

④ SIP1 の相同因子である δ EF1 の flox マウスを新たに作製し、②と同様の解析を行う。

4. 研究成果

(1) SIP1 の脳内における発現部位の解析
モワットウィルソン症候群における精神運動発達遅滞の病因の解明を目指して、SIP1 の脳内における発現部位の特定を行った。SIP1 の遺伝子座に in-frame で GFP を導入したレポーターノックインマウスを用いて解析を行った。GFP 抗体によって検出される SIP1 の発現は、新生仔の海馬、大脳皮質、嗅球、小脳等で見られ、さらに側脳室で生じた新生神経細胞が嗅球へ向かう rostral migration stream に沿った発現や、脳梁や海馬采のオリゴデンドロサイト、縫線核のセロトニン神経などでも確認された。本結果は論文として公表した。

(2) モワットウィルソン症候群のモデルマウスの作製と解析
モワットウィルソン症候群の発症機構を知るために、この症候群のモデルマウスを使った解析は必須且つ有効である。その有力な候補として SIP1 ノックアウトヘテロ変異マウスが挙げられるが、これまでは系統維持された ICR バックグラウンドに戻し交配された SIP1 ノックアウトヘテロ変異マウスを用いて解析が行われてきた。しかしモワットウィルソン症候群は de novo 型の SIP1 遺伝子の突然変異により生じる。そこで、オスの精子で発現する Protamin-Cre マウスを用いて新規に de novo 型の SIP1 変異マウスを作製する系を確立した。この系を用いて生まれてきた SIP1 ノックアウトヘテロ変異マウスに関して、ヒトの症例と比較しながら解析を行っているが、頭蓋骨や脳梁形成に関して、ヒトと類似した表現型が観察され始めている。これらの点に関して、現在詳細に解析中である。

(3) SIP1 flox マウスを用いて、成体の脳における機能を知る目的で、次の Cre マウスと交配し、SIP1 コンディショナルノックアウトマウ

スの作製を行った。

(3-1) 神経細胞に分化した細胞で cre を発現する tau-cre マウスと交配し、まず胎生 18.5 日における脳における形態的な影響があるかどうか検討を行った。しかしながらこの過程において、tau-cre マウスの cre の発現が、少なくともオスの生殖細胞において発現することがわかり、tau-cre 遺伝子をオスを通して交配した場合、全身で SIP1 が欠損することがわかった。現在はメスを通して交配させた場合は神経細胞特異的であるのかを検討しているところであり、確認できれば、メスを通して tau-cre マウスとの交配を開始する予定である。

(3-2) タモキシフェン存在下で興奮神経細胞で cre が働くようになる、CamKII-creERT2 マウスと交配し、成体脳における SIP1 の機能を検討する。成体脳においては SIP1 は主に海馬錐体細胞での発現が強く、海馬での SIP1 の機能を検討することになる。現在、その形態的影響があるのかどうか観察しているところである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kurima, K., Hertzano, R., Gavrilova, O., Monahan, K., Shpargel, K. B., Nadaraja, G., Kawashima, Y., Lee, K. Y., Ito, T., Higashi, Y., Eisenman, D. J., Strome, S. E. and Griffith, A. J. A noncoding point mutation of zeb1 causes multiple developmental malformations and obesity in twirler mice. *PLoS Genet.* **7**: e1002307. (2011)
2. Weng, Q., Chen, Y., Wang, H., Xu, X., Yang, B., He, Q., Shou, W., Chen, Y., Higashi, Y., van den Berghe, V., Seuntjens, E., Kernie, S.G., Bukshpun, P., Sherr, E.H., Huylebroeck, D. and Lu, Q.L. Dual-Mode Modulation of Smad Signaling by Smad-Interacting Protein Sip1 Is Required for Myelination in the Central Nervous System *Neuron* **73**, 713-728, (2012)

3. Suzuki K, Yokoyama C, Higashi Y, Daikoku T, Mizoguchi S, Saika S, Yamada G. Wakayama symposium: epithelial-mesenchymal interaction regulates tissue formation and characteristics: insights for corneal development. *Ocul Surf.*10(4):217-220. (2012)
4. McKinsey, G.L., Lindtner, S., Trzcinski, B., Visel A., Pennacchio L.A., Huylebroeck, D., Higashi, Y. and Rubenstein, J.L. Dlx1&2-dependent expression of Zfhx1b (Sip1, Zeb2) regulates the fate switch between cortical and striatal interneurons *Neuron* **77**(1):83-98. (2013)
5. Nishizaki, Y., Takagi, T., Matsui, F. and Higashi, Y. SIP1 expression patterns in brain investigated by generating a SIP1-EGFP reporter knock-in mouse. *Genesis.* **52**:56-67. (2014)

[学会発表] (計 6 件)

1. B 細胞における転写因子 SIP1 の機能 ; B 細胞の成熟と AID 発現制御
林達成, 南部由希子, 眞野浩人, 東雄二郎, Kristin, V., Danny, H., 清水章, 菅井学 日本免疫学学会 (千葉) 2011. 11. 27
2. 高木豪、東雄二郎 de novo 型 Sip1 ヘテロ変異マウスを用いた Mowat-Wilson syndrome のモデル動物としての有用性の検討 第 35 回日本分子生物学会 (福岡) 2012 年 12 月 11 日
3. 東雄二郎、高木豪、西崎有利子、松井ふみ子、中西圭子、時田義人 dEF1/zeb1 は下垂体形成に必須である 第 35 回日本分子生物学会 (福岡) 2012 年 12 月 11 日
4. 高木豪、東雄二郎 モデルマウスを用いたモワット・ウィルソン症候群の病態形成の解析 第 36 回日本分子生物学会 (神戸) 2013 年 12 月 3 日

5. 西崎有利子、高木豪、松井ふみ子、東雄二郎、レポーターノックインマウスを用いたモワット-ウィルソン症候群の原因遺伝子 SIP1 の発現解析 第36回日本分子生物学会（神戸）2013年12月3日
6. 転写因子 Sip1 による IL-7 シグナルおよび免疫グロブリン遺伝子組換えの制御：林 達成、南部 由希子、眞野 浩人、Comijn J、東 雄二郎、Verschueren K、Huylebroeck D、清水 章、菅井 学 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、横浜

〔図書〕

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 雄二郎 (Higashi, Yujiro) (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所、周生期学部、部長)

研究者番号：30181069

(2) 研究分担者

西崎 有利子 (Nishizaki, Yuriko) (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所、周生期学部、リサーチレジデント)

研究者番号：90378901

(3) 連携研究者

該当なし