

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03318

研究課題名(和文) ニューロン新生におけるPax6-FMRPフィードバック制御機構の性差

研究課題名(英文) Sex Differences in Pax6-FMRP Feedback Regulation Mechanisms in Neurogenesis

研究代表者

大隅 典子 (OSUMI, Noriko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00220343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：脳の形態、脳疾患の発症頻度の男女差が脳の発生発達の過程においてどのように生まれるのかについて、本研究では、ニューロン新生を制御する転写制御因子Pax6と、重篤な精神遅滞の原因因子FMRPに着目した。マウス胎仔脳を用いて、RNA結合タンパク質FMRPの標的mRNAを同定し、ニューロン新生が盛んに生じている胎仔大脳皮質原基のRNA-seqデータと統合することにより、遺伝子発現量に雌雄差を示す遺伝子群を同定した。これらの結果から、雌雄で異なる発現量を示すFMRP標的mRNAを発見し、Pax6以外の雌雄差を示すFMRP制御分子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおいて脳の形態や脳疾患の発症頻度に男女差があることは広く知られている。しかしながら、このような性差が脳の発生発達の過程においてどのように生まれるのかについて、性ホルモンの影響以外のメカニズムは未知である。そこで本研究では、脳の発生発達維持の根本であるニューロン新生を制御する転写制御因子Pax6と、重篤な精神遅滞の原因因子FMRPに着目し、胎生期の脳における遺伝子発現の性差を生み出す分子メカニズムの一端を解明した。

研究成果の概要(英文)：To understand how sex differences in brain morphology and incidence of brain diseases arise during brain development, this study focused on Pax6, a transcriptional regulator of neurogenesis, and FMRP, a causative factor of severe mental retardation. Using embryonic mouse brain samples, we identified target mRNAs of the RNA-binding protein FMRP and integrated them with RNA-seq data from the embryonic cortical primordium, where neurogenesis is actively occurring, to identify genes that show sex differences in their expression levels. From the results obtained, we identified FMRP target mRNAs that are differentially expressed in males and females, and identified FMRP regulatory molecules other than Pax6 that show sex differences.

研究分野：神経発生学、分子生物学、発生発達神経科学

キーワード：性差 ニューロン新生 Pax6 FMRP RNA結合タンパク 標的遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて脳の大きさや形態、脳の病気の発症頻度について男女差があることは広く知られているが、このような性差が脳の発生発達や維持の過程においてどのように生まれるのかに関して、性ホルモンの影響以外のメカニズムについてはほとんど謎である。

我々はこれまでに脳の発生発達維持の基盤となるニューロン新生に着目し、その分子メカニズムに関する研究を行ってきた。その過程において、ニューロン新生を制御する転写制御因子 *Pax6* が、自閉スペクトラム症 (ASD) のリスク因子であることを見出した<sup>1)</sup> (シモンズ財団の自閉症関連遺伝子データベース SRARI にも掲載)。*Pax6* 遺伝子自然発症変異ヘテロ接合ラットは、ASD 様の行動異常を示すが<sup>2)</sup>、その後の MRI 解析により、*Pax6* 変異ヘテロ接合ラットと野生型との脳の容積比較に関して雌雄差があることに気づいた<sup>3)</sup>。さらに、2007 年に報告された ASD の全ゲノム連鎖解析データでは、ヒト *PAX6* 遺伝子が位置する染色体 11p13 領域は、女兒を含む集団では顕著なオッズ比を示すが、男児のみの集団ではそうではない<sup>4)</sup>。最近では、女兒特異的な重篤な ASD に関わる遺伝子として、*Pax6* によって発現制御を受ける可能性のある  $\delta$  カテニンの遺伝子 (*CTNND2*) が報告されたが<sup>5)</sup>、マウスにおいて  $\delta$  カテニンは *Pax6* により発現制御を受ける遺伝子として知られる<sup>6)</sup>。また、脆弱 X 症候群 (fragile X syndrome) の原因遺伝子 *FMR1* は X 染色体遺伝子であり、当然ながら発症頻度に男女差があるが、この遺伝子をまったく持たない遺伝型 (-/-) の男児および女兒では、異なる症状が報告されている<sup>7)</sup>。*FMR1* によりコードされる FMRP は、RNA 結合タンパク質であり、神経新生に重要であることが示されたが<sup>8)</sup>、実は *Pax6* によって発現が制御される遺伝子である<sup>9)</sup>。これらの背景より、発生初期脳の遺伝子発現制御における雌雄差を理解する上で、*Pax6* およびその下流因子が大きな手がかりとなると考えられた。当研究室では別の研究プロジェクトとして、妊娠中に脂肪酸バランスに偏りのある (オメガ 6 過多) 餌投与を行って得られた仔マウスの不安行動が、雄に顕著に認められることも認めた<sup>10)</sup>。さらに、共同研究として、環境ホルモンの 1 種であるビスフェノール A の母体暴露により仔ラットの行動異常や遺伝子発現様態に性差があることも見出している<sup>11, 12)</sup>。

以上より、胎生期ニューロン新生における遺伝子発現の雌雄差は、これまで見過ごされてきた生命現象であり、その遺伝子発現制御の分子の実態を明らかにすることは、性ホルモンによる制御以外の脳の発生発達や、成体ニューロン新生による脳の維持における性差の謎に迫る極めて根源的な課題であると言える。

## 2. 研究の目的

上記のような背景と学術的な問いをもとに、本研究ではマウスをモデルとし、脳の発生発達維持の根本であるニューロン新生において、神経幹細胞/前駆細胞の増殖維持とニューロン分化を制御する *Pax6* と、RNA 結合タンパク質 FMRP に着目することにより、胎生期の神経幹細胞/前駆細胞における遺伝子発現の雌雄差の全体像を網羅的に明らかにし、FMRP と *Pax6* とのフィードバック作用を手がかりとして、性ホルモンによる脳構築の性差制御以外の生命現象としてニューロン新生における性差の謎に迫ることを目指した。

## 3. 研究の方法

上記の研究目的の遂行にあたり、分子生物学的解析や申請者らが得意とする実験発生的手法を駆使することにより、本研究課題に取り組んだ。

### (1) マウス胎仔大脳皮質における FMRP の標的 mRNA の同定

RNA 免疫沈降法と次世代シーケンシングを組み合わせた手法 (RIP-seq 法) によって網羅的に同定した FMRP 標的 mRNA について、脆弱性 X 症候群モデルである *Fmr1* ノックアウト (KO) マウス脳原基を用いてその機能を検討した。

### (2) マウス胎仔大脳皮質における発現に雌雄差のある遺伝子の同定

ニューロン新生が盛んに生じる胎齢 14.5 日目 (E14.5) の野生型の大脳原基を用いて RNA-

seq を行い、遺伝子発現量に雌雄差を示す遺伝子群を同定した。本結果と 1) で同定した FMRP 標的 mRNA 情報を統合してターゲットを絞った。

(3) 雌雄の脆弱性 X 症候群モデルマウスを用いたトランスクリプトーム解析の実施

*Fmr1* KO マウスの雌および雄の E14.5 の大脳原基を用いて RNA-seq を行い、*Fmr1* 機能阻害時の標的分子の発現レベルの雌雄差を検討した。

4. 研究成果

大脳皮質原基における FMRP の標的 mRNA を同定するために RIP-seq 法を行ったところ、FMRP が結合する分子が 865 個見つかった。脆弱 X 症候群は、神経発達障害の中でも比較的発症頻度が高い遺伝性発達障害であり、知的障害や自閉症様症状を示すことから、自閉症・知的障害・神経新生関連遺伝子のデータベースを参照し、FMRP 標的

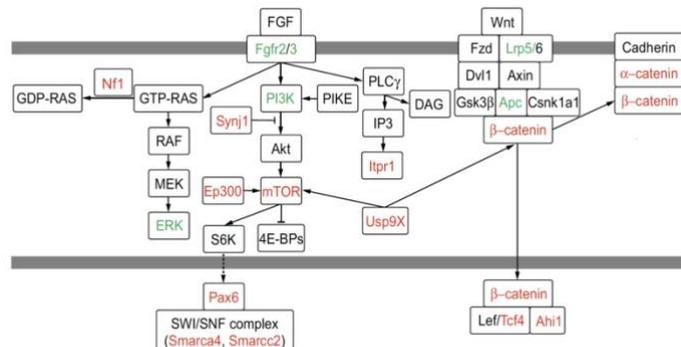


図1. RIP-seqにより同定したFMRP標的分子の経路

mRNA の中で該当するものを探索した。その結果、知的障害や自閉症、神経新生に関連する分子が多数含まれており、知的障害・自閉症・神経新生の全ての機能カテゴリーに属する分子に着目すると、そのなかには転写制御因子 Pax6 および Ras/MAPK、Wnt/β-catenin、mTOR シグナル経路に関連する分子が含まれていることを明らかにした (図 1、文献<sup>13)</sup>)。さらに *Fmr1* KO マウスを用いて、これらの経路に関するタンパク量を定量したところ、リン酸化 mTOR 量が増加しており、*Fmr1* KO マウスでは mTOR 経路が異常に活性化されていた。これまでに、*Fmr1* KO マウスでは、胎仔期における神経細胞の形成過程に異常が認められることが報告されており、今回明らかにした分子は胎仔期の脳の正常な発生発達に関与し、その異常によって脆弱 X 症候群が引き起こされている可能性が示唆された (図 2、文献<sup>13)</sup>、東北大学プレスリリース<sup>14)</sup>)。

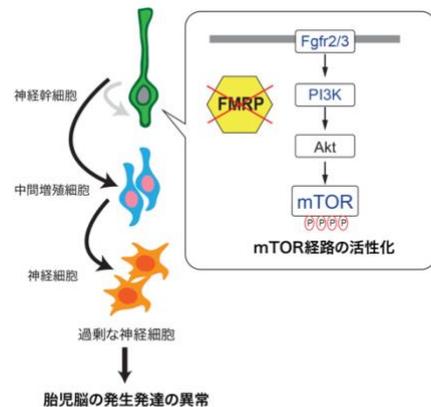


図2. *Fmr1* 遺伝子の変異による分子経路の変化と神経の発生に与える影響

次に、これらの FMRP 標的分子の雌雄差を見いだすために、野生型マウス E14.5 の大脳原基を用いて、RNA-seq を行った。この解析から、大脳原基では E14.5 の時点で、性染色体上に存在する遺伝子の他に、多数の雌雄差を示す遺伝子群を見いだした。興味深いことに、RIP-seq により同定した FMRP の標的分子の中には、雌でより高発現している分子が多く存在していることが明らかとなった (図 3)。これらの結果より、胎生期の大脳発生過程によりにおける FMRP の機能には性差が認められる可能性がある。現在、より雌雄差を示す分子について、実験発生的手法により、大脳皮質発生過程における機能を解析している。

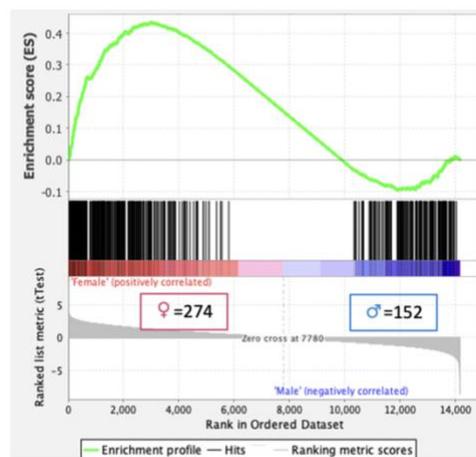


図3. FMRP標的分子の雌雄差

さらに、FMRP は標的 mRNA の安定性に関わることから、FMRP による mRNA 量の制御に雌雄差があるかどうかについて調べるために、雌

雄の野生型、雌雄の *Fmr1*KO マウス (*Fmr1*<sup>-/-</sup>, *Fmr1*<sup>+/Δ</sup>)、雌の *Fmr1* ヘテロ接合体(*Fmr1*<sup>+/-</sup>)の E14.5 の大脳皮質原基を用いた RNA-seq 解析を実施した。この RNA-seq 解析は、本研究課題に基づいて採択された「新学術領域研究・先進ゲノム支援」の技術支援のもとで行った。現在、これらの遺伝子型のマウスにおいて雌雄で異なる遺伝子発現量差を示す mRNA について解析中である。この解析により、計画当初に着目していた Pax6 に加えて、FMRP 制御分子の性差に迫ることで、脳発生プログラムによる神経発達障害の性差を生み出すメカニズムの一端を解明できることが期待される。

<引用文献>

- 1) Maekawa M et al.: A novel missense mutation (Leu46Val) of PAX6 found in an autistic patient. *Neurosci Lett* 2009, 462(3):267-71.
- 2) Umeda T et al.: Evaluation of Pax6 mutant rat as a model for autism. *PLoS One* 2010, 5(12):e15500.
- 3) Hiraoka K et al.: Regional Volume Decreases in the Brain of Pax6 Heterozygous Mutant Rats: MRI Deformation-Based Morphometry. *PLoS One* 2016, 11(6):e0158153.
- 4) Szatmari P et al.: Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 2007, 39, 319-328
- 5) Turner TN et al.: Loss of  $\delta$ -catenin function in severe autism. *Nature* 2015, 520, 51-56.
- 6) Duparc RH: Pax6 is required for delta-catenin/neurojugin expression during retinal, cerebellar and cortical development in mice. *Dev Biol* 2006, 300, 647-655.
- 7) Baker EK et al.: Intellectual functioning and behavioural features associated with mosaicism in fragile X syndrome. *J Neurodev Disord* 2019, 11(1):41.
- 8) Saffary R and Xie Z: FMRP regulates the transition from radial glial cells to intermediate progenitor cells during neocortical development. *J Neurosci* 2011, 31(4):1427-39.
- 9) Sansom SN et al.: The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet* 2009, 5, e1000511.
- 10) Sakayori N et al.: Maternal Nutritional Imbalance between Linoleic Acid and Alpha-Linolenic Acid Increases Offspring's Anxious Behavior with a Sex-Dependent Manner in Mice. *Tohoku J Exp Med* 2016, 240(1):31-7.
- 11) Thongkorn S et al.: Sex differences in the effects of prenatal bisphenol A exposure on autism-related genes and their relationships with the hippocampus functions. *Sci Rep* 2021, 11(1):1241.
- 12) Kanlayaprasit S et al.: Autism-Related Transcription Factors Underlying the Sex-Specific Effects of Prenatal Bisphenol A Exposure on Transcriptome-Interactome Profiles in the Offspring Prefrontal Cortex. *Int J Mol Sci* 2021, 22(24):13201.
- 13) Casingal C et al.: Identification of FMRP target mRNAs in the developmental brain: FMRP might coordinate Ras/MAPK, Wnt/ $\beta$ -catenin, and mTOR signaling during corticogenesis. *Mol Brain* 2020, 13(1):167.
- 14) 東北大学プレスリリース : 指定難病脆弱 X 症候群発症の新たな分子メカニズムの解明 胎仔脳での特定分子経路の活性化が原因の可能性 . 2020 年 12 月 6 日 <https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/12/press20201216-01-fxs.html>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kikkawa Takako, Osumi Noriko	4. 巻 15
2. 論文標題 Multiple Functions of the Dmrt Genes in the Development of the Central Nervous System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.789583	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kanlayaprasit Songphon, Thongkorn Surangrat, Panjabud Pawinee, Jindatip Depicha, Hu Valerie W., Kikkawa Takako, Osumi Noriko, Sarachana Tewarit	4. 巻 22
2. 論文標題 Autism-Related Transcription Factors Underlying the Sex-Specific Effects of Prenatal Bisphenol A Exposure on Transcriptome-Interactome Profiles in the Offspring Prefrontal Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13201 ~ 13201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222413201	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 Kimura Ryuichi, U. Inoue Yukiko, Kikkawa Takako, Tatehana Misako, Morimoto Yuki, Inada Hitoshi, Oki Shinya, Inoue Takayoshi, Osumi Noriko	4. 巻 251
2. 論文標題 Detection of REST expression in the testis using epitope tag knock in mice generated by genome editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 525 ~ 535
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.417	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 Cristine R. Casingal, Takako Kikkawa, Hitoshi Inada, Yukio Sasaki & Noriko Osumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of FMRP target mRNAs in the developmental brain: FMRP might coordinate Ras/MAPK, Wnt/ -catenin, and mTOR signaling during corticogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00706-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takako Kikkawa, Cristine R. Casingal, Yukiko U. Inoue, Sara Ebrahimiazar, Hitoshi Inada, Noriko Osumi
2. 発表標題 Identification of FMRP target mRNAs in the developmental brain: FMRP might coordinate mTOR signaling during corticogenesis.
3. 学会等名 7th Congress of AsCNP (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sharmin Naher, Takako Kikkawa, Noriko Osumi
2. 発表標題 Identification of motor proteins mediating basal transport of Cyclin D2 mRNA in the neural stem/progenitor cells.
3. 学会等名 The 80th Fujiwara seminar "Molecular and cellular mechanisms of brain systems generating individuality" (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sara Ebrahimiazar, Takako Kikkawa, Noriko Osumi
2. 発表標題 Investigation of the role of gender difference in FMRP mRNA targets during corticogenesis
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sharmin Naher, Takako Kikkawa, Noriko Osumi.
2. 発表標題 Identification of motor proteins mediating basal transport of mRNA of a cell cycle regulator Cyclin D2 in the neural stem/progenitor cells.
3. 学会等名 23rd Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Cristine R. Casingal, Takako Kikkawa, Hitoshi Inada, Noriko Osumi
2. 発表標題 Identification of FMRP mRNA targets during corticogenesis
3. 学会等名 第14回神経発生討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Cristine R. Casingal, Takako Kikkawa, Hitoshi Inada, Noriko Osumi
2. 発表標題 Enhanced mTOR signaling activity in Fmr1 knockout embryonic brain during corticogenesis
3. 学会等名 新学術領域研究「個性」創発脳第5回領域会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Cristine R. Casingal, Takako Kikkawa, Hitoshi Inada, Noriko Osumi
2. 発表標題 Identification of FMRP target genes expressed during corticogenesis
3. 学会等名 NPBPPP 2020合同年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

指定難病脆弱 X 症候群発症の新たな分子メカニズムの解明  
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2020/12/press20201216-01-fxs.html>  
 New Insights into Fragile X Syndrome and the Fetal Brain  
[https://www.tohoku.ac.jp/en/press/new\\_insights\\_fxs.html](https://www.tohoku.ac.jp/en/press/new_insights_fxs.html)

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
研究分担者	稲田 仁  (Inada Hitoshi)  (60419893)	東北大学・医工学研究科・特任准教授    (11301)	
研究分担者	吉川 貴子  (Kikkawa Takako)  (90727851)	東北大学・医学系研究科・助教    (11301)	

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