

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860852

研究課題名(和文)RTT患者iPS細胞を用いたシナプス関連遺伝子発現異常に基づく自閉症病態の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of autism based on abnormalities of synaptic genes expression using iPS cells of Rett syndrome

研究代表者

三宅 邦夫(MIYAKE, Kunio)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：60550712

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、神経系細胞株及びレット症候群患者iPS細胞を用いてMeCP2による発達障害関連遺伝子の発現機構の解明することを目的とした。本研究の結果、シナプス関連分子Lin7aがMeCP2により発現促進されていること、またiPS細胞を用いた遺伝子発現解析からMECP2発現・非発現細胞間において神経分化によって遺伝子発現状態が大きく異なっていくことを見出した。これらの結果はMeCP2が神経細胞分化や成熟過程において重要な機能を有していることを示唆している。今後、患者iPS細胞を用いた詳細なシナプス関連分子の発現・機能異常を明らかにするだけでなく、治療薬の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文):We investigated the expression mechanisms of MeCP2 target genes in the neuronal cell lines and induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from Rett syndrome patients. As a result, we found that Lin7a gene was activated by MeCP2. Furthermore, we found that gene expression pattern was different between MeCP2 positive iPSCs-derived neural cells and MeCP2 negative cells. These results suggest that MeCP2 has an important function during neuronal differentiation and synaptic maturation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 発達障害 レット症候群 iPS細胞 DNAメチル化 ヒストン修飾 自閉症

1. 研究開始当初の背景

レット症候群の原因がメチル化 DNA 結合タンパク質である MeCP2 の異常であることが明らかにされている。MeCP2 は生後の脳発達過程から発現が増加し、遺伝子発現調節を行う重要な転写因子である。MeCP2 はメチル化 DNA に結合し、Sin3a やヒストン脱アセチル化酵素(HDACs)などと複合体を形成することで遺伝子発現の抑制に働くと長年考えられてきたが近年、遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写因子 CREB1 などとともに標的遺伝子の発現を活性化することも報告され、MeCP2 が転写抑制・活性化双方に関与していることが示唆されている。これまでに MeCP2 の標的遺伝子の探索は多数行われており、神経栄養因子の *BDNF* や GABA 合成酵素の 1 つである *GAD* の発現誘導に関与する *DLX5* など約 20 種の遺伝子が報告されているが、依然として MeCP2 によって活性化される具体的な標的分子とそのメカニズムは不明のままである。またこれまで培養細胞やレット症候群モデルマウスを用いた解析が盛んに行われてきたが、患者の病態を反映するような分子メカニズムはよくわかっていない。

一方で、自閉症疾患を始めとした神経発達障害がシナプス形成や機能異常が関連していることが報告されており、自閉症のシナプス仮説が提唱されている。自閉症の原因としてシナプス間の細胞接着にかかわる分子やシナプスの足場蛋白、受容体などさまざまなシナプス関連分子の発現・機能異常が報告されている。しかしながら「MeCP2 標的遺伝子の発現異常」と「シナプス形成・機能異常」を結びつける自閉症の分子メカニズムはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

われわれはこれまでに網羅的遺伝子発現解析により遺伝子発現が促進及び抑制する新規遺伝子を見出している。これらの結果から MeCP2 はダイナミックに遺伝子発現調節を行っており、MeCP2 による遺伝子発現活性化機構がシナプス関連遺伝子発現異常を引き起こすというこれまでの概念を覆す自閉症の病態分子メカニズム解明研究の着想に至った。

本研究では、これまでわれわれが見出した MeCP2 標的遺伝子のうち *Lin7a* に注目して、以下の 2 点を明らかにすることを目的とした。

- (1) MeCP2 による *Lin7a* の遺伝子発現活性化メカニズムの解明
- (2) レット症候群患者由来の iPS 細胞を用いた発達障害関連遺伝子の発現異常の解明

3. 研究の方法

- (1) MeCP2 による *Lin7a* 遺伝子の発現調節分子メカニズムを解明

Mecp2 ノックダウン及び *Mecp2* ノックアウトマウスを用いた *Lin7a* 遺伝子の発現解析、*Lin7a* プロモーター領域を結合させたレポーターベクターを用いた MeCP2 結合・活性化領域の検討を行った。

- (3) レット症候群患者由来 iPS 細胞の作製および神経分化誘導

2 名レット症候群患者から皮膚を採取し、レトロウイルスベクターを用いた山中 4 因子の導入による iPS 細胞の樹立を行った。樹立した iPS 細胞から胚様体形成、神経細胞への誘導を行った。

- (4) 患者 iPS 細胞由来神経細胞を用いた遺伝子発現解析

iPS 細胞及び神経細胞を用いてマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。また個別の遺伝子については定量 RT-PCR により遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

- (1) MeCP2 による *Lin7a* 遺伝子発現促進メカニズム

MeCP2 が *Lin7a* 遺伝子の転写開始点(TSS)上流領域に結合するかどうかを確認するためにクロマチン免疫沈降法を行った。その結果、MeCP2 が *Lin7a* の TSS 上流領域に結合することが確認できた(図 1)

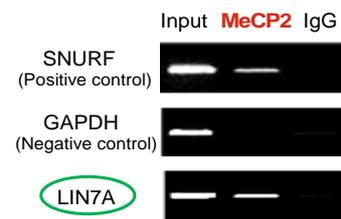


図1 クロマチン免疫沈降法によるMeCP2 の*Lin7a*遺伝子調節領域への結合

MeCP2 により *Lin7a* 遺伝子発現が促進するかどうかを確認するためにレポーターアッセイを行った。*Lin7a* のプロモーター領域が不明だったため TSS 上流のさまざまな長さの配列をルシフェラーゼベクターにライゲーションした。その際のコンストラクトはメチラーゼを用いてメチル化させたコンストラクトと非メチル化コンストラクトを使用した。これらのコンストラクトと MeCP2 発現コンストラクトもしくはメチル化結合ドメイン(MBD)欠損コンストラクトをコトランスフェクションしルシフェラーゼ発光を測定した。その結果、正常 MeCP2 では *Lin7a* の発現が促進することがわかった。一方で MBP 欠損 MeCP2 では遺伝子発現促進効果が見られないことがわかった(図 2)。

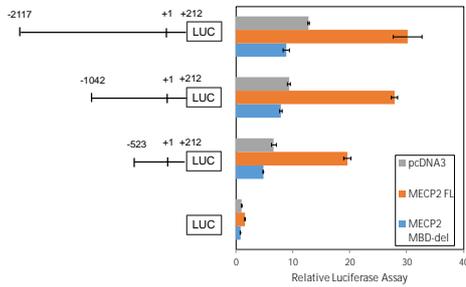


図2 MeCP2によるLin7a遺伝子領域のレポーターアッセイ

MeCP2により内在性のLin7aの発現が調節を受けるかどうかを確認するために MeCP2 siRNA によるノックダウン及び Mecp2 ノックアウトマウスを用いて、Lin7a 遺伝子発現解析を行った。その結果、MeCP2 ノックダウン細胞(図 3)やノックアウトマウス(図 4)において Lin7a 遺伝子の発現が減少していることがわかった。これらの結果からこれまでの既知の機能である MeCP2 = 転写抑制ではなく、MeCP2=転写促進する新たな標的遺伝子を同定することができた。

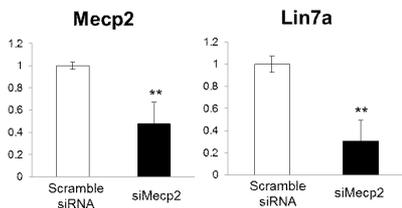


図3 Mecp2 siRNAによるMecp2, Lin7a遺伝子の発現

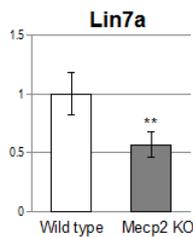


図4 Mecp2 KOマウスにおけるLin7a遺伝子の発現

脳発達過程における Lin7 タンパク質の発現状態を解析するため、定量 RT-PCR 及びウエスタンブロットング解析を行った。その結果、Lin7 のサブタイプである Lin7b,c の発現は変化しないのに対し、Lin7a は脳の発達に従い発現量が増加していくことがわかった(図 5)。これらの結果から、Lin7a は脳の発達にきわめて重要な分子であり、Lin7a の発現異常が脳の発達異常に関与する可能性が考えられる。今後、Mecp2 ノックアウトマウスもしくは患者 iPS 細胞を使用した Lin7a の発現異常ならびにシナプス機能異常を明らかにしていくことが重要になる。

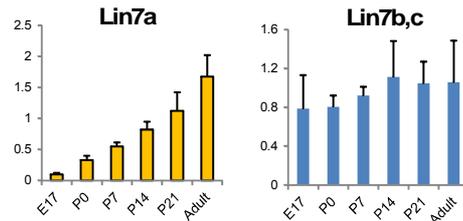
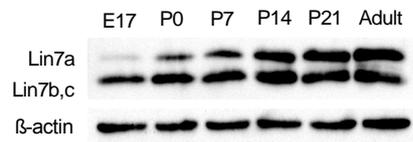


図5 脳発達過程におけるLin7aタンパク質の発現変化

(2) レット症候群患者由来 iPS 細胞を用いた神経発達過程における遺伝子発現解析
 レット症候群患者から iPS 細胞を樹立した結果、正常 MECP2 発現細胞株と変異 MECP2 発現細胞がそれぞれ樹立されることがわかった。iPS 細胞樹立に際して X 染色体不活性化が解除されるまで細胞が初期化するかどうかは議論が分かっている。本研究における結果では元の細胞の X 染色体不活性化を維持したままの iPS 細胞がそれぞれ樹立された(図 6)。

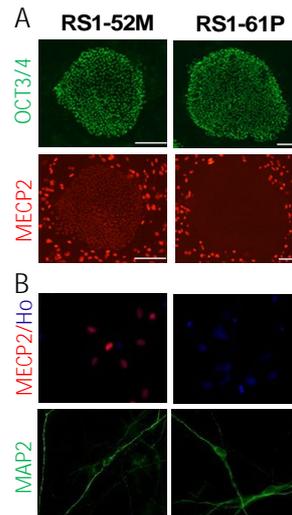


図6 レット症候群患者由来iPS細胞(A)と分化誘導した神経細胞(B)

正常 MECP2 発現・非発現細胞における網羅的遺伝子発現解析を行った。主成分分析の結果、iPS 細胞では MECP2 発現・非発現細胞間で遺伝子発現プロファイルはほとんど同じであったが、神経に分化させるとこれらの細胞間で遺伝子発現プロファイルが大きく異なることがわかった(図 7)。これらの結果は MeCP2 が神経細胞分化や成熟過程においてきわめて重要

な機能を有していることを示唆していると考えられる。今後は Lin7a の発現異常の有無を明らかにし、iPS 細胞を用いたシナプス機能異常解析を行うことが重要であると考えられる。

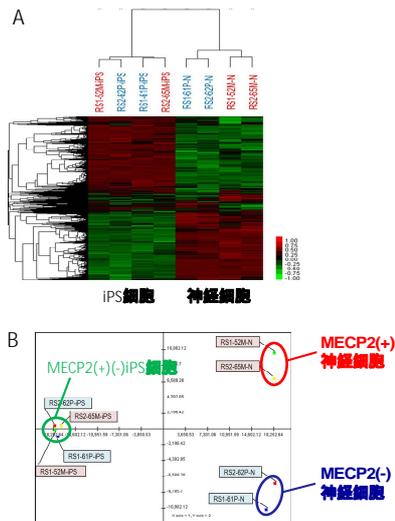


図7 正常MECP2(+) 変異MECP2(-)iPS細胞及び神経分化誘導細胞における網羅的遺伝子発現解析 (A)ヒートマップ解析 (B)主成分分析

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8件)

- (1) Kubota T, Miyake K, Hariya N, Mochizuki K. Epigenetics as a basis for diagnosis of neurodevelopmental disorders: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(6):685-97.(査読なし)
- (2) Kyoko Oo, Kono H, Ishimaru K, Miyake K, Kubota T, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Nakao A. Expressions of tight junction proteins Occludin and Claudin-1 are under the circadian control in the mouse large intestine: implications in intestinal permeability and susceptibility to colitis. *PLoS One.* 2014;9(5):e98016.(査読あり)
- (3) 久保田 健夫, 平澤 孝枝, 三宅 邦夫. 神経疾患のエピゲノム 脳機能障害を理解する新しい指標 BRAIN and NERVE 2014;66(5):591-7. (査読なし)
- (4) 久保田 健夫, 三宅 邦夫, 針谷 夏代, 望月 和樹. 環境エピジェネティクス変化と疾患 生体の科学

2014;65:547-552. (査読なし)

- (5) Matsumoto A, Kuwajima M, Miyake K, Kojima K, Nakashima N, Jimbo EF, Kubota T, Momoi MY, Yamagata T. An Xp22.12 microduplication including RP S6KA3 identified in a family with variably affected intellectual and behavioral disabilities. *J Hum Genet.* 2013;58(11):755-7. (査読あり)
- (6) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Role of epigenetics in Rett syndrome. *Epigenomics.* 2013;5(5):583-92.(査読なし)
- (7) Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto YI, Andoh T, Kurosawa H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. Comparison of Genomic and Epigenomic Expression in Monozygotic Twins Discordant for Rett Syndrome. *PLoS One.* 2013;8(6):e66729. (査読あり)
- (8) Motizuki M, Isogaya K, Miyake K, Ikushima H, Kubota T, Miyazono K, Saitoh M, Miyazawa K. Oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) is a Smad cofactor involved in cell motility induced by transforming growth factor- β . *J Biol Chem.* 2013;288(26):18911-22. (査読あり)

[学会発表](計9件)

- (1) 武居 美沙, 三宅 邦夫, 山田 有理子, 與谷 卓也, 久保田 健夫. DNA のメチル化修飾を検出できるアニオン交換 HPLC カラムの臨床応用. 日本人類遺伝学会第59回大会 タワーホール船堀(東京都・江戸川区)2014年11月19日~22日
- (2) 三宅 邦夫. 発達障害とエピジェネティクスシンポジウム4 「エピジェネティクス研究が拓くストレス科学の世界」日本ストレス学会学術総会 第30回記念大会 日本大学文理学部百周年記念館(東京都・世田谷区)2014年11月7日~8日
- (3) N. A. Nguyen, K. Miyake, T. Kubota. Change of neuronal gene expression by administration of various antidepressant in primary neocortical neurons. ASHG2014 San Diego, CA, USA Oct18-22 2014.
- (4) K. Miyake, Y. Yamada, T. Yotani, T. Kubota. Clinical application of an anion exchange HPLC column that distinguishes DNA methylation status. ASH

G2014 San Diego, CA, USA Oct18-22 2014.

- (5) 庄司 陽平, 久保田 悠一, 井上 克枝, 久保田 健夫, 三宅 邦夫, 葛西 宏威, 武川 克志, 手塚 英夫. 変異体マウスを用いた翻訳伸長因子遺伝子欠損の血液学的影響. 60 回日本実験動物学会総会 つくば国際会議場 (茨城県・つくば市) 2014 年 5 月 15 日 ~ 17 日.
- (6) 三宅 邦夫, 久保田 健夫. レット症候群の分子病態機構. 第 87 回日本薬理学会年会 仙台国際センター (宮城県・仙台市) 2014 年 3 月 19 日 ~ 21 日.
- (7) 若菜茂晴, 古瀬民生, 幸田尚, 古市貞一, 三宅邦夫, 久保田健夫. 胎児期低栄養曝露された申請仔の遺伝子発現. 83 回日本衛生学会学術総会金沢大学鶴間・宝町キャンパス (石川県・金沢市) 2013 年 3 月 24 日 ~ 26 日.
- (8) 三宅邦夫, 久保田健夫. 重症度差異のある一卵性双生児レット症候群患者におけるゲノム・エピゲノム比較解析. 第 36 回日本神経科学大会 京都国際会議 (京都府・京都市) 2013 年 6 月 20 日 ~ 23 日
- (9) 安藤友子, 赤松和土, 松本拓也, 三宅邦夫, 山口亮, 岡田洋平, 今泉陽一, 大山学, 黒澤尋, 天谷雅行, 久保田健夫, 岡野栄之, Rett 症候群患者由来の iPS 細胞から誘導した神経細胞ではアストロサイトの亢進がみられる. 第 36 回日本神経科学大会 京都国際会議場 (京都府・京都市) 2013 年 6 月 20 日 ~ 23 日

〔図書〕(計 4 件)

- (1) Kubota T Hirasawa T Miyake K. Chapter 24: Mental disorders and Transgenerational Epigenetic Inheritance. In "Transgenerational Epigenetics: Evidence and Debate". Elsevier (Academic Press), pp.343-354, 2014, ISBN978-0-12-455944-3, edited by Trygve Tollefsbol.
- (2) Kubota T, Miyake K, Hirasawa T. Chap

ter: Current Understanding of Epigenomics and Epigenetics in Neurodevelopmental Disorders. In "Epigenomics and Epigenetics". Intech (Open Access Publisher), 2014, ISBN978-953-51-1368-8, edited by Christopher J. Payne.

- (3) 久保田健夫・三宅邦夫・平澤孝枝 エピジェネティクス、基本を教える。遺伝子医学 MOOK 別冊「いまさら聞けない遺伝医学」 遺伝子医学 MOOK 25 号, pp91-98 2014.
- (4) 久保田健夫・三宅邦夫・平澤孝枝 エピジェネティクスと脳機能 遺伝子医学 MOOK 25 号, pp164-170 2013.

〔その他〕
ホームページ
<http://www.epigenetmed.com>
(研究代表者の所属機関の環境遺伝医学講義のホームページ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三宅 邦夫 (MIYAKE, Kunio)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号: 60550712