

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06504

研究課題名(和文)小頭症および大頭症の病態メカニズムの解明と治療法の探索

研究課題名(英文)Pathophysiological mechanisms for microcephaly and macrocephaly

研究代表者

伊藤 日加瑠(Hikaru, Ito)

東京医科歯科大学・統合研究機構・助教

研究者番号：50587392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現在、小頭症や大頭症など脳の大きさに異常をきたす神経発達障害への治療法は全く無く、その病態も未解明な部分が多い。そこで、Kdm5c 遺伝子変異による脳の大きさの異常を分子レベル、細胞レベル、個体(マウス)レベルで解析し、その病態メカニズムを解明することを目的として、本研究課題を実施した。その結果、小頭症を呈するKdm5c変異マウスの脳および神経細胞では、神経細胞の分化に關与する遺伝子群の発現増加がみられた。また、神経幹細胞の増殖や分化を制御している新たなKdm5c結合蛋白質も複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題の研究成果によって、小頭症を引き起こす新たなメカニズムの一端を解明できる可能性が示唆された。小頭症の病態メカニズムは未だ不明な点が多く、今後、さらに精査していくことにより、将来的な小頭症の治療へと応用することも十分可能であると考えている。さらには、本研究成果を発端として小頭症だけでなく大頭症など脳の大きさに異常をきたす神経発達障害の根本的な治療法開発へとつなげていく。

研究成果の概要(英文)：There are no therapeutic methods for microcephaly and macrocephaly. Moreover, pathophysiological mechanisms underlying these neurodevelopmental disorders remain unclear. Therefore, we had tried to generate novel kdm5c mutant cell and mouse models by using CRISPR-Cas9 system for developing models of microcephaly and macrocephaly. At first, we developed the cell models. And, we also analysed the gene expression levels in the cells and brains of Kdm5c mutant mice which has been showed microcephaly. As a results, we found that some genes of the neural differentiation category were up-regulated in the cells and brains of Kdm5c mutant mice. And also, we found novel KDM5c binding protein which has been thought as a regulator of neural differentiation.

研究分野：神経科学

キーワード：神経発達障害 小頭症 発生 モデル動物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児の2%にも及ぶ神経発達障害は、現代社会において多くの問題を引き起こしている。神経発達障害児では、小頭症や大頭症のほか、知的障害、自閉症、注意欠陥多動性障害、てんかん、運動障害などの様々な症状がみられる。また、多くの患者で複数の症状が混在してみられ、非常に複雑な病態を呈しているため、現在でも有効な治療法は確立していない。これまでの研究によって、神経発達障害の症状のうち、知的障害や自閉症などに対する研究成果は多数報告され、治療法の確立へ向けて進展している。しかし、小頭症や大頭症など脳の大きさに異常をきたす症状への治療法は全く無く、その病態も未解明な部分が多い。

神経発達障害の原因遺伝子として、現在までに多くの遺伝子が同定されているが、*Kdm5c* / *Jarid1c* もその一つである (Jensen et al., Am. J. Hum. Genet., 2005)。欧州の大規模調査によると、*Kdm5c* 遺伝子変異を持つ患者は *FMR* 遺伝子、*ARX* 遺伝子、*MECP2* 遺伝子に変異を持つ患者に次いで4番目に多いことが報告されている (de Brouwer et al., Hum. Mutat., 2007)。日本国内においても、*Kdm5c* 遺伝子変異を持つ患者が報告されており、比較的頻度の高い原因遺伝子である (Fujita et al., Clin. Genet., 2016)。

*Kdm5c* はヒストン H3 の4番目のリジンに対する脱リン酸化酵素であり、主に転写制御の働きを担う (Iwase et al., Cell, 2007)。この *Kdm5c* の遺伝子変異によって、小頭症や大頭症、知的障害、自閉症、注意欠陥多動性障害、攻撃行動など様々な症状が引き起こされることが既に報告されている (Ounap et al., Eur. J. Med. Genet., 2012)。興味深いことに、*Kdm5c* 遺伝子に変異がある知的障害の患者のうち28%で小頭症がみられ、16%の患者では大頭症がみられる。つまり、*Kdm5c* 遺伝子変異によって小頭症 (microcephaly) と大頭症 (macrocephaly) の両方が引き起こされる。

### 2. 研究の目的

本研究課題における目的は、小頭症および大頭症の病態メカニズムを解明し、脳の大きさの異常をきたす神経発達障害に対する治療法を開発することである。

これまでの研究によって、神経発達障害の症状のうち、自閉症や知的障害などに対する成果は多数報告されているが、小頭症や大頭症などの脳の大きさの異常は、神経発達障害の根源をなすと考えられながらも治療法を見出すことは困難とされ、未だ未解明な部分が多い。

そこで、*Kdm5c* 遺伝子変異による脳の大きさの異常を分子レベル、細胞レベル、個体 (マウス) レベルで解析し、その病態メカニズムを解明することが研究の目的である。さらには、その結果から得られた知見をもとに神経発達障害にみられる小頭症や大頭症の症状を緩和する新たな治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### ①新規細胞モデルおよびマウスモデル樹立用プラスミドベクターの構築

CRISPR/Cas9 システムを用いた *Kdm5c* 変異細胞およびマウスを作製するためにプラスミドの構築を行った。また、ヒト変異 *KDM5c* を過剰発現するためのプラスミドも構築した。

#### ②細胞培養およびトランスフェクション

上記で構築したプラスミドを Neuro2A 細胞株、マウス神経幹細胞、マウス ES 細胞へトラ

ンスペクションを行い、細胞増殖能および神経細胞への分化効率を計測した。

### ③ *Kdm5c* 変異マウスの神経細胞および脳組織における網羅的遺伝子発現解析

小頭症を呈する *Kdm5c* 変異 (エクソン 1 1 欠損) マウスの初代培養神経細胞ならびに脳組織から RNA 抽出を行い RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した。

### ④ 新規 *Kdm5c* 結合蛋白質の同定のための GST-pulldown と Mass spectrometry 解析

GST 融合ヒト変異 KDM5c タンパク質を精製し、脳組織抽出物と混和して、GST ビーズを用いて KDM5c タンパク質と結合タンパク質を抽出した。その後、抽出物を電気泳動し、Mass spectrometry で解析した。

## 4. 研究成果

### ① *Kdm5c* 変異細胞モデルの樹立

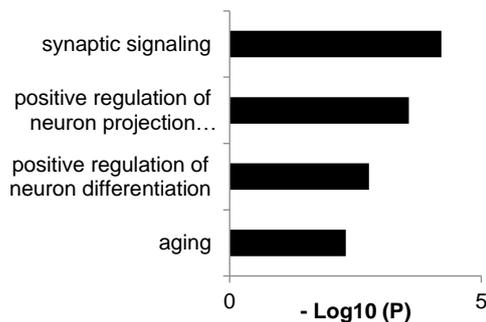
構築した各種プラスミドを導入した Neuro2A 細胞およびマウス神経幹細胞を解析したところ、小頭症を引き起こす変異を導入した細胞では、神経細胞への分化が亢進されていた。

### ② *Kdm5c* 変異マウスの神経細胞および脳組織における網羅的遺伝子発現解析

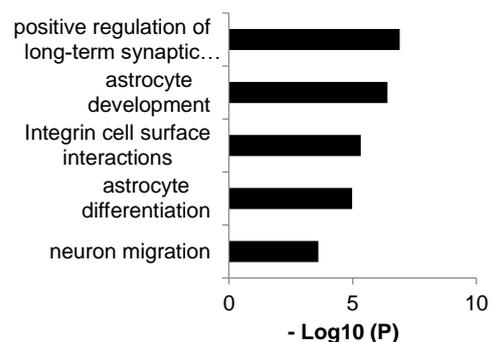
網羅的遺伝子発現解析の結果から、*Kdm5c* 変異 (エクソン 1 1 欠損) マウスの神経細胞および脳組織において、神経細胞への分化を誘導する遺伝子群の発現が増加や脳組織におけるアストログリアへの分化に関わる遺伝子群が抑制されていることが明らかとなった (図 1A, B)。

図 1 : 網羅的遺伝子発現解析データを GO classification 解析した結果

A 変異マウス神経細胞の発現増加遺伝子



B 変異マウス前頭葉の発現減少遺伝子



### ③ 神経細胞分化を制御する新たな *Kdm5c* 結合蛋白質の同定

Mass spectrometry の解析により新たな *KDM5c* 結合タンパク質を同定した (図 2, lane2)。

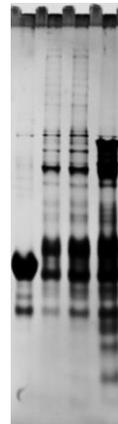
この新たな結合タンパク質は変異 KDM5c タンパク質とは結合し難いことも見出した (図 2, lane4)。

以上の成果から、*Kdm5c* 変異細胞およびマウス (エクソン 1 1 欠損) は、神経細胞への分化が亢進されることで、神経幹細胞の増殖が抑制され、その結果として小頭症が引き起こされることが示唆された。また、神経細胞への分化を制御している新たな *Kdm5c* の結合タン

パク質を同定した。そのタンパク質と変異 *Kdm5c* では結合が弱まり、神経細胞への分化が亢進されてしまう可能性を突き止めた。

図 2

Lane 1 2 3 4



Lane1: GST  
Lane2: Wildtype KDM5c-GST  
Lane3: mutant#1 KDM5c-GST  
Lane4: mutant#2 KDM5c-GST

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Hikaru, Nozaki Kanako, Sakimura Kenji, Abe Manabu, Yamawaki Shigeto, Aizawa Hidenori	4. 巻 46
2. 論文標題 Activation of proprotein convertase in the mouse habenula causes depressive-like behaviors through remodeling of extracellular matrix	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 442 ~ 454
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41386-020-00843-0	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 -
1. 著者名 Cui Wanpeng, Aida Tomomi, Ito Hikaru, Kobayashi Kenta, Wada Yusaku, Kato Shigeki, Nakano Takashi, Zhu Meina, Isa Kaoru, Kobayashi Kazuto, Isa Tadashi, Tanaka Kohichi, Aizawa Hidenori	4. 巻 40
2. 論文標題 Dopaminergic Signaling in the Nucleus Accumbens Modulates Stress-Coping Strategies during Inescapable Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7241 ~ 7254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0444-20.2020	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 該当する
1. 著者名 Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Ohgidani Masahiro, Yamawaki Yosuke, Sahin Ezgi Hatice, Kitajima Takashi, Katsumata Seishi, Yamawaki Shigeto, Kato Takahiro A., Aizawa Hidenori	4. 巻 162
2. 論文標題 Antidepressant effect of the translocator protein antagonist ONO-2952 on mouse behaviors under chronic social defeat stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 107835 ~ 107835
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuropharm.2019.107835	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 -
1. 著者名 Yamawaki Yosuke, Shirawachi Satomi, Mizokami Akiko, Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Asano Satoshi, Oue Kana, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto, Hirata Masato, Kanematsu Takashi	4. 巻 131
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates lipopolysaccharide-induced hypothalamic inflammation-mediated anorexia in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104563 ~ 104563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2019.104563	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 -

1. 著者名 Yamawaki Yosuke, Yoshioka Norika, Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Oda Keisuke, Harada Kana, Shirawachi Satomi, Asano Satoshi, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto, Kanematsu Takashi, Akagi Hiroyuki	4. 巻 1680
2. 論文標題 Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 13~38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2017.12.004	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ito H, Nozaki K, Aizawa H.
2. 発表標題 Up-regulation of proprotein convertase in the mouse lateral habenula causes depressive-like behaviors through activation of Matrix metalloproteinases.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ito H, Asakura Y, Asakura A
2. 発表標題 Generation of myogenic stem cells from iPS cells via blastocyst complementation.
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------