

令和元年5月16日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10004

研究課題名(和文) オキシトシン受容体遺伝子の脳領域特異的エンハンサー探索：自閉症関連SNPとの関係

研究課題名(英文) Brain region-specific enhancer activities for oxytocin receptor gene: the relationship with autism-associated SNPs

研究代表者

井上 由紀子 (Inoue U., Yukiko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第六部・科研費研究員

研究者番号：30611777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：オキシトシン受容体遺伝子のイントロン配列内に多数同定されている自閉スペクトラム症関連SNP(一塩基多型)は、社会性行動の個人差と相関することが報告されているが、蛋白質をコードしないイントロン配列の個人差が、オキシトシン受容体発現様式にどのような影響を与え、神経回路網を変化させ、表現型に至るのことは未知のままである。本研究ではマウス受精卵を用いたゲノム編集技術を駆使して、オキシトシン受容体の脳領域特異的発現を正確に可視化し、前述のイントロン配列が受容体発現制御(エンハンサー)活性を持つか否かを検証可能なマウスモデルを新たに複数作製した。これらは、今後のオキシトシン研究に広く活用できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オキシトシンは、オキシトシン受容体を持つ神経細胞の機能を修飾することにより、家族や夫婦の絆・仲間同士の信頼などの「社会性行動」を促進する。オキシトシン受容体遺伝子のイントロン(受容体蛋白質をコードする情報を持っていない部分)には、自閉スペクトラム症などの社会性行動の多様性と相関するような塩基配列のバリエーションが多数見出されているが、その役割はわかっていない。本研究では、マウス受精卵を用いた最新のゲノム編集法を駆使して、そのイントロン配列にオキシトシン受容体の発現調節機能があるかどうかを調べることのできるマウスモデルを作製した。今後のオキシトシン系神経回路の研究において有用なツールとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Autism-associated polymorphisms (SNPs) within the intronic sequences of oxytocin receptor (OXTR) gene have been continually reported to correlate with variations in social behaviors. However, how the intronic "non-coding" sequence variations can affect OXTR expression patterns, neuronal connections, and the behavioral phenotypes remains elusive. In this study, we employed the latest genome editing technology to generate novel knock-in reporter mouse lines by which we could precisely recapitulate the brain region-specific OXTR expression profiles. We also utilized these mouse models to investigate brain enhancer activities for OXTR expressions within the intronic sequences. These new tools could be widely shared in science community to investigate roles of oxytocin-oxytocin receptor system in social brains.

研究分野：神経発達障害、ゲノム編集、遺伝子改変モデルマウス

キーワード：オキシトシン受容体 自閉スペクトラム症 SNP ゲノム編集 CRISPR/Cas9

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

1. 研究開始当初の背景

オキシトシン (Oxt) は視床下部で合成されるペプチドホルモンであり、下垂体後葉から血中へ分泌され、子宮平滑筋収縮・乳汁分泌促進等の「末梢作用」を持つことが従来から知られている。Oxt はまた、神経伝達物質として脳内へも輸送・拡散され、オキシトシン受容体 (Oxtr) を発現する神経細胞の機能を修飾する「中枢作用」を持っている。近年、Oxt 系神経回路は、養育行動・他者への信頼・共感性など広く『社会性行動』と分類される行動を促進的に制御することが盛んに報告されており、Oxt 点鼻投与により自閉スペクトラム症 (ASD) の症状を改善できる可能性 (文献) から人々の注目を集めている。

Oxtr 遺伝子のイントロン配列内に多数同定されている ASD 関連 SNP (一塩基多型) は、ASD リスクとなりうること、社会性行動の多様性と相関することが頻りに報告されているが (文献)、蛋白質をコードしないイントロン配列の個人差が、Oxtr 発現様式にどのような影響を与え、神経回路網を変化させ、表現型に至るのかは未知のままである。

脳神経系発生発達の多様性は、このようなゲノムの個体差を基に、環境因子の影響が加わって生み出されると考えられる。そのメカニズムの理解には、ヒトでは計測できないゲノム改変による脳活動・行動様式の変化を検証可能なモデル動物を用いた解析が必須である。特に遺伝学の基盤が充実しているマウスに関しては、近年のゲノム編集技術の進展により、短期間で遺伝子改変個体を作製可能になり、研究が加速している。

他方で、Oxt 系神経回路の研究においては、Oxtr の細胞内局在・脳内分布を明らかにするために必要な「特異性の高い抗体」が得られていないことが問題であった。そのため、Oxtr 遺伝子座に蛍光タンパク質をロックインしたレポーターマウスや、各研究室で独自に作製された抗体が用いられてきたが、それぞれの方法により観察される発現様式が完全には一致しておらず、検証が不十分だった。また、Oxtr 遺伝子の時空間特異的発現様式を制御するエンハンサー探索を個体レベルで行った報告は皆無であり、まずこれらの解析ツール・手法を確立する必要があった。

2. 研究の目的

ゲノム操作技術を駆使して、社会性行動に関わる脳領域における Oxtr 遺伝子の発現制御モジュール (エンハンサー) を同定し、エンハンサー内の塩基配列の個人差による受容体発現パターン・発現量変化が ASD リスクや社会性行動の多様性を説明しうるのかを明らかにすることを旨とする。そのためにまず、マウス個体内で Oxtr 発現様式を正確にかつ容易に検出できるモデルマウスを作製し、エンハンサー解析に利用する。

3. 研究の方法

研究代表者はマウス受精卵を用いる遺伝子操作に 15 年以上携わっており、自身の手により遺伝子改変マウス作製を自在に行うことができる。この技術を基盤として以下の研究を行った。

(1) BAC (細菌人工染色体) を利用した「エンハンサー・トラップ法」

BAC ベクターは通常のプラスミドベクターに比べると格段に長いゲノム領域を保持することができる。目的の遺伝子を含む BAC に「最小プロモーター」と「レポーター遺伝子」を挿入し、その DNA を用いてトランスジェニックマウスを作製することにより、BAC に含まれる全てのエンハンサー活性をレポーター発現として捕える手法を『エンハンサー・トラップ法』という (文献)。本研究を開始当初、ヒトゲノム配列を有する BAC を用いて Oxtr 遺伝子座のエンハンサー・トラップを試みていた。しかしながら、Oxtr 遺伝子座は BAC によるエンハンサー解析を行うには小さすぎることもあり、効率の良いエンハンサー・トラップが実現できていなかった。

(2) CRISPR/Cas9 法によるレポーター・ロックインマウス作製とイントロン配列の欠損

本研究期間中に急速に進展した「マウス受精卵を用いる CRISPR/Cas9 ゲノム編集法」を研究代表者が習得し、ES 細胞を用いる従来法に比べてはるかに低コスト・高効率な遺伝子改変マウス作製を自身の手により行うことが可能になった。本研究でも、より今後の研究展開に有

用なモデルマウス作製をゲノム編集法にて進めることにした。具体的には、前述のような抗体や既存マウスモデルの不都合を改善するため、Oxtr の脳領域特異的発現様式を正確に再現できるレポーターマウスを新たに作出した。さらに、そのレポーターマウスの受精卵を用いて再度ゲノム編集を行い、ASD 関連 SNP が多数見出されているゲノム領域に対応するイントロン配列を欠損させ、レポーター発現がどのように変化するかを調べることにより、(1)に代わるエンハンサー活性検証法とした。

4 . 研究成果

(1) Oxtr の脳領域特異的発現様式を正確に再現できる新たなレポーターマウスの完成

ゲノム編集法によるノックインマウス作製の利点の一つは、遺伝子上流・下流・イントロン等に存在する転写制御配列を元の状態に保持したまま、レポーター遺伝子を「シームレスに」挿入できることである。Oxtr 遺伝子の終止コドンに T2A-tdTomato カセットで置き換えることにより、内在性の転写制御を完全に反映したレポーターマウスを作製した。T2A 配列は、リボソームによる翻訳をスキップさせる機構により、一つの mRNA から二つの蛋白質を翻訳することを可能にするため、Oxtr 発現細胞において tdTomato を発現させることができる。さらに、Oxtr 蛋白質の C 末端にペプチドタグ (PA タグ) を付加したため、高親和性抗体を用いて Oxtr の発現を直接的に観察することもできる。Oxtr-PA-T2A-tdTomato マウスの脳では、PA タグ発現と tdTomato 発現が一致し、このレポーターシステムの妥当性を確認することができた。その発現パターンは、Oxtr 発現部位として既に報告されていた脳領域と概ね一致したが、それに加えて、これまでは発現が弱いとされてきた脳部位 (側坐核等) における発現も時期によっては検出できており、既存のレポーターマウスに比べてより感度良く、内在性発現に忠実な解析ツールを確立できたと考えている。Oxtr ノックアウトマウスは乳汁分泌阻害により仔を養育できないが、このレポーターマウスのホモ雌個体は授乳が可能であることから、C 末端へ付加した PA タグは Oxtr の G 蛋白質共役受容体としての機能を阻害しないことも確認できた。また、EGFP と比べて 2.5 倍高い蛍光強度を持つ tdTomato は個体内イメージングに適しており、本レポーターマウスにおいても、tdTomato に対する免疫染色を行うことなく蛍光を観察できるため、今後のオキシトシン研究において応用範囲が広い有用ツールとして共有できると期待される。

さらに、T2A-tdTomato の代わりに T2A-iCre (コドン改良型 Cre 組換え酵素) をノックインしたドライバーマウスも作出した。特定の神経細胞を興奮 / 抑制させ神経活動を記録する方法として近年急速に進展する光遺伝学・化学遺伝学的手法・カルシウムイメージングは、哺乳類動物の行動における神経回路機能を理解する上で欠かせない技術であり、特定の神経回路を構成するニューロンを正確にターゲットする手段として Cre ドライバーマウスは必須であることから、このマウスも今後のオキシトシン研究において有用である。

ゲノム編集マウス作製技術に関する成果としては、Cas9ヌクレアーゼ蛋白質と人工合成ガイド RNA を用いる「クローニングフリー法」を採用し、ノックインドナーとして長鎖一本鎖 DNA を用いることにより、非常に高効率なノックインを実現した (主な論文発表 , 学会発表を参照)。

(2) ASD 関連 SNP が存在するゲノム領域に対応するイントロン配列を欠損したマウスの作製

(1)において作製した Oxtr-PA-T2A-tdTomato レポーターマウスの受精卵を用いたゲノム編集により、ASD 関連 SNP が多数存在するイントロン配列に相当するゲノム領域を欠損させたマウスを作製した。欠損させるイントロンは 11.5 kb とかなり長いため、修復ドナーとして長鎖一本鎖 DNA を受精卵エレクトロポレーションにより導入する方法を採用し、デザイン通りの欠損を行うことが出来た。現在、この欠損マウスの tdTomato レポーター発現を欠損前の個体と比較する作業を行なっている。今後はイントロン配列のみならず、遺伝子上流・下流の転写制御領域候補配列を欠損させた個体を同じ方法で作出することにより、当初は BAC トランスジェニックマウスを用いて行う予定であった網羅的なエンハンサー解析を実現させる。そのツールを準備できた点において、(1)のレポーターマウス開発は意義深い。

(3) ヒトのイントロン配列を持つマウスモデル作製の試み

前述の ASD 関連 SNP が見出されている Oxtr 遺伝子のイントロン配列をヒトとマウスで比較すると保存性がほとんど無いことから、ヒト特有の Oxtr 発現制御を担うプロモーター・エンハンサー活性をマウス個体内で再現した上で SNP の影響を調べるために、このイントロン配列、あるいは遺伝子座全体を「ヒト化」したマウスモデルが有用であると考えられる。現在、最新のゲノム編集法 (fusional PITCh) を用いて Oxtr 遺伝子座のヒト化を試みている。PITCh 法は、細胞内で CRISPR/Cas9 により切断された二本鎖 DNA が Microhomology-mediated end joining (MMEJ) と呼ばれる機構により修復されることを利用したものであり、一般的に遺伝子カセットノックインに用いられる Homology-directed repair (HDR) とは異なる手法である。fusional PITCh 法がマウス受精卵に適用可能であることを、既に SYNE1 遺伝子座についてのモニター実験により確認済みである。マウス Oxtr 遺伝子座を完全に欠損させたノックアウトマウスを既に作製済みで、この遺伝子座に対して fusional PITCh 法によるヒト OXTR 遺伝子座ノックインを現在試みている。

< 引用文献 >

Yamasue H. Promising evidence and remaining issues regarding the clinical application of oxytocin in autism spectrum disorders. *Psychiatry Clin Neurosci.* 70(2):89-99 (2016) doi: 10.1111/pcn.12364.

Aspé-Sánchez M, Moreno M, Rivera MI, Rossi A, Ewer J. Oxytocin and Vasopressin Receptor Gene Polymorphisms: Role in Social and Psychiatric Traits. *Front Neurosci.* 2016 Jan 28;9:510. doi: 10.3389/fnins.2015.00510.

Asami J, Inoue YU, Terakawa YW, Egusa SF, Inoue T. Bacterial artificial chromosomes as analytical basis for gene transcriptional machineries. *Transgenic Res.* 20(4):913-24 (2011) doi: 10.1007/s11248-010-9469-3.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

*Inoue YU, Morimoto Y, Hoshino M, Inoue T. Generation of Pax6-IRES-EGFP knock-in mouse via the cloning-free CRISPR/Cas9 system to reliably visualize neurodevelopmental dynamics. *Neurosci Res.* 132, 1-7 (2018) doi: 10.1016/j.neures.2018.01.007. 査読有り

Owa T, Taya S, Miyashita S, Yamashita M, Adachi T, Yamada K, Yokoyama M, Aida S, Nishioka T, Inoue YU, Goitsuka R, Nakamura T, Inoue T, Kaibuchi K, Hoshino M. Meis1 Coordinates Cerebellar Granule Cell Development by Regulating Pax6 Transcription, BMP Signaling and Atoh1 Degradation. *J Neurosci.* 38(5), 1277-1294 (2018) doi: 10.1523/JNEUROSCI.1545-17.2017. 査読有り

*Inoue YU, Inoue T. Brain enhancer activities at the gene-poor 5p14.1 autism-associated locus. *Sci Rep.* 31227 (2016) doi: 10.1038/srep31227. 査読有り

Egusa SF, Inoue YU, Asami J, Terakawa YW, Hoshino M, Inoue T. Classic cadherin expressions balance postnatal neuronal positioning and dendrite dynamics to elaborate the specific cytoarchitecture of the mouse cortical area. *Neurosci Res.* 105, 49-64 (2016) doi: 10.1016/j.neures.2015.09.006. 査読有り

Hashimoto R, Hori K, Owa T, Miyashita S, Dewa K, Masuyama N, Sakai K, Hayase Y, Seto Y, Inoue YU, Inoue T, Ichinohe N, Kawaguchi Y, Akiyama H, Koizumi S, Hoshino M. Origins of oligodendrocytes in the cerebellum, whose development is controlled by the transcription factor, Sox9. *Mech Dev.* 140,25-40 (2016) doi: 10.1016/j.mod.2016.02.004. 査読有り

〔学会発表〕（計 18 件）

井上-上野由紀子, 金子涼輔, 森本由起, 星野幹雄, 井上高良. 「個性」創発研究のための『ゲノム編集マウス』作出と解析. 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム (2018) 一橋大学 一橋講堂 学術総合センター

Inoue YU, Kaneko R, Morimoto Y, Inoue T. Visualization and humanization of oxytocin receptor expressions in mouse brains. 新学術領域「個性」創発脳 第1回国際シンポジウム Towards Understanding "INDIVIDUALITY" (2018) 京都大学芝蘭会館

Inoue YU, Kaneko R, Morimoto Y, Inoue T. Visualization of oxytocin receptor expressions in neonatal mouse brains via Easi-CRISPR. 第41回日本神経学会大会 (2018) 神戸コンベンションセンター

金子涼輔, 阿部学, 高鶴裕介, 井上(上野)由紀子, 渡辺雅彦, 崎村建司, 柳川右千夫, 八木健. Visualizing single-neuron identity specified by Pcdh-b cluster. 第41回日本神経学会大会 (2018) 神戸コンベンションセンター

井上(上野)由紀子, 金子涼輔, 森本由起, 井上高良. 多重化 tdTomato ノックインマウスによる低発現遺伝子の効率的な可視化. 日本ゲノム編集学会第3回大会 (2018) 広島国際会議場

Imamura M, Inoue YU, Inoue T, Takeda S. Generation and characterization of a WWP1 knock-in mouse model for chicken muscular dystrophy. 米国細胞生物学会 (2018) サンディエゴ

原裕子, 永田哲也, 井上-上野由紀子, 溝部吉高, 滝澤歩武, 井上高良, 武田伸一, 青木吉嗣. 核酸医薬のスクリーニングを可能にする EGFP-レポーターアッセイ系の構築. 日本筋学会第4回学術集会 (2018) 岡山県倉敷市

井上(上野)由紀子, 森本由起, 井上高良. Easi-CRISPR によるノックインマウスを用いたオキシトシン受容体発現の可視化. 第11回神経発生討論会 (2018) 金沢大学医学群

Inoue YU, Morimoto Y, Inoue T. Visualization and humanization of oxytocin receptor expressions in mice; towards the clinical application of oxytocin to autism spectrum disorders. 第9回武田科学振興財団薬科学シンポジウム Genome Editing Towards Medicinal Applications (2018) 武田薬品研修所

井上-上野由紀子, 佐藤大気, 河田雅圭, 金子涼輔, 森本由起, 浅見淳子, 星野幹雄, 井上高良. 「個性」創発研究のための『ゲノム編集マウス』作製と解析. 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム (2017) 一橋大学 一橋講堂 学術総合センター

笠原(仁田原)優子, 島津苑子, 増田千明, 積田奈々, 水本秀二, 井上(上野)由紀子, 井上高良, 吉沢隆浩, 高橋有希, 池上良, 中山淳, 武田伸一, 渡邊淳, 古庄知己, 岡田尚巳. CRISPR/Cas9 を用いた Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome-CHST14 ノックアウトマウスの作製と病態解析. 第40回日本分子生物学会年会 (2017) 神戸ポートアイランド

原裕子, 永田哲也, 井上-上野由紀子, 宮武正太, 滝澤歩武, 溝部吉高, 瀬戸美也子, 倉岡睦季, 井上高良, 武田伸一, 青木吉嗣. 核酸医薬の網羅的スクリーニングを可能にする EGFP-レポーターアッセイ系の開発. 第40回日本分子生物学会年会 (2017) 神戸ポートアイランド

Kikkawa T, Inoue YU, Inoue T, Noriko Osumi. Analyses of Cyclin D2 mRNA transportation mechanism in radial glial cells during corticogenesis using CRISPR/Cas9 genome editing system. 第40回日本分子生物学会年会 (2017) 神戸ポートアイランド

Kikkawa T, Inoue YU, Inoue T, Casingal CR, Noriko Osumi. Analyses of *Cyclin D2* mRNA transportation in the cortical development using CRISPR/Cas9 genome editing system. 第 60 回日本神経化学学会大会 (2017) 仙台国際センター

Imamura M, Inoue YU, Inoue T, Takeda S. Generation of mouse models for muscular dystrophic chicken by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. 米国細胞生物学会 (2017) フィラデルフィア

Inoue YU, Hoshino M, Inoue T. Generation of Pax6-IRES-EGFP knock-in mouse via cloning-free CRISPR/Cas9 system for neurodevelopmental researches. Society for Neuroscience 47th annual meeting (2017) Washington DC

井上-上野由紀子, 井上高良. クローニングフリーCRISPR/Cas システムによるノックインマウス作製. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016) パシフィコ横浜

井上-上野由紀子, 井上高良. クローニングフリーCRISPR/Cas システムによるノックインマウス作製. 日本ゲノム編集学会第 1 回大会 (2016) 広島国際会議場

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第六部 第二研究室 <https://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r6/index-lab2/index.html>

6. 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

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。