

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670517

研究課題名(和文) 自閉症スペクトラムの原因候補遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a candidate gene for autism spectrum disorder

研究代表者

中山 敬一 (Nakayama, Keiichi)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80291508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(Autism Spectrum Disorder: ASD)は、「対人コミュニケーション障害」と「活動と興味の範囲の著しい限局性」を主な特徴とする神経発達障害である。近年、ASD患者を対象とした大規模なゲノムスクリーニングが行われ、CHD8が最も有力な原因遺伝子候補の一つとして報告された。われわれはCHD8ヘテロ欠損マウスの行動解析を行った。するとCHD8ヘテロ欠損マウスはヒトのASD患者と同様に不安様行動の増加や社会性行動の異常が観察された。この結果からCHD8ヘテロ欠損マウスはASD様の症状を示す新規モデルマウスとしてASD研究に利用できると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、CHD8ヘテロ欠損マウスは自閉症スペクトラム障害(ASD)様の症状を示す新規モデルマウスとしてASD研究に利用できることが明らかとなった。これによってASDに対する新たな治療法の探索が容易になることが期待される。具体的には、CHD8欠損によって上昇してくる遺伝子産物に対する阻害剤をスクリーニングし、その中から本当にASDの治療に役立つ化合物を実際のマウス行動によって検証することができるようになるため、非常に社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Autism Spectrum Disorder (ASD) is a functional defect in neuronal development, characterized by communication problems and markedly restricted activity and interest of the patients. Recent several large-scale genome-wide screening studies identified CHD8 (chromodomain-helicase-DNA binding protein 8), a chromatin remodeling factor, as the most frequently mutated gene in ASD patients. We have generated mice heterozygous for CHD8 gene deletion and examined their behavior. A line of behavioral battery tests revealed that CHD8 heterozygous knockout mice exhibited strong anxiety and paradoxical social activities, reminiscent of human ASD. We also studies molecular machinery of the ASD pathogenesis by RNA-seq and ChIP-seq with the use of the next-generation sequencer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 クロマチンリモデリング ノックアウトマウス 行動

## 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、社会的相互関係やコミュニケーションの質的障害および常同・反復的な興味・行動で特徴付けられる神経発達障害である。ASD は遺伝的素因を持つことが強く示唆されているが、その病因はほとんど不明であった。最近、複数のグループが ASD 家系の大規模エクソーム解析によって、最も有力な ASD 原因候補遺伝子としてクロマチンリモデリング因子 CHD8 を同定し、世界中で大きな反響を呼んでいる。われわれはこの CHD8 が p53 に結合し、アポトーシスを抑制することを発見し、これが発生期の器官形成に重要な役割を果たしていることを示してきた [Nishiyama et al., *Nature Cell Biol.* 11: 172-82 (2009)]。CHD8 は p53 とヒストン H1 との三量体を形成することによって、p53 の転写活性を抑制し、最終的にアポトーシスを阻害する。また最近われわれは、CHD8 によるヒストン H1 のリクルートが Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の抑制にも必須であることを明らかにした [Nishiyama et al., *Mol. Cell. Biol.* 32: 501-12 (2012)]。

## 2. 研究の目的

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は遺伝的素因を持つことが強く示唆されているが、その病因はほとんど不明である。最近 ASD 家系の大規模エクソーム解析の結果から、ASD の最も有力な原因候補遺伝子としてクロマチンリモデリング因子 CHD8 が同定され、世界中で大きな反響を呼んでいる。われわれは世界で初めて CHD8 の機能解析を行い、CHD8 がクロマチン上にリンカーヒストン H1 を呼び込むことによって p53 や  $\beta$ -カテニンの機能を抑制することを発見した [Nishiyama et al., *Nature Cell Biol.* 11: 172 (2009)]。本研究では、われわれが作製した CHD8 遺伝子改変マウスを用いて、1) 自閉症モデルマウスの確立、2) 自閉症責任病変の特定、3) 神経発生と自閉症の分子機構の解明、4) 自閉症治療への応用、の 4 点を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 種々の CHD8 遺伝子改変マウスの作製と解析

ASD 患者のエクソーム解析で同定された de novo 変異によって、CHD8 はヘテロ欠損になることが予想されている。われわれは既に、CHD8 ノックアウトマウスおよび神経特異的 CHD8 ノックアウトマウスを作製し、前者は発生早期に、後者は幼少期に死亡することを明らかにした。CHD8 ヘテロ欠損マウスおよび CHD8L 型アイソフォームヘテロ欠損マウスは外観的に正常で長期生存可能であるため、これらのマウスを用いて行動解析を行い、自閉症様行動の有無について検証する。

### (2) 自閉症責任病変の特定

CHD8 遺伝子改変マウスが自閉症モデルとして確立されれば、そのマウスの病理学的解析によって、責任病変とそれが出現する時期を特定する。また特定した責任病変の神経細胞を用いて電気生理学的解析を行う。さらにわれわれが作製した CHD8 コンディショナルノックアウトマウスを責任部位および時期特異的 Cre トランスジェニックマウスと交配することによって、同様の自閉症症状が再現されるかどうかを検討する。

### (3) 自閉症の発症メカニズムの解明

まず Cre-loxP システムを用いて CHD8 を発現誘導できる発現誘導型 CHD8 トランスジェニックマウスを作製し、Nestin-Cre トランスジェニックマウスと交配することによって、神経特異的に CHD8 を発現誘導したマウスを作製する。このマウスの神経細胞あるいは脳組織を用いて複合体解析および ChIP-Seq 解析を行い、治療のための分子標的を探索する。同定した標的遺伝子候補は神経特異的 CHD8 ノックアウトマウスを用いてバリデーション研究を行う。

### (4) 自閉症治療への応用

CHD8 ヘテロ欠損マウスが自閉症モデルとして確立されれば、神経特異的 CHD8 トランスジェニックマウスと交配し、その表現型が回復するかどうかを検討する。また責任病変が特定されれば、責任部位および時期特異的に CHD8 を発現誘導したトランスジェニックマウスを作製し、同様に表現型が回復するかどうかを検討する。さらに、確立した自閉症モデルマウスに治療可能性のある向精神薬や現在開発中の新薬を投与してその有効性を評価し、標的分子が同定されれば、その阻害剤の探索を開始して、将来的には上記モデルマウスに投与して効果判定を行う。

## 4. 研究成果

まず、既に作製済みである CHD8 ヘテロ欠損マウスおよび CHD8L 型アイソフォームヘテロ欠損マウスを用いて、種々の行動バッテリーによる試験を行った。その結果、両者の系統において、強度の不安様行動が顕著に認められた。またその他の社会性行動についても、奇異的な異常がいくつか認められた。このことにより、CHD8 のヘテロ欠損はヒトだけでなく、マウスにおいても精神・行動異常を引き起こすことが明らかとなった。

また本マウスの病理学的解析により、生直後から顕著な小脳の発達障害を認めた。これらのマウスの脳より抽出液を調製し、次世代シーケンサーを使用してその RNA-seq と ChIP-seq を行い、遺伝子発現パターンおよび CHD8 の結合領域を網羅的に検討したところ、いくつかの興味深い知見を得た (論文準備中)。

さらに神経特異的 CHD8 トランスジェニックマウスを作製した。この際に、選択するプロモーター及びコピー数の選択によって、正常の 2 ~ 5 倍程度の過剰発現をする系統を

得た。但し、最も強い発現をするトランスジェニックマウスにおいては、原因不明の進行性神経麻痺が生じることが明らかとなった。現在、CHD8 低発現トランスジェニックマウス系統を神経特異的 CHD8 トランスジェニックマウスと交配して、その行動学的異常が回復するかという治療実験を施行している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K. I., Nakayama, K.: Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene*, (査読有) 32: 1921-1932 (2013). doi: 10.1038/onc.2012.213.

Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K. I., Gotoh, Y.: p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J.*, (査読有) 32: 970-981 (2013). doi: 10.1038/emboj.2013.50.

Khor, E. C., Abel, T., Tickner, J., Chim, S. M., Wang, C., Cheng, T., Ng, B., Ng, P. Y., Teguh, D. A., Kenny, J., Yang, X., Chen, H., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Pavlos, N., Zheng, M. H., Xu, J.: Loss of protein kinase C-delta protects against LPS-induced osteolysis owing to an intrinsic defect in osteoclastic bone resorption. *PLoS One*, (査読有) 8: e70815 (2013). doi: 10.1371/journal.pone.0070815.

Yumimoto, K., Matsumoto, M., Onoyama, I., Imaizumi, K., Nakayama, K. I.: F-box and WD repeat domain-containing-7 (Fbxw7) protein targets endoplasmic reticulum-anchored osteogenic and chondrogenic transcriptional factors for degradation. *J. Biol. Chem.*, (査読有) 288: 28488-28502 (2013). doi: 10.1074/jbc.M113.465179.

Yamamoto, A., Takeya, R., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Sumimoto, H.: Phosphorylation of Noxo1 at threonine 341 regulates its interaction with Noxa1 and the superoxide-producing activity of Nox1. *FEBS J.*, (査読有) 280: 5145-5159 (2013). doi: 10.1111/febs.12489.

Yumimoto, K., Muneoka, T., Tsuboi, T., Nakayama, K. I.: Substrate binding promotes formation of the

Skp1-Cul1-Fbx13 (SCF(Fbx13)) protein complex. *J. Biol. Chem.*, (査読有) 288: 32766-32776 (2013). doi: 10.1074/jbc.M113.511303.

Zhao, H., Bauzon, F., Fu, H., Lu, Z., Cui, J., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Locker, J., Zhu, L.: Skp2 deletion unmasks a p27 safeguard that blocks tumorigenesis in the absence of pRb and p53 tumor suppressors. *Cancer Cell*, (査読有) 24: 645-659 (2013). doi: 10.1016/j.ccr.2013.09.021.

Tane, S., Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Nakayama, K. I., Takeuchi, T.: CDK inhibitors, p21(Cip1) and p27(Kip1), participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (査読有) 443: 1105-1109 (2014). doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.109.

Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Okumura, F., Takeuchi, A., Horiuchi, K., Kano, T., Kanda, A., Saito, W., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., Sasaki, H.: Identification of anti-Sez612 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy. *J. Neurol.*, (査読有) 261: 224-226 (2014). doi: 10.1007/s00415-013-7134-5.

Ohnishi, T., Shirane, M., Hashimoto, Y., Saita, S., Nakayama, K. I.: Identification and characterization of a neuron-specific isoform of protrudin. *Genes Cells*, (査読有) 19: 97-111 (2014). doi: 10.1111/gtc.12109.

Kotoshiba, S., Gopinathan, L., Pfeifferberger, E., Rahim, A., Vardy, L. A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Kaldis, P.: p27 is regulated independently of Skp2 in the absence of Cdk2. *Biochim. Biophys. Acta*, (査読有) 1843: 436-445 (2014). doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.005.

Lu, Z., Bauzon, F., Fu, H., Cui, J., Zhao, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Zhu, L.: Skp2 suppresses apoptosis in Rb1-deficient tumours by limiting E2F1 activity. *Nat. Commun.*, (査読有) 5: 3463 (2014). doi: 10.1038/ncomms4463.

Hashimoto, Y., Shirane, M., Matsuzaki, F., Saita, S., Ohnishi, T., Nakayama, K. I.: Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. *J. Biol. Chem.*, (査読有) in press. (2014). doi: 10.1074/jbc.M113.528687.

Matsumoto, A., Takeishi, S., Nakayama, K. I.: p57 regulates T cell development

and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling. *Blood*, (査読有) in press. (2014).  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24652995>

[学会発表](計11件)

中山敬一. 次世代プロテオミクスによる癌代謝と細胞周期の統合的理解: 90 年来の謎に挑む. 第 17 回日本がん分子標的治療学会. 京都. (6/13, 2013).

Nakayama, K. I. Fbw7 is essential for maintenance of quiescence and function of cancer stem cells. 35th Naito Conference. Sapporo. (7/12, 2013).

Nakayama, K. I. Cell cycle and cancer stem cells: Abrogation of quiescence by Fbw7 ablation eliminates leukemia stem cells. ISEH 42nd Annual Scientific Meeting. Vienna. (8/23, 2013).

中山敬一. がん治療における Fbxw7 抑制の二面性: 光と影. 第 86 回日本生化学会大会. 横浜. (9/12, 2013).

Nakayama, K. I. Absolute quantification of human proteome by large-scale targeted proteomics. HUPO 2013 12th Annual World Congress. Yokohama. (9/17, 2013).

中山敬一. ワールブルグ効果とは何か?: 全てを計ることによって明らかとなったがん代謝の真実. 第 72 回日本癌学会学術総会. 横浜. (10/4, 2013).

中山敬一. 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地: 90 年来の謎を解く. 第 40 回日本神経内分泌学会学術集会・第 38 回日本比較内分泌学会大会・合同大会. 宮崎. (10/25, 2013).

Nakayama, K. I. What is the Warburg effect? Next-generation proteomics uncovers the secret of cancer. 3rd GDRI French Japanese Cancer Meeting. Toulouse. (11/21, 2013).

中山敬一. 次世代プロテオミクスを用いたがん代謝の統合的理解. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸. (12/3, 2013).

Nakayama, K. I. Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. Kyushu University/Academia Sinica Biliateral Mini-Symposium on Cancer and Stem Cell. Taipei. (1/21, 2014).

Nakayama, K. I. Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, Monash University: Cell-fate Decision: Function and Dysfunction in

Homeostasis. Melbourne. (2/7, 2014).

[図書](計1件)

中山敬一. 総論. がん基盤生物学—革新的シーズ育成に向けて— (清木元治, 中山徹, 石川冬木, 内海潤, 近藤豊, 中山敬一, 平尾敦 編) pp. 261-264. 南山堂 (東京). (2013).

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 有機酸重合体を有効成分とする癌細胞の生着予防又は生着抑制のための医薬  
発明者: 中山敬一、弓本佳苗、城森孝仁  
権利者: 国立大学法人九州大学、株式会社三和化学研究所  
種類: 特願  
番号: 2013-162872  
出願年月日: 2013 年 8 月 6 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: タンパク質の定量方法  
発明者: 中山敬一、松本雅記  
権利者: 国立大学法人九州大学  
種類: 特許  
番号: 第 5468073 号  
取得年月日: 2014 年 2 月 7 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ  
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 敬一 (NAKAYAMA, Keiichi)  
九州大学・生体防御医学研究所・教授  
研究者番号: 80291508