

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06765

研究課題名(和文) Depdc5コンディショナルノックアウトマウスを用いた神経精神疾患発症機序の解明

研究課題名(英文) Deciphering the pathogenesis of neuropsychiatric disease using Depdc5 conditional KO mice

研究代表者

石田 紗恵子 (Ishida, Saeko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：50777927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：てんかんと精神疾患は併発することが多く、背景に共通の病因・病態の存在が考えられている。しかし、その分子機構は未だ明らかになっていない。近年、DEPDC5遺伝子の変異が、てんかんおよび自閉症等の精神疾患を併発する家系から発見された。DEPDC5の機能解析は、両疾患の病態解明に貢献する。本研究では、DEPDC5機能と病態との関連を検討する目的で、てんかんおよび自閉症の発症に関連する脳部位特異的にDepdc5を欠失させたマウスをそれぞれ作製し、病態解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The comorbidity between epilepsy and psychosis is well known, but the underlying common pathogenesis remains unclear. Recently, mutations of DEP domain containing protein 5 (DEPDC5) gene have been reported from patients with various type of epilepsies and/or psychiatric disorders including autism spectrum disorder (ASD). It suggests that understanding the function of Depdc5 provides new insights into pathogenesis of both diseases.

Depdc5 is reported as an inhibitor of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1), a central regulator of cell growth, proliferation and protein synthesis. However, the function in brain is still unknown. Because homozygous Depdc5 knockout rodents are embryonic lethal, in this study, we conditionally deleted Depdc5 in brain of mice, and characterized their phenotypes.

研究分野：実験動物学

キーワード：てんかん 自閉症

1. 研究開始当初の背景

てんかんは、神経細胞の過度な放電に由来する反復性発作を特徴とし、人口の約 1% に生じる頻度の高い神経疾患である。種々の精神症状を併発し、患者の約 30% が自閉症スペクトラム (ASD)、統合失調症、うつ病、パーソナリティ障害などの精神疾患を示す (Mula et al., Nat Rev Neurol., 2012)。併発の要因には、てんかん発作による二次的な脳機能障害等も考えられるが、てんかん発症前の精神疾患罹患率が、非てんかん患者の罹患率よりも高いことから、背景にてんかんと精神疾患に共通した病因、病態の存在が推察されている (Lin et al., Lancet, 2012)。しかしながら、その分子機構は未だ明らかになっておらず、解明には新たなアプローチが必要となっている。

昨今、DNA 塩基配列読取技術の飛躍的な進歩により、効率的な疾患原因遺伝子の探索が可能になった。新規原因遺伝子の同定、およびその機能解析が新たな発症機序の解明や治療薬の開発につながることを期待されている。我々は近年、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析により、複数の家族性てんかんに共通する原因遺伝子として、DEP domain containing protein 5 (DEPDC5) を同定した (図 1 参照)。興味深いことに、DEPDC5 変異を有する患者には、ASD 等の精神疾患の併発が多く認められた。さらに、精神疾患のみを示す患者も認められたことから、DEPDC5 はてんかんのみならず、精神疾患の病因でもあることが指摘されている (Scheffer, Neuropediatrics, 2014)。両疾患の社会的重要性に鑑みて DEPDC5 機能障害による病態発症機序の解明は急務である。

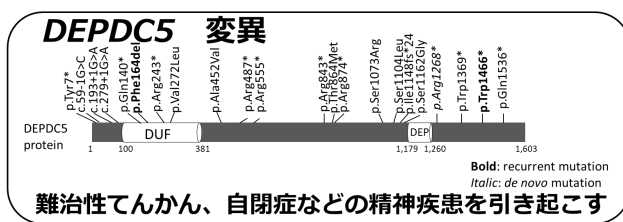


図 1. DEPDC5 の構造模式図と、患者から発見された変異の例

2. 研究の目的

DEPDC5 はこれまで報告されているイオンチャネル関連遺伝子などのてんかん原因遺伝子と相同性がなく、その病態発症機序は既知のものとは異なることが考えられる。しかしながら、生体内での機能はこれまで不明であった。そこで我々は、Depdc5 ノックアウト (KO) ラットを作製し、その解析を通じて、Depdc5 は成長因子や細胞ストレスなどの刺激にตอบสนองして細胞の成長・増殖等を制御する mechanistic target of rapamycin

complex1 (mTORC1) 経路の抑制因子であることを明らかにした。しかし、Depdc5 のホモ KO 個体は胎生致死を示し、その後の詳細な解析はできなかった (Marsan et al., Neurobiol Dis. 2016)。

そこで本研究では、Depdc5 を脳部位特異的に欠失させた conditional KO (cKO) マウスを作製し、その表現型解析を通じて、Depdc5 の機能障害がどのようにてんかん、精神疾患を引き起こすのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Depdc5 は脳全体に広く発現している。前脳は、てんかん発作の原因となる異常放電の好発部位である。また、小脳は近年、自閉症や統合失調症患者において、その神経細胞の大きさや密度の減少が報告されている。興味深いことに、Depdc5 と同様に mTORC1 抑制因子である Tuberous sclerosis 1 (Tsc1) 遺伝子の小脳神経細胞特異的 KO マウスが、自閉症様行動を呈したことから (Tsai et al., Nature, 2012) mTORC1 と精神疾患発症の関連が注目されている。

ゆえに本研究では、前脳および小脳の神経細胞特異的に Depdc5 を KO したマウスを作製し、それぞれのマウスにおいて、てんかん発症や、行動異常の有無の調査、および病理組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) cKO マウスの作製

cKO マウスを作製するにあたって、Cre-loxP システムを用いた。Cre-loxP システムは、バクテリオファージが有する組換え反応を活用した遺伝子組み換え技術であり、DNA 配列に組み込まれた loxP 配列に、Cre 酵素が反応することにより、組み換えが引き起こされることを利用している。つまり、標的遺伝子に loxP 配列を組み込んだマウスと、Cre 酵素を特定の場所でのみ発現させているマウスを交配することにより、特定の遺伝子が、特定の場所でのみ組換えられたマウスを作製することが可能となる。本研究では、まず初めに、loxP 配列を組み込んだ Depdc5^{lox/lox} マウスを、ゲノム編集技術である Cloning-free CRISPR-Cas9 システム (Aida et al., Genome Biology, 2015) を用いて作製した。

初めに、Benchling (benchling.com) を用いて、マウス Depdc5 遺伝子を標的とする複数の guide RNA (gRNA) 候補を設計、作製し、ターゲット配列を含む PCR 産物を用いた in vitro digestion assay により、高い切断効率を示す gRNA を選出した。次に、挿入する loxP 配列を含んだ single strand DNA (ssDNA) を作製した。そして、これら gRNA、

ssDNA と、trans-activating crRNA (tracrRNA) Cas9 タンパクを受精卵に導入した後、偽妊娠雌マウスに移植した。得られた産子は、シーケンス解析により、loxP 配列の挿入が確認されたうえで、野生型マウスに戻し交配された。

このように系統化された Depdc5^{flox/flox} マウスと、生殖系細胞に Cre を発現するマウスを交配することにより、Depdc5 KO マウスを作製した。その結果、先行研究と同時期に、ホモ型 KO マウスは、胎生致死を示した。また、Western blotting 法により、Depdc5 の欠失を認めた。これらの実験結果により、Depdc5^{flox/flox} マウスの有用性が確認された。

つぎに、前脳および小脳神経細胞特異的 Cre 系統マウスをそれぞれ Depdc5^{flox/flox} マウスと交配し、cKO マウスを得た(図 2 参照)。両 cKO マウスは胎生致死を示さず、想定されたメンデル比で得られた。このことより、Depdc5 KO マウスでは不可能だった、成体での Depdc5 機能解析が可能となった。

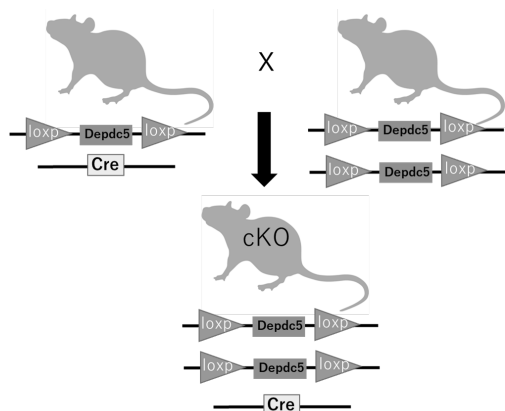


図 2. cKO マウスの作製

(2) cKO マウスの表現型解析

前脳神経細胞特異的 Depdc5 KO マウス

前脳神経細胞特異的 Depdc5 KO マウスは、出生時は、同腹仔の他マウスと体重や行動に違いを示さなかった。しかし、生後 2 週目ごろより体重増加に顕著な停滞が認められた。そこで、この時期の前後にわたって、長期間の 24 時間のビデオ撮影を行った結果、自発性のてんかん様発作を示していることがあきらかになった。発作は、観察した cKO マウス全てで認められ、このような行動異常は、他の同腹仔のマウスでは認められなかった。また、cKO マウスは、全個体が幼若期に死亡した。死亡は、強直発作の直後に認められ、死因としては呼吸困難に因ると考えられる場合と、頻回の発作により、十分な授乳を受けることができず、衰弱が考えられる場合が観察された。

cKO マウスの前脳は、コントロールマウス (Depdc5^{flox/flox}) に比べて大きく、病理学的

解析を行った結果、大脳皮質が肥厚しており、神経細胞の巨大化が確認された。このような巨大神経細胞の出現は、ヒト患者の難治性てんかんに認められているものと一致する。また、本研究遂行中に発表された、全神経において Depdc5 を KO したマウス (Depdc5^{flox/flox}-Syn1^{Cre}) においても、同様の表現型が報告されている (Yuskaitis et al., Neurobiol Dis. 2018)。

Depdc5 は前述の通り、mTORC1 経路の抑制因子であるため、Depdc5 の欠失は、mTORC1 の活性化を引き起こすことが考えられる。そこで、mTORC1 経路活性化の下流因子であるリン酸化 ribosomal protein S6 (pS6) の発現を免疫組織学的解析により調べた。その結果、肥厚が認められる大脳皮質において、pS6 の発現が顕著に増加していることが明らかになった。

mTORC1 は、細胞の成長を制御していることから、これらの結果より、Depdc5 の欠失による mTORC1 の活性化が巨大神経細胞の出現を引き起こし、てんかん発症につながる神経細胞の興奮性の上昇に関与した可能性が示唆された。今後、興奮性上昇の詳細なメカニズムを解明していく予定である。

小脳神経細胞特異的 Depdc5 KO マウス

小脳神経細胞特異的 Depdc5 KO マウスも前脳神経細胞特異的 Depdc5 KO マウスと同様に、胎生致死は示さず、出生時に、同腹仔の他マウスと違いは認められなかった。また、生後も、体重や生存に Depdc5^{flox/flox} と比べて、差は認められず、自発性のてんかん様発作も認められなかった。

現在、Depdc5 の欠失を確認したうえで、各種行動試験 (社会的相互作用試験、認知機能試験、新奇環境における活動性試験、コミュニケーション試験) を行っており、引き続き解析を行っていく予定である。

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 1 件)

Depdc5 knockdown causes mTOR-dependent motor hyperactivity in zebrafish.
de Calbiac H, Dabacan A, Marsan E, Tostivint H, Devienne G, Ishida S, Leguern E, Baulac S, Muresan RC, Kabashi E, Ciura S.
Ann Clin Transl Neurol. 2018 Apr 6;5(5):510-523. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

石田 紗恵子、てんかんと遺伝子、日本てんかん学会、京都、2017 年 11 月 3 日

石田 紗恵子、焦点性てんかん原因遺伝子
DEPDC5、日本薬理学会、長崎、2017年3月
17日

石田 紗恵子、焦点性てんかん原因遺伝子、
DEPDC5 KO ラットの解析、関西実験動物研
究会、京都、2017年3月3日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 紗恵子 (ISHIDA, Saeko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：50777927