

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560458

研究課題名(和文)新規遺伝子改変技術による睡眠障害モデルの作製と応用

研究課題名(英文)Generation of sleep disorder model using genome engineering tool

研究代表者

上野 太郎 (Ueno, Taro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号：30648267

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)：本研究の目的は、臨床で同定されたヒト疾患関連遺伝子の知見を元に、新規遺伝子改変技術を用いて疾患モデル動物を作成することである。ヒトで疾患表現型との相関性が示唆されるアミノ酸レベルの変異を、CRISPR/Cas9システムを用いてモデル動物の内在遺伝子座に導入し、疾患との因果性を明らかにすることを目指した。疾患としては睡眠障害に注目し、モデル動物としてショウジョウバエを用いた。睡眠障害を示す、Kleine-Levin症候群ならびに自閉症スペクトラムの患者におけるゲノム解析を元に、ショウジョウバエの相同遺伝子に変異を導入し、睡眠の表現型について解析した。

研究成果の概要(英文)：In this study I tried to create disease model using genome engineering tool and clinical database. I focused on sleep disorder and used drosophila melanogaster as model organism. Fly mutants with candidate genes for Kleine-Levin syndrome or autism spectrum disorder are created using CRISPR/Cas9 system.

研究分野：睡眠医学

キーワード：CRISPR/Cas9 精神疾患 睡眠障害

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーの普及とともに、ゲノム解析技術は向上し、臨床現場においても疾患のゲノム解析が進んでいる。一方で、得られた遺伝子変異は疾患との相関関係を示すものの、因果関係を示すためにはモデル動物を用いた解析が不可欠である。近年、CRISPR/Cas9 を始めとするゲノム編集技術の革新により、高速かつ高効率に任意の遺伝子変異を導入することが可能となってきた。臨床現場で得られた遺伝子変異の知見を、CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術を用いてモデル動物に導入することで疾患の分子基盤を明らかにすることが可能になると考えられる。さらに、疾患のモデルを作成することにより、疾患治療の分子ターゲットが同定され、治療薬のスクリーニングなどに展開できることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床で同定されたヒト疾患関連遺伝子の知見を元に、新規遺伝子改変技術を用いて疾患モデル動物を作出することである。ヒトで疾患表現型との相関性が示唆されるアミノ酸レベルの変異を、CRISPR/Cas9 システムを用いてモデル動物の内在遺伝子座に導入し、疾患との因果性を明らかにすることを目指した。疾患としては睡眠障害に注目し、モデル動物としてショウジョウバエを用いた。

3. 研究の方法

ゲノム編集技術として、CRISPR/Cas9 システムを用いることで、任意の遺伝子に対する変異導入を行った。モデル動物としては、近年、睡眠覚醒の分子遺伝学的解析が行われているショウジョウバエを用いた。まず、複数の gRNA を発現する pCFD4 プラスミドを用いることにより、CDS を完全に欠損した変異体の作出を試みた。gRNA の発現のために、pCFD4 プラスミドを用いてまずトランスジェニックラインを作出し、さらに生殖細胞特異的に Cas9 を発現する nos-Cas9 のトランスジェニックラインと掛け合わせることで、生殖細胞で CRISPR/Cas9 による deletion が起こ

るショウジョウバエを作出した。ショウジョウバエの睡眠覚醒の表現型解析のためには、DAM (Drosophila Activity Monitoring) システムを用いて、5 分間以上の不動状態を睡眠状態とする定義に基づき、睡眠覚醒の定量解析を行った。さらに、アミノ酸レベルでの変異導入のために、CRISPR/Cas9 を用いたノックイン技術の確立を試みた。塩基配列の挿入をしたい領域に対する gRNA を発現する pCFD4 プラスミドを作出し、トランスジェニックラインを作出した。deletion ラインの作成と同様に、生殖細胞に Cas9 を発現する nos-Cas9 のラインと掛け合わせ、得られた個体の卵に 5' arm, 3' arm それぞれ 1kb に挟まれた mClover 配列をドナープラスミドとしてインジェクションすることにより、相同組換えによるノックインラインの作出を行った。

4. 研究成果

研究代表者は医療機関における睡眠障害の診断・治療に携わる中で、Kleine-Levin 症候群が一卵性双生児双方に発症した症例を経験した。Kleine-Levin 症候群は原因不明の睡眠障害で、間欠的に過眠症状を繰り返す疾患であり、疾患症例自体が稀少であることに加え、一卵性双生児に発症した症例は世界初であり、国際誌に報告した (Ueno *et al.*, 2012, *BMC Neuro1*)。本症例は希少疾患である Kleine-Levin 症候群が一卵性双生児双方に発症したことから、遺伝学的素因の関与が疑われ、疾患関連遺伝子を同定することにより疾患の原因に迫ることが期待される。そこで、本研究では患者である双生児ならびに両親にインフォームド Consent を実施したのち、採血を行い、血液中からゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA に対して、Exome シークエンスを行うことにより、疾患関連遺伝子の同定を試みた。Kleine-Levin 症候群の疾患関連遺伝子の絞り込みについては、現在、Stanford 大学のグループと共同で症例を増やして解析を進めている。

さらに、睡眠障害を合併する精神疾患として、自閉症スペクトラムに注目し、CRISPR/Cas9 システムを用いた疾患との因果性の解析を進めている。自閉症スペクトラム

をはじめとする発達障害においては睡眠障害の合併率が 80%以上とされ、睡眠・覚醒に支障をきたすことが極めて多い。睡眠・覚醒の問題は、これまで周縁的な症状と見なされ、あまり関心が払われてこなかったが、学校や職場に行けない、適応できないなど患者の生活に多大な影響を及ぼす。近年、睡眠の適正化が日中の問題行動にも好影響があることが報告されている。さらに、病態を考えるうえでも注意の問題とともに、睡眠・覚醒の問題は発達障害の病態において本質的な障害である可能性が示唆され始めている (Bourgeron, 2015, *Nat Rev Neurosci*)。自閉症スペクトラムは、その病態が明らかになっておらず、治療法も確立したものはない。近年、自閉症スペクトラム患者の遺伝子研究からシナプス関連タンパクの変異が多数報告され、シナプス強度の調整が病態に寄与していることが示唆されている。さらに、睡眠の意義として、シナプス強度の調整機能が提唱され (Tononi & Cirelli, 2014, *Neuron*)、自閉症スペクトラム患者における睡眠障害の合併率の高さを説明する作業仮説となりうる。これまで、自閉症スペクトラム患者において疾患関連遺伝子が同定され、AutismKB (<http://autismkb.cbi.pku.edu.cn>) を始めとするデータベースが作成されている。ヒト遺伝子との相同遺伝子をショウジョウバエゲノムで探索したところ 62 遺伝子が見つかった。それら遺伝子をターゲットとして CRISPR/Cas9 で変異を導入している。今後は得られた変異体における睡眠覚醒の表現型を解析し、自閉症スペクトラムにおける睡眠障害の原因遺伝子を探る。また、得られたハエ変異体において、自閉症スペクトラムに認められる行動の表現型につながるマイクロエンドフェノタイプとして、シナプスの定量評価を計画している。自閉症スペクトラムや断眠条件下においてシナプス蛋白の発現上昇が指摘されており、これらバイオマーカーを用いた評価により、遺伝子変異と表現型をつなぐ分子メカニズムを明らかにする。ショウジョウバエでは蛍光蛋白質を融合させたシナプス蛋白を神経細胞に発現させるこ

とにより、シナプスの増強を簡便に可視化することが可能であり、共焦点顕微鏡での評価を実施する。

さらに、申請者はショウジョウバエにおける睡眠中枢ならびに覚醒中枢となる神経ネットワークを明らかにしており (Ueno *et al.*, *Nature Neuroscience* 2012, unpublished data)、これら神経回路の活性を制御することにより人工的に睡眠/覚醒を制御し、シナプスを始めとするマイクロエンドフェノタイプの変化を解析する。

また、CRISPR/Cas9 システムを用いた睡眠障害として、加齢性の睡眠障害に注目した解析も実施した。これまで、研究代表者の所属した研究室において、加齢性の記憶障害の分子メカニズムが同定された (Yamazaki *et al.*, 2014, *Neuron*)。加齢に伴う生理現象として、記憶障害に加えて睡眠障害がショウジョウバエにおいても見られる。L-セリンを D-セリンに変換するセリンラセマーゼは加齢とともに発現が低下することが知られており、D-セリンは NMDA 受容体のコアゴニストとして作用する。NMDA 受容体の全神経細胞におけるノックダウンによって、ショウジョウバエの睡眠が減少することも見出している (Tomita *et al.*, 2015, *PLoS One*)。

以上の知見を鑑み、加齢性の記憶障害に関与する分子が加齢性の睡眠障害に寄与するという仮説のもと、CRISPR/Cas9 システムを用いて変異導入を行った。ショウジョウバエにおけるセリンラセマーゼのホモログを同定し、CDS を挟む形で gRNA を 2 種類設計した上で、それら gRNA を全身性に発現するトランスジェニックラインを作出した。得られたトランスジェニックラインと、生殖細胞に Cas9 を発現するラインを掛け合わせ、次世代において目的とする遺伝子欠損個体をスクリーニングした。スクリーニングの結果、目的の遺伝子欠損個体が得られ、ホモ個体において睡眠の表現型を調べた。その結果、羽化直後においては野生型と睡眠時間に違いがないのに対して、羽化後 2 週間が経過することにより、野生型に比べて睡眠時間が著しく短縮することを見出した (図、未発表データ)。

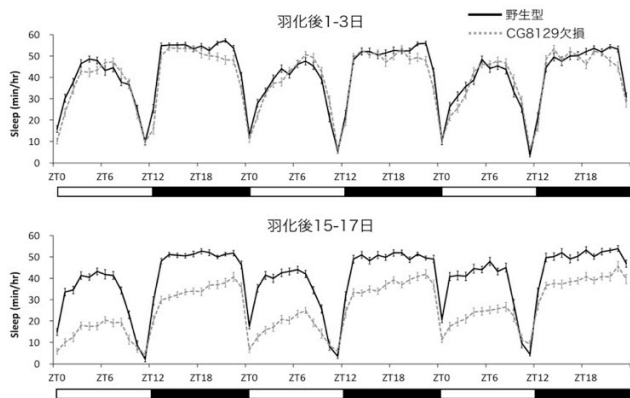


図. D-セリン合成酵素欠損による加齢性睡眠障害

3日間ずつの明暗条件下における経時的な睡眠時間を示す。CRISPR/Cas9により、D-セリン合成酵素であるセリンラセマーゼを欠損するハエを作出した。変異体は、若齢では睡眠時間に違いはないが、加齢による睡眠時間の減少が著しい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

①Tomita J, Ueno T, Mitsuyoshi M, Kume S, Kume K

The NMDA Receptor Promotes Sleep in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*.

PLoS One 10(5) e0128101 2015

doi:10.1371/journal.pone.0128101.

(査読有り)

②上野太郎, 糸和彦.

ショウジョウバエを用いた睡眠の基礎研究. 日薬理誌(Folia Pharmacol. Jpn.), 日本薬理学会, 2015

doi.org/10.1254/fpj.145.134

(査読無し)

③Yamazaki D, Horiuchi J, Ueno K, Ueno T, Saeki S, Matsuno M, Naganos S, Miyashita T, Hirano Y, Nishikawa H, Taoka M, Yamauchi Y, Isobe T, Honda Y, Kodama T, Masuda T, Saitoe M

Glial dysfunction causes age-related memory impairment in *Drosophila*.

Neuron 84 753-763 2014

doi:10.1016/j.neuron.2014.09.039.

(査読有り)

④Ueno T*, Kume K* (* correspondence)

Functional characterization of dopamine transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral analysis.

Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2014, 8, 303

doi: 10.3389/fnbeh.2014.00303.

(査読有り)

〔学会発表〕(計6件)

①上野太郎

子どもの成長と睡眠 -学力向上への睡眠の重要性-

熊本県医師会主催 市民公開講座

2015年9月6日

ホテル熊本テルサ 熊本県熊本市

(招待講演)

②上野太郎

ぐっすり眠って元気な仙台っこ -よい睡眠習慣を取り戻そう

仙台市教育委員会主催 仙台っこ健康セミナー

-

2015年8月4日

旭ヶ丘市民センター 宮城県仙台市

(招待講演)

③上野太郎

児童生徒の睡眠障害について

北区教育委員会主催 学校保健会総会

2015年5月14日

滝野川文化センター 東京都北区

(招待講演)

④上野太郎

睡眠研究の最前線

都民講座

2015年4月24日

公益財団法人東京都医学総合研究所 東京都世田谷区

(招待講演)

⑤ 上野太郎、 糸和彦

Sleep study using Drosophila

第 21 回日本時間生物学会シンポジウム

2014 年 11 月 8 日

九州大学 福岡県福岡市

⑥ 上野太郎、 糸和彦

睡眠と麻酔の類似性から探る新規睡眠関連
遺伝子

第 39 回日本睡眠学会シンポジウム

2014 年 7 月 4 日

あわぎんホール 徳島県徳島市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 太郎 (UENO, Taro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知
症・高次脳機能研究分野・主席研究員
研究者番号：30648267

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し