

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461557

研究課題名(和文) 縫線核セロトニン神経の形成におけるSip1の機能と役割

研究課題名(英文) The role of Sip1 gene for development of the serotonergic neurons of the raphe

研究代表者

西崎 有利子 (NISHIZAKI, Yuriko)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90378901

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)：モワット・ウィルソン症候群の原因遺伝子であるSip1は、主に大脳や海馬等で発現し、重要な働きを担っているが、それ以外にも、セロトニン神経と呼ばれる、気分や情動に影響を及ぼす細胞群で発現している。本研究では、セロトニン神経でSip1遺伝子を欠失させたノックアウトマウスを作成し、行動解析を行った。その結果、ノックアウトマウスでは、不安様行動が見られ、野生型マウスと比較して、突起を持つセロトニン神経の割合が少なかった。これらの結果より、Sip1は、セロトニン神経の突起伸長に役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Sip1 is the causative gene for Mowat-Wilson syndrome. Sip1 is expressed in the developing neural tube, the neural crest cells, the hippocampus and the cerebral cortex. Sip1 is also expressed in the serotonergic neurons of the raphe nuclei in the brainstem. Serotonergic neurons of the raphe nuclei project throughout the brain widely and secrete serotonin. Serotonin acts as a key modulator of neural circuits for emotion, mood and physiological response. We generated Sip1-gene conditional knockout mice in the serotonin neurons of the Raphe. We observed abnormal behavior of the Sip1 conditional knockout mice and some abnormal morphology of the serotonergic neurons. The results suggest that Sip1 gene plays an important role for serotonergic neuron development and function.

研究分野：器官発生学、分子生物学、神経科学

キーワード：縫線核 セロトニン 神経 Sip1 脳 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、重度精神遅滞、運動発達遅滞、てんかん、ヒルシュスプルング病などを主徴とする症候群で、愛知県コロー中央病院から症例報告され(山中ら 1992 日本小児遺伝医学会) その後、Mowat らが症候群として報告した(Mowat et al., 1998)。その後、モワット・ウィルソン症候群の原因遺伝子が Sip1 (Smad Interacting Protein 1) (ZEB2/ZFH1B と呼ばれる) であり、Sip1 の片側アレルの異常により発症することが明らかになった (Wakamatsu et al., 2001)。モワット・ウィルソン症候群は、広汎で重篤な症状を示すため、その病因・病態を明らかにして治療や予防、症状緩和を目指すためには、ヒトにおける解析のみならず、モデルマウス等を用いて、症状を要素に分けて一つ一つ解析する以外には手だてはない。モワット・ウィルソン症候群の原因遺伝子である Sip1 は、2つの zinc finger と1つの homeobox をもつ転写因子で (Verschuere et al., 1999)、マウスにおける Sip1 の発現は、発生過程にある神経管、神経堤、大脳皮質、海馬等で見られる (Miyoshi et al., 2006; Van de Putte et al., 2003)。近年、ノックアウトマウスの解析により、少しずつ Sip1 の神経系における役割が明らかになりつつある。Sip1 ホモノックアウトマウスは、胎生 9.5 日で胚性致死となり神経管閉鎖不全を示す (Van de Putte et al., 2003)。胚性致死を回避した Nestin-Cre による中枢神経系、Emx-Cre、Nex (NeuroD6)-Cre による背側終脳におけるコンディショナルノックアウトにより、脳における Sip1 の機能解析が行われ、海馬や脳梁の構造の欠失 (Miquelajauregui et al., 2007)、大脳皮質の層構造の異常 (Seuntjens et al., 2009)、介在神経の移動の異常 (McKinsey et al., 2013; van den Berghe et al., 2013) 等が見られている。

我々はこれまでに、モワット・ウィルソン症候群の病因、病態をさらに明らかにすることを目的し、Sip1 の詳細な発現解析を行った。標的遺伝子組み換えにより Sip1 遺伝子の C 末端に GFP を挿入したレポーターノックインマウスを作成し、抗 GFP 抗体を用いて発現を検出した。その結果、大脳皮質、海馬等、これまで報告されてきた部位のみならず、脳梁や海馬采のオリゴデンドロサイト、小脳のパーグマングリア、嗅球、縫線核のセロトニン神経、ドーパミン神経等、これまでに報告されていなかっ

た新たな発現部位が明らかになった (Nishizaki et al., 2013)。そして、脳内でみられたこれらの Sip1 の発現のうち、とりわけ今後大きな研究の発展が期待される部位として、脳幹部の縫線核セロトニン神経に注目して解析に着手している。

セロトニン神経は、気分、概日リズムの調節、摂食抑制、覚醒の促進、呼吸やリズム運動など多岐にわたる機能を担っている。脳内セロトニン神経系は、脳幹の正中線の両側に存在する縫線核群にそのほとんどが集中しており、縫線核群から脳内のほとんどの領域へ広く投射している。また、セロトニン神経に関しては、近年、うつ病に対する選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI) の効果により、臨床的な注目が集まっている一方で、セロトニン神経の基礎的な研究においては明らかになっていない点が多い。

2. 研究の目的

モワット・ウィルソン症候群の原因遺伝子である Sip1 は、この症候群の広汎な病態と対応して、中枢神経系を中心に幅広い発現と機能を担っている。中でも、脳幹部の縫線核セロトニン神経にも Sip1 の発現が見られるが、セロトニン神経の分化過程や機能については不明な点も多く、Sip1 が担っている役割も明らかではない。そこで、Sip1 のノックアウトマウスや、セロトニン神経の初代培養系を用いた Sip1 の機能解析を通して、モワット・ウィルソン症候群の病因・病態の解明と、症状緩和や治療・療育に役立つ知見を得ることを目指すと共に、セロトニン神経細胞の分化や増殖を促進する分子メカニズムに迫り、将来的に、セロトニン神経をターゲットとしたうつ病等の精神疾患の治療に役立つ知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 縫線核特異的に Sip1 遺伝子をノックアウトしたマウス作成し、どのような行動異常が見られるかを、野生型マウスと比較し解析した。

(2) 縫線核周辺の細胞を初代培養し、Sip1 ノックアウトマウスと野生型マウスとの間でどのような細胞分化や形態、突起伸長等の違いが見られるかを解析した。

(3) 縫線核特異的な Sip1 ノックアウトマウスでは、縫線核の発生と機能にどのような異常が見られるかを、免疫組織化学染色、および切片の浮遊免疫染色によって解析した。

4. 研究成果

(1) 縫線核における Sip1 の役割を明らかにする目的で、まず、縫線核特異的 Sip1

コンディショナルノックアウトマウス(cKO)を作成した。Pet-1 エンハンサーの制御下で Cre リコンビナーゼを縫線核特異的に発現させる ePet-Cre マウスを用いて、縫線核特異的に Sip1 を欠失させたマウスを得た。

縫線核特異的に Sip1 を欠失させたマウスは、野生型マウスと比較して、暗所を好み不安傾向を示した。セロトニン神経は、攻撃性や社会性にも関与することが知られていることから、さらに、このマウスの攻撃性や社会性についても調べた。その結果、縫線核特異的 Sip1 欠失マウスは、侵入者テストにおいて通常最初に現れる「臭い嗅ぎ行動」が有意に少なく、初対面のマウスから逃げようとする時間が有意に長かった。闘争時間には、有意な差は見られなかった。また、3-chamber 社会性テストでは、直接は触れられない初対面のマウスの部屋とおもちゃが置かれた部屋とで滞在時間に有意な差は見られず、社会性に異常は見られないことが分かった。また、身体的な運動能力を調べる Rotarod 試験を行ったところ、このマウスの身体能力については野生型マウスと有意な差はなかった。これらの結果から、縫線核特異的 Sip1 欠失マウスは、不安行動を示し、臭い嗅ぎ行動が減少していた。臭い嗅ぎ行動の減少は、社会性の低下や運動能力の低下によるものではなく、不安によるものであると推測された。

(2) さらに詳細な解析のために、Sip1 ヘテロ変異マウスから採取した縫線核周辺細胞を初代培養し、セロトニン神経及びドーパミン神経について、それぞれ、セロトニン抗体、チロシン水酸化酵素抗体で染色して解析を行った。その結果、同腹仔の対照脳と比較して、Sip1 ヘテロ脳由来のドーパミン神経細胞の数、セロトニン神経繊維の数が有意に減少していることが明らかになった。セロトニン神経数や繊維の長さについても減少傾向が見られた。また、縫線核周辺から採取した細胞に、Sip1-siRNA を発現させるプラスミドをエレクトロポレーションにて導入し、Sip1 のノックダウンを行ったところ、ニューロフィラメント抗体で染色される細胞の割合や、神経特異的チューブリン Tuj1 抗体陽性の突起を伸長する細胞の割合が減少した。

(3) Sip1 ノックアウトマウスの脳でどのような変化が起こっているのかを、実際に行動実験で不安傾向を示したマウスの脳を用いて解析した。Sip1 の縫線核特異的なノックアウトマウス脳では、野生型マウス

の脳と比較して、特に背側縫線核領域においてセロトニン神経細胞の数が少なく、また突起を伸ばしているセロトニン神経の割合も有意に少ないことが明らかになった。

これらの結果から、縫線核セロトニン神経細胞において Sip1 は、セロトニン細胞の増加と突起伸長に重要な役割を担っていると考えられ、Sip1 のノックアウトマウスの脳では、セロトニン神経の突起伸長が出来ず、投射先へのセロトニンの分泌がうまくいかないことから、不安傾向が見られたのではないかと考えられた。このことは、Sip1 が不安症状の改善や治療の新たなターゲットとなりうることを示唆しており、将来的に精神医療分野に貢献しうる可能性を示している。

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 2 件)

Loss of Zeb2 in mesenchyme-derived nephrons causes primary glomerulocystic disease.
Rasouly HM, Kumar S, Chan S, Pisarek-Horowitz A, Sharma R, Xi QJ, Nishizaki Y, Higashi Y, Salant DJ, Maas RL, Lu W.
Kidney Int. 2016 Dec;90(6):1262-1273. doi:10.1016/j.kint.2016.06.037. Epub 2016 Aug 31.
査読有

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.
Takagi T, Nishizaki Y, Matsui F, Wakamatsu N, Higashi Y.
Hum Mol Genet. 2015 Nov 15;24(22):6390-402. doi: 10.1093/hmg/ddv350. Epub 2015 Aug 28.
査読有

[その他]

ホームページ等

<http://www.inst-hsc.jp/d-perinatology/index.html>

http://www.hamayaku.jp/teacher/te_179.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西崎 有利子 (NISHIZAKI, Yuriko)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90378901

(2)研究分担者

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・部長

研究者番号：30181069