

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461539

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の脳の高次機能におけるその機能解析

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

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：(1)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。
(2)SIP1と同じZfhx1転写制御因子ファミリーに属する EF1についてもその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と同時に二重floxマウスを作製し解析することで、Zfhx1転写制御因子ファミリー全体としての機能を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：1. 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. 2. We made the dEF1 flox mouse and analyzed its authenticity by comparing the phenotype of the conventional homozygous knockout embryos and that of the whole body knockout derived from the flox allele combined with the CAG-cre transgene. We confirmed that the flox allele we made can be the null allele through deletion of the 6th exon flanked with LoxP sequence by cre recombinase.

研究分野：発生生物学

キーワード：モワット-ウィルソン症候群 SIP1 遺伝子 ZFHX1ファミリー ZEBファミリー ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

モワット-ウィルソン症候群は、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。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明らかにされている。現在までの日本及び欧米の報告をもとにすると、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。またモワット-ウィルソン症患者は常に SIP1 遺伝子のヘテロ欠損 (ハプロ不全) であり (ホモ欠損は、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、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、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にする。

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 ZFHX1 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 ZFHX1 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。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。ヒトのモワット-ウィルソン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。例えば Emx1-cre を用いた前脳特異的な 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。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。

そこで、申請者らはヒトのモワット-ウィルソン症患者の場合と同じように、生殖細胞において SIP1 遺伝子がヘテロに欠失する交配方法を確立したところ、近交系の C57BL/6 のマウス系統を用いた場合でも、成体にまで成熟し、それらの脳の組織学的解析や行動解析などを行えることが明らかになった。そこでこれらのマウスを用いて、より詳細な解析を行い、ヒトの症状と比較検討することを試みた。

一方最近申請者らは、SIP1 と同じ ZFHX1 転写制御因子ファミリーに属する δ EF1 遺伝子についても、脳やその発生過程にも発現していることを確認しており、 δ EF1 が脳形成過程やその高次機能において何らかの役割を担っている可能性が示唆された。そこで、 δ EF1 の flox allele を持つマウスを作成し、そのコンディショナル KO を試みることを計画した。また将来的には SIP1 と同時に δ EF1 もコンディショナル KO を行うことで、ZFHX1 転写制御因子ファミリー全体としての機能が明らかになると期待される。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、モワット-ウィルソン症の発症の機序 (全ては de novo 変異で、ハプロ不全で発症する) と同じように、雄マウスの生殖細胞系列で特異的に SIP1 を欠失させる交配法を確立し、ヘテロ変異の成体マウスを作製する。そのマウスについて、脳形成の形態学的解析や、脳の高次機能を種々の行動解析によって評価する。この解析によって、SIP1 が脳形成や高次機能にどのように関与しているのか、即ち、SIP1 の変異がモワット-ウィルソン症の発症にどのように関わっているのか、分子レベルで明

らかに出来ることが期待できる。

(2) 本研究では、同様に SIP1 と同じ Zfx1 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 に関しても 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) で用いるヘテロ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 SIP1 flox/+; Protamin-Cre/+ 雄マウス、と野生型の雌マウスを交配させ、産仔について、実際に成体まで成長するのか観察する。成体までに達するマウスに関しては、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。

② SIP1 の相同因子である δ EF1 の flox マウスを新たに作製し、①と同様の解析を行う。 δ EF1 の flox マウスは、SIP1 の場合と同様に最大のエキソンである第6エキソンを loxP 配列で挟む形で構築する。

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 や δ EF1 が制御する遺伝子候補を探索する。

4. 研究成果

(1) 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た。その結果、① 頭蓋骨の形成に関して、鼻骨の退縮などヒトの場合の特徴的な顔貌に似た傾向が観察された。② 脳梁が薄弱する傾向が出生直前のマウス胎仔において観察されたが、成体まで成育した個体においては、殆ど観察されなかった。ヒトにおいては一部の患者において脳梁欠損が観察されており、この結果に関してはさらに詳細な解析が必要である。③ PV (パルブアルブミン) 陽性の抑制性神経細胞がヘテロ変異個体では有意に減少していた。このことは、モワット-ウィルソン症患者の一部において癲癇の症状が観察されることと関係する可能性が考えられるが、さらなる解析が必要である。④ 脳の高次機能の指標となり得る行動学的解析では、恐怖に対する感受性が高いこと、社会性が低い傾向にあることが判った。また Barnes maze test を用いた結果からは、記憶や学習よりも、急速に動機付けの行動を喪失する様子が観察され、その行動学的特性に関する的確な解釈にはさらに詳細な解析が必要であると推察された。

(2) δ EF1 の flox マウスの作製とその解析
本研究では SIP1 遺伝子との重複する機能を有する可能性のある δ EF1 遺伝子についても、その脳における機能を知る目的で、コンディショナルノックアウトマウスの作製が可能となる δ EF1 flox の作製を行った。SIP1 遺伝子のば場合と同じように、 δ EF1 遺伝子の最大のエキソンである第6エキソンを欠失する形の δ EF1 flox の作製を行った。常法に従い、まずターゲティングベクターを用いて、マウス ES 細胞で δ EF1 遺伝子で相同組換えを起こし、目的とする構造を持った ES 細胞を選択した。次にこの ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、生殖細胞系列に組換えを起こした目的のアレルを持つキメラマウスから、最終的に δ EF1 flox ア

レルをヘテロに有するマウスを得た。このマウスを用いて、実際に CAG-Cre マウスを用いてヘテロ欠失マウスを作製し、それらを交配させることで、ホモ欠失マウスを作製し、従来の conventional KO マウスの場合の表現型と比較した。その結果、①胎仔は出生まで達するが、蘇生に至らず死ぬ、②ホモ欠失個体は体長が短く背側が湾曲している、③四肢の長骨が短い、等、外見的な形態は両者において全く差が無く、新たに作製した flox アレルは、Cre リコンビナーゼを作用させた場合に null 変異を生じることが確認された。

(3) SIP1 および δ EF1 の標的遺伝子の探索それぞれの変異マウスを材料に、発現する RNA のマイロアレイ解析を行い、そこで野生型マウスと比較した場合に変化のあるものを探索する。この計画に関してはまだ現在準備をしているところであり、結果を得るに至っていない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 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)
- ② Takagi, T., Nishizaki, Y., Matsui, F., Wakamatsu, N. and Higashi, Y. De novo inbred heterozygous Zeb2/Sip1 mutant mice uniquely generated by germ-line conditional knockout exhibit craniofacial, callosal and behavioral defects associated with Mowat-Wilson syndrome. *Hum Mol Genet*. 24:6390-6402. (2015)
- ③ Omilusik, K. D., Best, J. A., Yu, B., Goossens, S., Weidemann, A., Nguyen, J. V., Seuntjens, E., Stryjewska, A., Zweier, C., Roychoudhuri, R., Gattinoni, L., Bird, L. M., Higashi, Y., Kondoh, H., Huylebroeck, D., Haigh, J. and Goldrath, A. W. Transcriptional repressor ZEB2 promotes terminal differentiation of CD8+ effector and memory T cell populations during infection. *J Exp Med*. 212:2027-2039. (2015)
- ④ Yasumi, T., Inoue, M., Maruhashi, M., Kamachi, Y., Higashi, Y., Kondoh, H. and Uchikawa, M. Regulation of trunk neural crest delamination by δ EF1 and Sip1 in the chicken embryo. *Dev Growth Differ*. 58:155-237 (2016)
- ⑤ Menuchin-Lasowski Y., Oren-Giladi P., Xie Q., Ezra-Elia R., Ofri R., Peled-Hajaj S., Farhy C., Higashi Y., Van de Putte T., Kondoh H., Huylebroeck D., Cvekl A., Ashery-Padan R. Sip1 regulates the generation of the inner nuclear layer retinal cell lineages in mammals. *Development*. 143:2829-2841 (2016)
- ⑥ Rasouly, H. M., Kumar, S., Chan, S., Pisarek-Horowitz, A., Sharma, R., Xi, Q. J., Nishizaki, Y., Higashi, Y., Salant, D. J., Maas, R. L., Lu, W. Loss of Zeb2 in mesenchyme-derived nephrons causes primary glomerulocystic disease. *Kidney Int*. 90:1262-1273 (2016)
- ⑦ Ohayon, D., Garcès, A., Willy Joly, W., Soukkarieh, C., Takagi, T., Sabourin, J.-C., Eric Agius, E., Darling, D. S., De Santa Barbara, P., Higashi, Y., Stolt, C. C., Jean-Philippe Hugnot, J.-P., William D. Richardson, W. D., Patrick Carroll, P. and Pattyn, A. The Zeb1 Transcription Factor Controls the Onset of Spinal Cord Astrocyte Precursor Emigration from the Ventricular Zone *Cell Reports* 17:1473-1481 (2016)
- ⑧ Wu, X., Briseño, C. G., Grajales-Reyes, G. E., Haldar, M., Iwata, A., Kretzer, N. M., Wumesh, K.C., Tussiwand, R., Higashi, Y., Murphy, T. L., and Murphy, K. M. Transcription factor Zeb2 regulates commitment to plasmacytoid dendritic cell and monocyte fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113:14775-14780. (2016)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 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
- ② Cre-LoxP システムを利用した denovo 変異型ヒト疾患モデルマウスの作製
高木 豪、東 雄二郎 第 38 回日本分子生物学会年会（神戸）2015. 12. 2.
- ③ 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、ジャン キョンジン、東 雄二郎、クリスティン ヴァーシェーレン、ダニー ハイレボーク、清水 章、菅井 学 第 38 回日本分子生物学会年会（神戸）2015. 12. 2.

〔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

松井 ふみ子 (Matsui Fumiko) (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所、周生期学部、研究助手)

(退職のため、平成 26 年度 1 年間のみ)

研究者番号：10393133

(3) 連携研究者

該当なし