

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07119

研究課題名(和文) ヒト型染色体改変マウスの薬理遺伝学的解析

研究課題名(英文) Develop and analysis for chromosome mutant mice

研究代表者

野村 淳 (Nomura, Jun)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：70406528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、精神疾患、特に自閉症、統合失調症と相関するヒト染色体変異を反映した精神疾患モデルマウス(遺伝モデル)を新規に作製する事、そして、自閉症患者で高頻度で認められる『てんかん発作』に関し、自閉症と相関する染色体変異との間に有意な相関が認められるかを解析する事にある。本期間では、既に作製したヒト15q25.2-25.3欠失モデルマウスに加え、ヒト15q13.3欠失モデルマウス、さらにヒト15q11-13間に存在するGABA受容体クラスター欠失モデルを新たに作製した。またてんかん発作の薬理試験を実施、Flurothyl吸入型による安定した実験系により、15q13.3において有意な相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コミュニケーションの障害をコア症状とする自閉スペクトラム症は、単一遺伝子の変異とともに染色体レベルの欠失や重複でも相関が認められている。疾患の理解、創薬において動物モデルは必須であるが、染色体変異を反映したモデルは僅かである。このため本研究ではヒト染色体と相同性の高い15q25.2-25.3欠失モデルとともに、15q13.3欠失モデル、15q11-13内のGABA受容体のクラスターを欠失したモデルを新規で作製した。また自閉症患者ではてんかん発作も高頻度に認められるが、その関係を15q13.3モデルを用い解析したところ、当該染色体領域との有意な相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：In this term, we newly developed (chromosome mutant) animal models of autism spectrum disorder (ASD) for human 15q13.3 deletion, and GABA receptor cluster deletion in 15q11-q13 locus. In particular, 15q13.3 model mice showed social deficits which mimic core symptom of patients with ASD. Simultaneously, we performed seizure assay as pharmacological test using animal model of 15q25.2-25.3 deletion and 15q13.3 deletion mice. In this analysis we applied non-liquid gas-system which efficiently cause seizure-like symptoms. In this assay, 15q13.3 heterozygote deletion mice didn't show clear changes, however, 15q13.3 homozygote mice increased frequency of generalized seizures. We also analyzed gender difference using 15q13.3 heterozygote and homozygote mice. However, no differences were observed in this assay. Thus, we concluded that 15q13.3 locus is associated with both ASD-like symptoms and seizure, but gender may not associated with these symptoms.

研究分野：精神神経科学、染色体工学

キーワード：自閉症 染色体操作 動物モデル 統合失調症 てんかん 薬理

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コピー数多型 (Copy Number Variations: CNVs)は、ヒトゲノム DNA 多型の一つである一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms: SNPs)とは異なり、キロからメガベースに至る複数の遺伝子群のコピー数変化を伴う多型 (欠失, 重複) と定義されている (Stranger BE, Science, 2007; Freeman JL et al., Genome Research, 2006). 近年, がんを含む様々な疾患との相関が次々に報告されている一方, 自閉症, 統合失調症といった精神神経疾患との相関が認められる CNV も次々に報告されている (Sebat J et al., Science, 2007; Xu B et al., Nature Genetics, 2008). 米国サイモンズ財団による自閉症のデータベース・アーカイブにおいても数百を超える CNV が自閉症との相関を認めている (<https://gene.sfari.org/database/cnv/>). 次世代シーケンサー (Next generation sequencer: NGS)等遺伝学研究をサポートする機器の発展も新たな遺伝子・染色体変異・マーカーの発見の一助となっており, 現在もより信頼しうるマーカーが次々に報告されている.

ヒト遺伝学を模倣した動物モデルは, 個体レベル, 脳 (組織) レベルでの研究を可能とし, 創薬面においても薬効評価・毒性評価等において必須である. 自閉症研究においても, 様々なモデルが開発されてきた. 自閉症の CNV を対象とした動物モデルは 15q11-q13 の重複モデルに端を発し (Nakatani J, Tamada K et al., Cell, 2009), モデルの作製が進んでいるものの, 未だ自閉症疾患動物モデル研究はリスク遺伝子として同定された『単一遺伝子』を対象とした遺伝モデルに依存しているのが現状である. 自閉症 (疾患) 発症のメカニズム, 脆弱性経路の同定等, 創薬の作用点をスクリーニングするトランスレショナルリサーチには CNV を含めたヒト遺伝背景を正確に反映した様々なタイプの疾患モデル動物が複数必要である

本研究では申請者が新規に開発した『15q25.2-25.3(約 660 kb)の欠失モデル』を自閉症の疾患モデルとして使用する (図 1). 本染色体領域を欠失する患者は, 精神遅滞, 自閉症, 筋疾患等広範な精神神経疾患様の表現型を示す. なお, これまで本染色体領域を対象としたモデル動物は存在しない. 実験は, 薬理試験として DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs ; デザイナードラッグ特異的に活性化される人工受容体) による非侵襲型実験系により, 脆弱部位における条件付き遺伝子発現制御による自閉症様行動のレスキュー実験を行う. また同時に, 薬理実験として, 自閉症患者において高頻度で付随する表現型である『てんかん発作』に関する実験を行う. 本 15q25.2-25.3 のモデル, さらに他の自閉症モデルでも『てんかん発作』, 刺激に対して過敏であるか解析を行う.

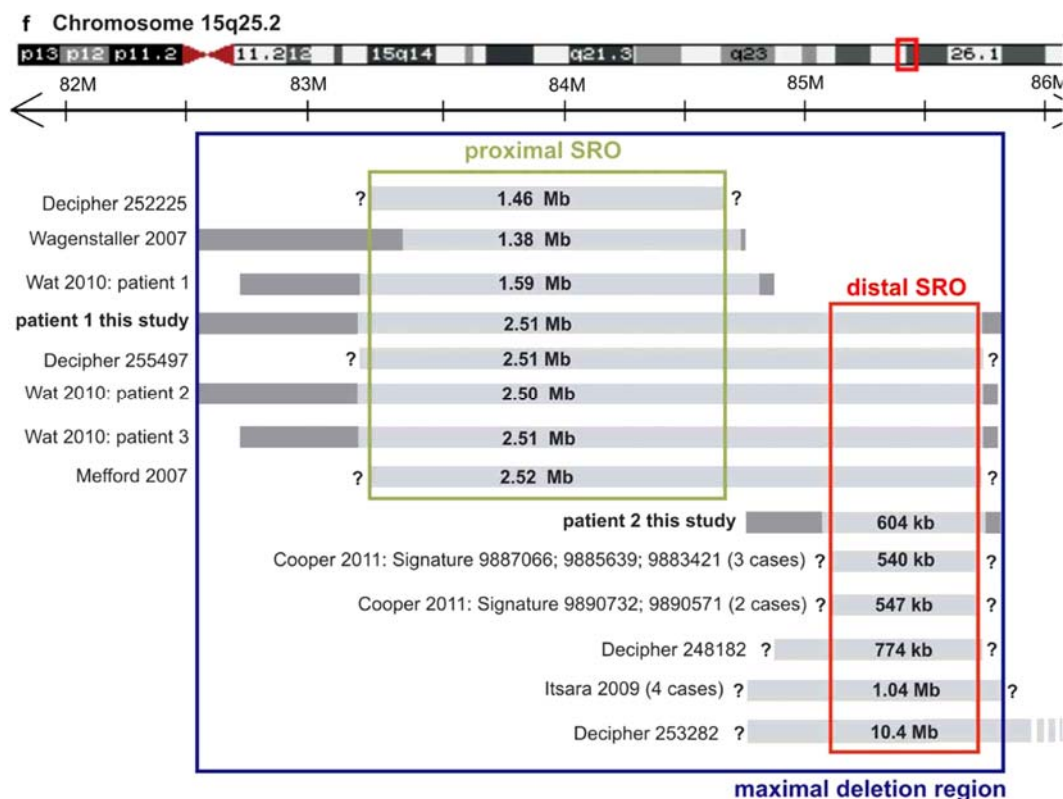


図 1. 発達障害・精神遅滞と相関する染色体領域 (15q25.2-25.3)

本研究が対象とする, distal SRO (Smallest Region of Overlap)を欠失する患者は広範な神経精神疾患様症状を示す (Doelken et al., 2012 より抜粋)

2. 研究の目的

(1) 自閉症と相関する染色体変異を有する新規の自閉症動物モデルを開発する:

現在自閉症の基礎研究において染色体レベルでの変異を有する動物モデルが少なく、さらなる自閉症病態生理の理解においてモデルが必要である。作製にはゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 のシステムを用いて作製する。

(2) 自閉症染色体変異モデルを用いて薬理試験を実施する:

15q25.2-25.3 欠失モデルは既に MRI (Magnetic Resonance Imaging: 磁気共鳴画像診断装置) を用いた脳画像イメージングから大脳皮質の一部、扁桃体での萎縮を認めている。したがって DREADD による条件付き遺伝子発現技術により、局所の遺伝子発現を正常化する事で脳構造、行動がレスキューされるか解析する。また、自閉症患者において高頻度に認められる『てんかん発作』に関する表現型(脆弱性)が、自閉症と相関する染色体変異モデルマウスでも同様に認められるか、薬理実験を実施し、自閉症との関連を考察する。

3. 研究の方法

Seizure assay

Flurothyl-induced seizure

10% Flurothyl, 200 (μl/min)



図 2. てんかん発作試験の概要

既存の方法(マウスへの液体試薬のインジェクション)と異なり、ガス状のてんかん発作誘導試薬の噴霧となる事から、より安定した試験結果を得ている。

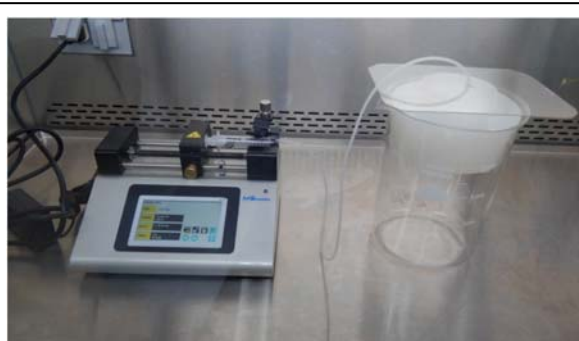


図 3. てんかん発作誘導実験で用いる機器

シリンジポンプにより一転時間内に Flurothyl がビーカー内に流入する(図 1)。ビーカー内上部にはろ紙が設置してあり、ビーカー内のマウスはガス状の Flurothyl を吸入する事になる。

動物モデルの作製は、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 のシステムにより、対象染色体領域の両末端に位置する配列をデザイン、末端を切断する形で対象領域を削除するようにした。染色体の改変はマウス ES 細胞内、もしくは受精卵での改変を行った。

薬理試験は既存のけいれん惹起物質『ペンチレンテトラゾール(PTZ)』の腹腔内投与を実施したが安定した結果が得られず、新たな実験系として Benjamin Philpot により提案されたガス状噴霧による (Judson MC et al., Neuron, 2016) GABA A 受容体アンタゴニストである flurothyl 誘導系実験を実施した。

4. 研究成果

自閉症の染色体改変マウスとして、15q25.2-25.3 欠失に加え、15q13.3 欠失、15q11-13 内に存在する GABA クラスター欠失マウスを得た。本モデルマウスは、新たな染色体レベルのマウスとして、自閉症の病態生理の個体レベルの理解を目的に解析を進める。

薬理的解析には、当初 DREADD による非侵襲的手法によるレスキュー実験を行う予定であったが、新規染色体改変動物モデルの作製に当初の予定以上の時間がかかり、DREADD ベクターの調製にとどまった。その一方、『てんかん発作』に関する薬理実験では、PTZ の腹腔内投与から、ガス状にてんかん発作誘導剤を噴霧する新たな系を確立する事で、安定した実験を行うことが出来た。本研究では、特に系の確立から 15q13.3 欠失モデルを用いて研究を行った。15q13.3 ヘテロ欠失モデルでは、『てんかん発作の頻度』では野生型との間に差は認められなかったものの、15q13.3 アレルを完全に欠失したノックアウトマウスでは、有意な頻度の上昇が認められた。自閉症患者としてんかんの相関関係は不明な点が多いが、本モデルマウスは今後両者の因果関係を解明する上で重要なモデルになりうると思われる。なお、自閉症における性差については、男子が女子に比べ 4 倍多い事が既に知られている。実際 CHD8 変異マウスにおいても雄マウスで自閉症症状を呈する (Jung H et al., Nature Neurosci., 2018)。本マウスを用い、性差がてんかんに及ぼす影響を解析したが、有意な差は認められなかった。したがって本研究から、15q13.3 染色体領域はてんかん症状と有意な相関が認められるものの、その頻度・症状には性差は認められない事が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hui K, Katayama Y, Nakayama KI, Nomura J, Sakurai T.	4. 巻 110
2. 論文標題 Characterizing vulnerable brain areas and circuits in mouse models of autism: Towards understanding pathogenesis and new therapeutic approaches.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci. Biobehav. Rev.	6. 最初と最後の頁 77-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neubiorev.2018.08.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nomura, Jun; Kanda, Akifumi; Ellegood, Jacob; Lerch, Jason; Sotomaru, Yusuke; Takumi, Toru
2. 発表標題 Phenotypic analysis of a mouse model for 15q25.2-25.3 deletion syndrome.
3. 学会等名 26th Annual Meeting of the International Behavioral Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nomura, Jun; Kanda, Akifumi; Ellegood, Jacob; Lerch, Jason; Sotomaru, Yusuke; Takumi, Toru
2. 発表標題 Brain structural and behavioral abnormalities in a mouse model for 15q25.2-25.3 microdeletion syndrome
3. 学会等名 第60回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nomura, Jun
2. 発表標題 Comprehensive analysis identified CNV- and cell type specific vulnerability across psychiatric disorders
3. 学会等名 The 10th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 野村淳, 内匠透	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 234
3. 書名 自閉症学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----