

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791212

研究課題名(和文)染色体工学を用いた精神疾患モデルマウスの統合的解析

研究課題名(英文) Analysis of mouse and cellular models of psychiatric disorders using a chromosome engineering

研究代表者

野村 淳(Nomura, Jun)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・特任助教

研究者番号：70406528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：最近、大規模な発達障害患者のゲノムDNAデータを用いた遺伝学的解析により『15q25』の染色体領域の欠失が報告された。本染色体内の欠失領域は600キロベースを超える巨大なものであり、しばしば疾患との相関が報告される一塩基置換とは異なる。我々は、染色体レベルの変異と発達障害発症との関係を明らかにするため、本染色体領域を欠失した細胞および動物モデル作製を試みた。本期間内において、染色体工学的手法による染色体操作により、ヒト染色体欠失領域を忠実に反映したマウスES細胞を樹立した。これまで染色体改変ES細胞では際立った表現型は認められない。一方、本領域の染色体改変マウスモデルの作製も同時に進めている。

研究成果の概要(英文)：Recently CNVs (Copy number variations) have been widely known as a genetic structural variants, and accumulating evidence indicate some types of CNVs are associated with psychiatric diseases, eg, autism and schizophrenia. Since CNV includes deletion, duplication, translocation, and ranging from kilo- to mega-bases, some gene that locate in CNV locus may affected. Especially dosage sensitive genes may cause aberrant gene expression by chromosomal mutation may fundamental of pathogenesis of psychiatric diseases.

In this study, we chose novel CNV, 15q25. Patients who delete this region have developmental disease with intellectual disability, myopathy, and autism. To understand pathophysiology relevant to this CNV, we decided to develop animal and cellular model of CNV by chromosome engineering. In this term, we successfully generated 15q25 del mouse ES cells. So far this cells haven't show any exquisite phenotype. Mouse model is now backcrossing with B6 strain to establish congenic line.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：染色体工学 コピー数変異 精神疾患 ゲノム編集 発達障害 ジーンターゲット ES細胞 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

近年、大規模なヒト患者ゲノム DNA を用いた遺伝学的解析から、精神疾患に関わる可能性が示唆される染色体レベルでの領域が多数報告されてきている。これらは、これまで一塩基置換として知られてきた SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) とは異なり、コピー数変異 (Copy Number Variations: CNVs) と呼ばれる。CNV はキロベースからメガベースに至る染色体レベルでの変異であり、染色体レベルでの欠失、重複、転座等を含む。このため、変異領域に含まれる遺伝子 (群) は量的な発現変化を生ずる可能性が示唆される。

これまで精神疾患のモデル動物は、遺伝要因を排した薬理的モデル、もしくは疾患脆弱性遺伝子の一遺伝子に着目したノックアウト、トランスジェニックマウス等であり、遺伝子 (群) を含む染色体レベルでの変異である CNV を反映した疾患モデルは、僅か数例にとどまっていた。これは既存のトランスジェニックもしくはノックアウトマウスの作製技術が既に完成された域に達するのに対し、唯一の染色体改変技術である『染色体工学』はその技術的難易度の高さから、詳細なプロトコルの樹立が難しく、そのためモデルの作製が進まなかった事が最大の原因と考えられる。しかし、これまでのコホート、双生児を用いた遺伝学的研究からも明らかなように、自閉症、統合失調症といった精神疾患は CNV を含む遺伝要因が疾患の発症に影響する可能性が示唆されている。この事から、ヒト CNV を正確に反映した動物モデルは疾患の病態生理、今後の創薬研究に対し避ける事ができず必須といえる。

2. 研究の目的

遺伝学的に精神疾患と相関が認められた CNV、特に欠失領域を対象に、細胞 (マウス ES 細胞) および個体 (マウス) レベルで染色体を改変した発達障害モデルを染色体工学により作製する。なお、本研究はヒトへのトランスレーショナルリサーチを最大の目的とするため、ターゲットとする CNV (染色体領域) はヒトとの相関性が高い領域を選択する。

3. 研究の方法

遺伝学的手法により自閉症、精神遅滞を含む発達障害と相関が認められた最新の CNV を選択、また特にマウスの染色体領域との相関性が高い領域である 15q25 を選択した .15q25 領域の欠失は、発達障害患者ゲノム DNA サンプルからは 3 例が見出されており、本領域は 7 遺伝子を含んでいる。また、長さは 660kb に及び、ターゲットとする染色体の改変操作には、染色体工学を適用した (図 1)。

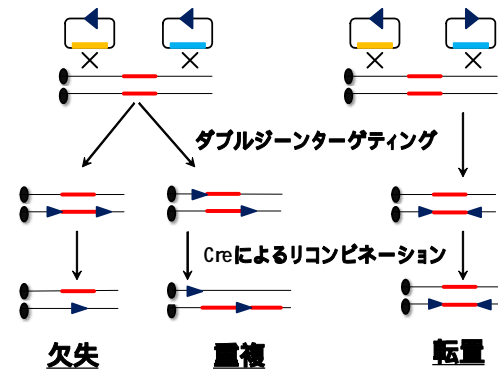


図 1. 染色体工学の概要

マウス ES 細胞内において (ターゲットとする染色体領域の両末端に対し) 相同組み換えを行う。本操作を実施するため、2 種類のターゲティングベクターをそれぞれ構築する必要がある。各ターゲティングベクターは LoxP 配列を 1 つ含んでいる。また、5' 側、3' 側ターゲティングベクターにはそれぞれヒト HPRT 遺伝子の 5' 側、3' 側の断片が挿入されている。通常ヒト HPRT 遺伝子は分断されているため、細胞内で発現する事はない。しかし、Cre タンパク質により LoxP 間の染色体配列を除いた場合にのみ、二つに分断されたヒト HPRT 遺伝子が再結合し発現する。HPRT を発現する細胞は HAT 培地にて選択できるため、LoxP 間の配列を正確に除く事ができた細胞のみを選択できる。

構築したターゲティングベクターは細胞内へ導入し、ジーンターゲティングを行う。その後、サザン解析等によるターゲット染色体領域の相同組み換えを確認する。正しく挿入が行われた事が確認できた場合、もう片方のターゲティングも同様に行う。計 2 回のターゲティング (ダブルジーンターゲティング) を確認した後、Cre タンパク質を ES 細胞内で強制発現、その後 HAT 培地にて生存した細胞を選択する。

これら操作により LoxP 間のゲノム改変(欠失, 重複, 転置)を行う. Cre タンパク質導入後の LoxP 間のゲノム改変は, サザン解析, コピー数解析等により解析を行う.

(図は, Nomura J and Takumi T. Animal models of psychiatric disorders that reflect human copy number variation. Neural plasticity, 2012, 1-9, 2012 から引用, 図を一部改変して用いた.)

4. 研究成果

(1) ターゲット CNV(染色体領域)の選定.

新規に報告された CNV の情報を基に選定を行った. 特にマウス-ヒト間で遺伝子(群)が保存されているものを選択した. 最終的に対象とした CNV はヒト 15q25 領域であり, マウスでは 7 番染色体に存在する. 本染色体領域を選定した理由は以下 3 点である.

新規に報告された領域である事.

本染色体領域は, 2011 年に Nature Genetics において新たに報告された CNV である.

ヒトとマウス間で保存性が高い領域である事.

ヒトでは 15q25, マウスでの相同領域は 7 番染色体である. とともに 7 遺伝子を含んでいる.

機能未知な遺伝子を含んでいる事.

選択した新規 CNV に含まれる 7 遺伝子のうち 5 遺伝子は遺伝子欠損マウスが作製されておらず, ターゲット遺伝子の個体レベルでの機能が不明である. さらに 7 遺伝子のうち 2 つの遺伝子については細胞レベルでの機能も不明である.

(2) ターゲティングベクターの作製およびマウス ES 細胞への遺伝子ターゲティング.

染色体工学にはターゲットとなる染色体領域を挟む形で 2 つのターゲティングベクターが必要となる. 各ターゲティングベクターは, LoxP 配列および薬剤選別マーカーとして, ネオマイシン耐性遺伝子もしくはピューロマイシン耐性遺伝子をそれぞれ含んでいる (p5' Hprt(MHPP)/p3' Hprt(MHPP)).

C57BL6 系統のマウスのゲノムを鋳型に PCR を行い, ホモロジアームを作製, 2 種類の

ターゲティングベクターにそれぞれ挿入した. はじめに 5' 側のターゲティングベクターをマウス ES 細胞 AB2.2(HPRT 欠損)にエレクトロポレーション法により導入, ピューロマイシンを含む培地にて選択した. 薬剤選抜後, クローン化を行い, 各クローンは 3 つの異なる手法, 具体的には PCR 法, シークエンス, サザン解析によりゲノムへの挿入を確認した. 同様に, 5' 側が既にターゲティングされたクローンを用いて 3' 側ターゲティングベクターもエレクトロポレーション法により細胞内へ導入した. ネオマイシンによる選抜後, クローン化を行い, 各クローンは PCR 法, シークエンス, サザン解析によりベクターの挿入を確認した. ダブルターゲティングが成功したクローンは, Cre タンパク質を強制発現する事で数百キロベースに及ぶ染色体領域を除去した. Cre による巨大な染色体領域の除去は以下 6 種類の異なる手法にて確認を行った. 1) HAT 培地による生存, 2) ネオマイシン, ピューロマイシンによる細胞死, 3) PCR 法, 4) シークエンス, 5) サザン解析, 6) Real-time PCR によるコピー数解析, 以上全ての解析法で陽性を確認した.

(3) CNV モデル細胞 (染色体改変 ES 細胞) の解析およびモデルマウスの作製

染色体工学により得られたマウス ES 細胞はこれまで際立った表現型は認められない. 今後は神経系への分化実験も含めてさらに解析を進める予定である.

また, この染色体改変 ES 細胞は個体レベルでの解析を行うため, マウス胚盤胞へインジェクションし, モデルマウスの作製を進めている (図 2).

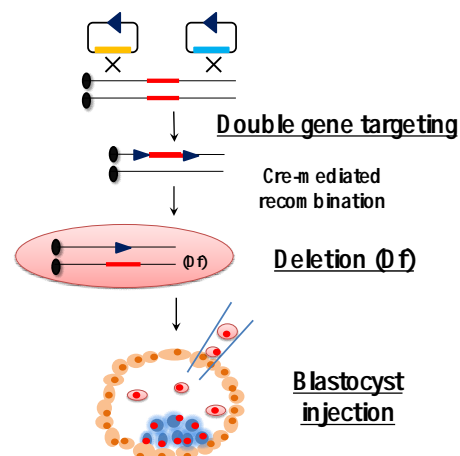


図2 . 染色体工学 (マウス作製まで)

ダブルジーンターゲットングにより得られた染色体改変 ES 細胞は, マウスのプラストシスト (胚盤胞) にインジェクションする事でキメラマウスを作製する. (Takumi et al., The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders. 2013 から引用, 図を一部改変.)

現在キメラマウスの作製を終え, モデルマウスの作製に成功した. 現在, 129 系統のバックグラウンドを持つ本モデルマウスと C57BL6 マウスとの戻し交配を進めている.

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 3 件)

(1) Nomura J and Takumi T. Animal models of psychiatric disorders that reflect human copy number variation. Neural plasticity., 2012, 1-9, 2012, 査読有 DOI: 10.1155/2012/589524

(2) Ma TM, Abazyan S, Abazyan B, Nomura J, Yang C, Seshadri S, Sawa A, Snyder SH, Pletnikov MV. Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via D-serine depletion. Molecular Psychiatry, 18, 557-567, 2012, 査読有 DOI: 10.1038/mp.2012.97

(3) Pogorelov VM, Nomura J, Kim J, Kannan G, Ayhan Y, Yang C, Taniguchi Y, Abazyan B, Valentine H, Krasnova IN, Kamiya A, Cadet JL, Wong DF, Pletnikov MV. Mutant DISC1 affects methamphetamine-induced sensitization and conditioned place preference: a comorbidity model. Neuropharmacology, 62, 1242-1251, 2012, 査読有 DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.02.003

[学会発表](計 3 件)

(1) Nomura J, Ma TM, Abazyan S, Abazyan B, Seshadri S, Sawa A, Snyder SH, Pletnikov MV. D-serine production is modulated by DISC1 and Serine racemase

interaction in astrocytes, 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Kobe, Japan, 1 Oct 2012

(2) Pletnikov MV, Ma TM, Nomura J, Abazyan B, Abazyan S, Sawa A, Snyder SH. DISC1 interacts with Serine racemase to modulate D-serine production in astrocytes, 3rd Biennial Schizophrenia International Research Conference, Florence, Italy, 18 April 2012

(3) Abazyan B, Ma TM, Nomura J, Abazyan S, Sawa A, Snyder SH, Pletnikov MV. DISC1 and serine racemase interact in astrocytes to regulate D-serine production, 3rd Biennial Schizophrenia International Research Conference, Florence, Italy, 15 April 2012

[図書](計 3 件)

(1) 野村淳, 内匠透, 羊土社, TALEN および CRISPR/Cas9 を用いた染色体改変法 - 簡便迅速かつ高効率な次世代染色体工学-, 実験医学別冊 今すぐ始めるゲノム編集, 2014, pp. 73-80

(2) 岸本恵子, 野村淳, 内匠透, 先端医学社, 自閉症のモデル動物, 自閉症の分子基盤, 分子精神医学, Vol.14, No.2, 2014, pp. 47-52

(3) Takumi T., Fukumoto K., Nomura J., A 15q11-q13 duplication mouse model of autism spectrum disorders. -IV MODEL SYSTEMS AND PATHWAYS IN AUTISM SPECTRUM DISORDERS- The Neuroscience of Autism Spectrum Disorders. Elsevier Inc., 2013, pp. 401-408

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野村 淳 (NOMURA Jun)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院 (医)・特任助教

研究者番号: 70406528