

平成 31 年 4 月 8 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09970

研究課題名(和文) Sotos症候群の治療基盤確立のためのモデルマウス樹立と発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Establishment of the model mouse and elucidation of the onset mechanism for development of therapeutic basis in Sotos syndrome

研究代表者

東元 健 (Higashimoto, Ken)

佐賀大学・医学部・講師(特定)

研究者番号：30346887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Nsd1遺伝子を大脳皮質、海馬、嗅球特異的にノックアウトすることによって、Sotos症候群の学習障害モデルマウスの作製を試みた。まず、このマウスにおいて、RT-PCRより、大脳皮質、嗅球特異的にNsd1がノックアウトされていることを確認した。また、このマウスは、生後6週までは低体重を示すが、それ以降は通常の発育を示し、雌雄共に生殖能力を有していた。現在、このマウスの戻し交配を6回終え、解析できる状態となった。一方、Nsd1タンパクの標的遺伝子を同定するために、Nsd1遺伝子の下流に3xTY1タグを挿入したマウスの作製を試みているが、うまくいっていない。さらなる工夫を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sotos症候群(SoS)の特徴は、過成長、特異的顔貌、学習障害である。その原因遺伝子は、ヒストンH3リジン36メチル化酵素をコードするNSD1遺伝子であり、そのハプロ不全によって発症する。過去にNSD1のノックアウトマウスが作製されたが、ハプロ不全に相当するヘテロ欠損マウスの表現型は正常であり、一方、ホモ欠損マウスは胚性致死を示した。このように現在のところ、SoSのモデルマウスはない。また、SoSにおいて、QOL上、最も問題となるのは、学習障害である。本研究によるSoS学習障害モデルマウスの樹立は、その発症メカニズムの解明だけでなく、学習障害に対する治療法の開発に役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to establish Sotos syndrome model mice (SoS mice) with learning disability by conditional knockout of Nsd1 gene in the cerebral cortex, hippocampus and olfactory bulb. First, in SoS mice, it was confirmed by RT-PCR that Nsd1 was specifically knocked out in the cerebral cortex and olfactory bulb. In addition, SoS mice showed a low weight until 6 weeks after birth, but showed normal growth thereafter, and both male and female had reproductive ability. Currently, the mice have been backcrossed with C57BL/6J for 6 generations and can now be analyzed. On the other hand, in order to identify the target gene of the Nsd1 protein, we tried to establish the mice in which a 3xTY1 tag was inserted downstream of the Nsd1 gene, but it has not been successful. Further improvement is needed.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：Sotos症候群 NSD1 学習障害 モデルマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Sotos(SoS)の基本的特徴は、過成長、特異的顔貌、学習障害である。学習障害は、成人期に自立できる軽度のものから、自立困難な重度のものまであり、その程度は様々である。その他にも、骨年齢促進、心奇形、腎奇形、脊柱側彎などを合併する場合がある。原因遺伝子は、5q35 に位置する NSD1 遺伝子である。片アレルにおける NSD1 変異あるいは NSD1 を含む微細欠失によるハプロ不全によって発症する。

NSD1(Nuclear receptor-binding SET domain-containing protein 1)タンパクは、その名が示す通り核内レセプターと結合するタンパクとして同定された。NSD1 の構造には PHD、PWWP、SET ドメインなど様々なドメインを含んでいる。その中でも、PHD ドメインは特定のヒストン修飾に結合すること、SET ドメインはヒストン H3 リジン 36 をメチル化(H3K36me)する酵素活性を有することが分かっている。このようなヒストン修飾は、転写制御、細胞分裂、DNA 修復などに関与することが知られている。現在のところ、NSD1 は RNA ポリメラーゼ II のリクルートを促進し、転写を活性化する作用がある一方、転写因子である Nizp1 と結合する時は、転写抑制活性を示すことが知られている。このように NSD1 は、転写を正あるいは負に制御する。

過去に NSD1 の標的遺伝子の探索が、大腸癌細胞株 HCT116 を用いて行われた。その結果、300 以上の NSD1 標的遺伝子が同定された。しかしながら、SoS の表現型に直接関与すると思われる遺伝子は、BMP4 (bone morphogenetic protein 4) のみであり (Lucio-Eterovic AK et al. PNAS 107: 16952-7, 2010)、病態解明に必要な標的遺伝子の同定は十分ではない。また、過去に NSD1 ノックアウトマウスが作製されたが、ハプロ不全に相当するヘテロ欠損マウスの表現型は正常であり、一方、ホモ欠損マウスは胚性致死を示した。このように、ヘテロ欠損マウスは SoS の表現型を示さず、ホモ欠損マウスも出生まで至らないことから、現在のところ、SoS のモデルマウスは存在しない(Rayasam GV et al. EMBO J. 22: 3153-63, 2003)。

### 2. 研究の目的

SoS の特徴は、過成長、特異的顔貌、学習障害である。その中でも QOL 上、最も問題となるのは学習障害である。本研究の目的は、SoS 学習障害モデルマウスを樹立し、学習障害の発症メカニズムを解明することである。将来的には、このモデルマウスをエビジェネティック治療薬(ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬など)や分子標的治療薬のスクリーニングに用いることにより、SoS の治療基盤を確立することが可能になると考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) SoS 学習障害モデルマウスの樹立

Nsd1 遺伝子のエクソン 5 の上流と下流に loxP 配列が挿入された NSD1 flox マウスを C57BL/6J 系統にコンジェニック化する。コンジェニック化されたこのマウスを Emx1-Cre マウスと交配することにより、大脳皮質、海馬、嗅球特異的に Nsd1 を欠失させたマウス(Nsd1 cKO マウス)を作製する。次に、Nsd1 cKO マウスが SoS で見られる解剖学的、組織学的異常や学習障害を示すかどうかを調べる。

#### (2) NSD1 の標的遺伝子の同定

現在、クロマチン免疫沈降法 (ChIP)が可能な抗 NSD1 抗体はない。ChIP は、NSD1 の標的遺伝子を同定するために必要不可欠な手法である。そこで、CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集技術を用いて上述の NSD1 flox マウスの NSD1 の C 末端に 3xTY1 を挿入したマウスを作製する。このマウスの大脳皮質と海馬を用い、抗 TY1 抗体による ChIP-seq により、NSD1 の標的遺伝子を網羅的に探索する。さらに、抗 H3K36me 抗体を用いた ChIP-seq により、NSD1 の標的遺伝子のさらなる絞り込みを行う。

#### (3) RNA-seq

Nsd1 cKO マウスとコントロールマウスの大脳皮質、海馬より RNA を抽出し、NSD1 欠失による遺伝子の発現に対する影響を網羅的に探索する。

#### (4) 統合的解析

上記の解析結果を統合的に解析し、NSD1 欠失による学習障害発症メカニズムを解明する。

### 4. 研究成果

本研究では、Nsd1 遺伝子が大脳皮質、海馬、嗅球特異的にノックアウトすることによって、SoS の学習障害モデルマウス(Nsd1 cKO マウス)の作製を試みた。Nsd1 cKO マウスの大脳皮質、嗅球、肝臓の組織から RNA を抽出し、RT-PCR にて、大脳皮質、嗅球特異的に Nsd1 がノックアウトされていることを確認した。また、このマウスは野生型に比べて、生後 6 週までは低体重を示すが、それ以降は正常と体重は変わらず、通常の発育を示し、雄、雌共に生殖能力を有していた。しかしながら、このマウスは出生後の生存能力が野生型に比べて弱く、出生後、野生型の仔を一部間引きしなければ、生存できない特徴を持っていた。このことは、このマウスが何らかの脳の障害を持っている可能性を示唆する。現在、このマウスの戻し交配を 6

回終え、行動表現型解析を行うため、マウスを繁殖させている。一方、Nsd1 タンパクの標的遺伝子を同定するために、CRISPR/Cas9 により、Nsd1 遺伝子の下流に 3xTY1 タグを挿入したマウスの作製を試みている。しかしながら、今までに、ssODN のアームを長くしたり、受精卵でなく 2 細胞期の細胞に CRISPR/Cas9 を注入したり工夫をしてきたが、うまくいっていない。その原因は、おそらく CRISPR/Cas9 による切断部位と 3xTY1 タグの挿入部位が 30bp ほど離れているためと思われる。現在この点を改良した ssODN を作製している。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 8 件 )

1. Yamada T, Sugiyama G, Higashimoto K, Nakashima A, Nakano H, Sumida T, Soejima H, Mori Y. Beckwith-Wiedemann syndrome with asymmetric mosaic of paternal disomy causing hemihyperplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 査読有, 127(3), 2019, e84-e88.  
doi: 10.1016/j.oooo.2018.07.053.
  2. Hidaka H, Higashimoto K, Aoki S, Mishima H, Hayashida C, Maeda T, Koga Y, Yatsuki H, Joh K, Noshiro H, Iwakiri R, Kawaguchi A, Yoshiura KI, Fujimoto K, Soejima H. Comprehensive methylation analysis of imprinting-associated differentially methylated regions in colorectal cancer. *Clin Epigenetics*. 査読有, 10(1), 2018, 150.  
doi: 10.1186/s13148-018-0578-9.
  3. Joh K, Matsuhisa F, Kitajima S, Nishioka K, Higashimoto K, Yatsuki H, Kono T, Koseki H, Soejima H. Growing oocyte-specific transcription-dependent de novo DNA methylation at the imprinted Zrsr1-DMR. *Epigenetics Chromatin*. 査読有, 11(1), 2018, 28.  
doi: 10.1186/s13072-018-0200-6.
  4. Kawasaki Y, Makimoto M, Samejima A, Yoneda N, Higashimoto K, Soejima H, Yoshida T. Hepatoblastoma in an extremely low birth-weight infant with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr Neonatol*. 査読有, 59(5), 2018, 523-524.  
doi: 10.1016/j.pedneo.2017.11.012.
  5. Takamatsu Y, Higashimoto K, Maeda T, Kawashima M, Matsuo M, Abe T, Matsushima T, Soejima H. Differences in the Genotype Frequency of the RNF213 Variant in Patients with Familial Moyamoya Disease in Kyushu, Japan. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 査読有, 57(11), 2017, 607-611.  
doi: 10.2176/nmc.oa.2017-0036.
  6. Hori I, Kawamura R, Nakabayashi K, Watanabe H, Higashimoto K, Tomikawa J, Ieda D, Ohashi K, Negishi Y, Hattori A, Sugio Y, Wakui K, Hata K, Soejima H, Kurosawa K, Saitoh S. CTCF deletion syndrome: clinical features and epigenetic delineation. *J Med Genet*. 査読有, 54(12), 2017, 836-842.  
doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104854.
  7. Soma N, Higashimoto K, Imamura M, Saitoh A, Soejima H, Nagasaki K. Long term survival of a patient with Perlman syndrome due to novel compound heterozygous missense mutations in RNB domain of DIS3L2. *Am J Med Genet A*. 査読有, 173(4), 2017, 1077-1081.  
doi: 10.1002/ajmg.a.38111.
  8. Imagawa E, Higashimoto K, Sakai Y, Numakura C, Okamoto N, Matsunaga S, Ryo A, Sato Y, Sanefuji M, Ihara K, Takada Y, Nishimura G, Saito H, Mizuguchi T, Miyatake S, Nakashima M, Miyake N, Soejima H, Matsumoto N. Mutations in genes encoding polycomb repressive complex 2 subunits cause Weaver syndrome. *Hum Mutat*. 査読有, 38(6), 2017, 637-648.  
doi: 10.1002/humu.23200.
- ### [ 学会発表 ] ( 計 2 件 )
1. Watanabe H, Higashimoto K, Nagano Y, Kurokawa M, Uemura T, Soejima H, NSD1 haploinsufficiency evokes DNA hypomethylation at imprinted DMRs and the increased expression of imprinted genes, EURAPS Research Meeting, Madrid, 2018.
  2. Watanabe H, Higashimoto K, Miyake N, Maeda T, Hidaka H, Aoki S, Matsumoto N, Soejima H, NSD1 haploinsufficiency evokes DNA hypomethylation at imprinted DMRs and the

increased expression of imprinted genes, The 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Florida, 2017.

〔図書〕(計1件)

1. Higashimoto K, Joh K, Soejima H. Springer. Genomic Imprinting Syndromes and Cancer, DNA and Histone Methylation as Cancer Targets. Part DNA and Histone Methylation-Related Events Underlying Cancer, 2017, 297~344.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

佐賀大学医学部・分子生命科学講座・分子遺伝学・エピジェネティクス分野  
<http://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/mbg/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：吉浦 孝一郎

ローマ字氏名：(YOSHIURA, koichiro)

研究協力者氏名：木下 晃

ローマ字氏名：(KINOSHITA, akira)

研究協力者氏名：三嶋 博之

ローマ字氏名：(MISHIMA, hiroyuki)

研究協力者氏名：村田 祐造

ローマ字氏名：(MURATA, yuzo)

研究協力者氏名：八坂 敏一  
ローマ字氏名：(YASAKA, toshiharu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。