

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15201  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2018～2020  
 課題番号：18K06474  
 研究課題名(和文) 16p13微小重複関連、新規RNA結合蛋白Marf1による神経新生制御機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of neurogenesis mechanism by novel RNA binding protein Marf1, related with 16p13.11 duplication syndrome

研究代表者  
 藤谷 昌司 (Fujitani, Masashi)  
 島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：40376372  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：sMarf1の新規ターゲット候補分子を同定し、マウス・ヒト神経幹細胞の神経分化に関与する分子メカニズムを解明するために、RIP-Chip法を用いて新規ターゲット候補分子のmRNAの同定を試みた。sMarf1に結合するRNAをmicroarray(Chip)によって同定した。候補分子について、sMarf1の過剰発現によって、それらの分子が低下するかどうか検討したが発現低下はなかった。さらに、RNA-seq解析によって、複数の分子ターゲットを同定した。しかし、real time PCR法で確認したが、発現低下が認められなかったため、ターゲット分子の同定は極めて困難であると結論づけた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、sMarf1の結合RNAを探索する実験は、失敗に終わった。RNA結合タンパク質のターゲット分子を同定する方法として、最近の大規模な研究によっても、Marf1のターゲットは未だ同定に至っていない。(nature 2020 Van Nostrand et al) この大規模な研究では、5つの大きな実験をおこなっているが、その中の可能な限りの2つの実験を行ったが、同定することはできなかった。また、16p13.11iPS細胞から分化させた神経細胞の神経分化能を評価したが、大きな変化はなかった。今後は、神経分化能のみならず、神経細胞の形態に着目した研究を行っていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)： In order to identify new target molecules of sMarf1 and to elucidate the molecular mechanisms involved in the neural differentiation of mouse and human neural stem cells, we attempted to identify mRNA of new target molecules using the RIP-Chip method. The RNAs that bind to sMarf1 were identified by microarray. Subsequently, we examined whether the overexpression of sMarf1 decreased the expression of the candidate molecules. However, there was no decrease in their expression. In addition, we identified several molecular targets by RNA-seq analysis, but since no decrease in expression was observed by real time PCR, we concluded that the identification of target molecules was extremely difficult.

We also generated human disease-specific iPS cells of 16p13.11 microduplication and analyze their neural differentiation potential. We evaluated the neural differentiation ability of the cells, but found no change.

研究分野：神経科学

キーワード：神経新生 sMarf1 16p13.11 iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### a) 16p13.11 微小重複症

遺伝子のコピー数重複は、染色体全ての変異(例:21トリソミー)が有名であるが、もっと小さな数キロベースの小さな変異まで多岐にわたる。微小重複と呼ばれる1-3メガベース程度の小さな遺伝子の重複が疾病の発症を引き起こす遺伝子変異として確立され、多くが重複内の原因遺伝子の過剰がその原因と考えられている。

16p13.11 微小重複は Ullmann らにより 2007 年に初めて記載され、当初は、自閉スペクトラム症との関連が報告されたのみであったが、引き続いて知的能力障害との関連、注意欠如多動症との関連や、統合失調症との関連が証明された。これらにより、同じ 16p13.11 という微小重複が原因となり、それぞれの患児の脳発達に異常を来し、様々な精神疾患を発症することが示された。

### b) RNA 結合タンパク質 Marf1

Marf1 は、研究協力者の Su らによって発見された RNA 結合タンパク質で、卵子型のアイソフォームはターゲット RNA を分解し、卵母細胞から卵子への分化に必須である。我々は、その体細胞型のアイソフォームである sMarf1 について研究を行い、神経幹細胞からの神経分化を制御する分子として報告した。(Fujitani M. Mol Psy 2017, Kanemitsu Y. Sci Rep 2017)。しかし、未だに詳細なメカニズムについては不明である。

### c) 16p13.11 微小重複症モデル動物

申請者らは合計 3 つの研究を行い (Zhang S. Sci Rep 2014, Fujitani M. Mol Psy 2017, Kanemitsu Y. Sci Rep 2017) 神経細胞の分化に関わる分子を新たに 2 つ同定した。

また、申請者は 16p13.11 微小重複症モデル動物を作製した。(Fujitani M. Mol Psy 2017) このモデル動物は、sMARF1, MIR-484, NDE1 という 3 つのヒト遺伝子のゲノムを含む領域を、マウスゲノム内に挿入し、3 つの遺伝子に絞り込んで重複を作製したものである。このモデル動物は、社会性の異常と共に、多動を示し、胎児期に放射状グリア(神経幹細胞)からの神経分化の異常を来した (Fujitani M. Mol Psy 2017)。しかし、最終的に、miR-484 か sMarf1 のどちらが候補遺伝子かを明確に決定することはできなかったため、sMarf1 に着目して研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、『sMarf1 が神経分化を制御する仕組みをマウス・ヒト神経幹細胞内で解明』し、『16p13.11 微小重複の疾患特異的 iPS 細胞の神経分化に関する表現型が sMarf1 の重複によることを証明』する事である。

16p13.11 微小重複症の研究において、核心をなす学術的に最も大きな問いは、『16p13.11 微小重複による神経発達症の原因遺伝子は何にか』である。

本研究では、この問いを段階的に解明することを想起した。まず、sMarf1 が神経幹細胞の神経分化を制御する仕組みについて、マウス、ヒト神経幹細胞の両方において解明する。そして、16p13.11 微小重複の疾患特異的 iPS 細胞の神経分化に関する表現型が sMarf1 の重複によることを証明し、原因遺伝子にせまる。

## 3. 研究の方法

① sMarf1 の新規ターゲット候補分子を同定し、マウス・ヒト神経幹細胞の神経分化に関与する分子メカニズムを解明する。

A) RIP-Chip 法を用いて sMarf1 の新規ターゲット候補分子の mRNA 結合部位を同定する。

RIP(RNA 免疫沈降法)を行い、sMarf1 に結合する RNA を microarray(Chip)によって同定する。具体的には、N 末端側の RNase 活性を欠失させ変異型 sMarf1 ( $\Delta$ NsMarf1)を作製し、それを、C17.2 マウス多能性神経幹細胞様細胞に過剰発現し、ターゲットとなる RNA を RIP 法により回収。microarray によって、コントロールと比較する。

B) 候補分子についてターゲット RNA であることを証明する。

次に、実際、Marf1 が存在しないと、ターゲット RNA が安定化するのか、Marf1 を CRISPR/Cas9 発現ベクターによりノックアウトした C17.2 細胞を用いて、ターゲット RNA を定量評価する。更に、Marf1 を過剰発現すると、神経細胞への分化が促進される(Kanemitsu Y. Sci Rep 2017)

ことが、マウスの脳内で確認されている。Marf1 が過剰にある状態で、Magoh などのターゲット分子によるレスキューが可能か *in vivo* で検討する。

C) ヒト iPS 細胞から分化させた神経幹細胞で sMarf1 の機能を解析する。

最近では、ヒト iPS 細胞からの誘導は様々な問題点が克服されつつある。連携研究者の赤松らによって確立された方法であるヒト ES/iPS 細胞からの前脳特異的な分化誘導方法 (Imaizumi 2015 Stem cell Rep)等を用いて、前脳の Pax6 陽性放射状グリアへ分化誘導を行う。sMarf1 発現ベクターで sMarf1 を過剰に発現させる。免疫染色法により、神経細胞のマーカー Tuj1 等を用いて、神経細胞への分化を解析する。

② 16p13.11 微小重複症のヒト疾患特異的 iPS 細胞を作製その神経分化能を解析する。

A) 研究分担者と共に、16p13.11微小重複症患者の疾患特異的iPS細胞を作製する。

16p13.11微小重複症患者家系は、愛知県心身障害者コロニー中央病院の共同研究者によって外来フォローを受けている。全ての施設において倫理委員会で承認を受け、同意書をえた後に、採血後、血液を輸送し、iPS細胞作製は、CiRAの斎藤准教授に依頼して作製する。

B) 16p13.11微小重複症由来iPS細胞の神経分化異常を同定する。

これまで、我々は、16p13.11微小重複症モデルマウスにおける神経分化異常を証明した (Fujitani M Mol Psy 2017)。従って、16p13.11微小重複症由来iPS細胞(16dup-iPS細胞)においても、神経細胞への分化が亢進すると予想される。①の誘導法を用いて免疫染色法で確認する。

③ 16dup-iPS細胞の神経分化異常をMarf1のノックダウンにより、その異常が消失するか検討する。

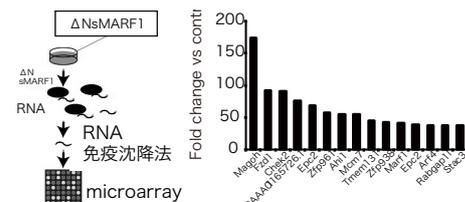
最後に、Marf1 の過剰が 16dup-iPS 細胞の分化異常の原因となる可能性が高い。こちらも、Marf1 遺伝子を shRNA ベクター、CRISPR/Cas9 ベクター等によりノックダウンすることで、16dup-iPS 細胞由来の神経幹細胞の上記の分化異常をレスキューできれば、Marf1 が、16p13.11 微小重複症の神経発達症原因遺伝子である可能性が高まる。

#### 4. 研究成果

① sMarf1 の新規ターゲット候補分子を同定し、マウス・ヒト神経幹細胞の神経分化に関与する分子メカニズムを解明する。

A) RIP-Chip 法を用いて sMarf1 の新規ターゲット候補分子の mRNA 結合部位を同定する。

RIP(RNA 免疫沈降法)を行い、sMarf1 に結合する RNA を microarray(Chip)によって同定した。具体的には、N 末端側の RNase 活性を欠失させ変異型 sMarf1 ( $\Delta$ NsMarf1)を作製し、それを、C17.2 マウス多能性神経幹細胞様細胞に過剰発現し、ターゲットとなる RNA を RIP 法により回収。microarray によって、コントロールと比較した。(右図)に示すように、この中で、最も結合度の高い Magoh 遺伝子は、脳発生に極めて重要な遺伝子で、染色体分配、神経幹細胞の増殖を Lis1 遺伝子の上流として制御することが知られている(Sliver DL. Nat Neuro 2010)。



研究結果：  $\Delta$ NsMARF1 を用いて行った RIP-Chip 法によって sMARF1 と結合する mRNA 候補分子がマイクロアレイによって同定された。

B) 候補分子についてターゲット RNA であることを証明する。

候補分子 について、sMarf1 の過剰発現によって、Magoh,Fzd1 などの分子の mRNA の安定性や発現が低下するかどうか検討したが、結果的に、変化は認められなかった。

④ バックアッププランとして計画していた胎生 15 日齢のマウス大脳皮質より培養した皮質神経細胞に sMarf1 を過剰発現することで、ターゲットとなる分子の同定を試みた。具体的には、oMarf1 の変異型の報告(Yao QQ. PNAS 2018)では、D272A 変異により、RNase 活性が消失する。そこで、この変異の部位に相当する部位に変異をおいて、変異型の sMarf1(D272A)を作製し、sMarf1(野生型)による過剰発現によってコントロールに比して、低下が認められ、RNase 活性のない変異型(D272A)によって低下が認められない分子を探すことにした。

胎生 15 日齢のマウスの皮質神経細胞にそれぞれ過剰発現させたサンプルを RNA-seq 解析 (SAGE 法) によって、網羅的に解析した。

つぎに、再現性があるか確認するために、real time PCR 法で確認したが、発現低下が認められなかったため、ターゲット分子の同定は極めて困難であると結論づけた。

② 16p13.11 微小重複症のヒト疾患特異的 iPS 細胞を作製その神経分化能を解析する。

A) 研究分担者と共に、16p13.11 微小重複症患者の疾患特異的 iPS 細胞を作製する...

16p13.11 微小重複症患者母娘は、愛知県心身障害者コロニー中央病院の水野誠司医師によって外来フォローを受けていた。全ての施設において倫理委員会で承認を受けた後に、両者から採血後、CiRA の斎藤准教授に依頼して iPS 細胞を作製した。神経細胞への分化は、赤松研によって確立された方法を用いた (Matsumoto T 2016 *Stem Cell Rep*)。家系の 3 人の三胚葉分化能に変化はなく、神経細胞への分化能にも大きな異常が認められなかった。

また、同時に、15q11-13 微小重複症の自閉スペクトラム症の患者からヒト疾患特異的 iPS 細胞を作製した。15q11-13 についての神経細胞の形態を評価したところ、軸索初節の変化が確認された。また、島根大学に異動したためにあらたな研究テーマとして、脳幹内の神経回路研究をおこない、痛みによって賦活化される経路や、オレキシンニューロンを介した新たな神経回路について論文発表を行った (下図)。

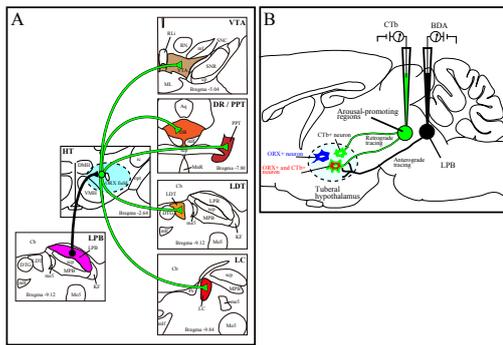
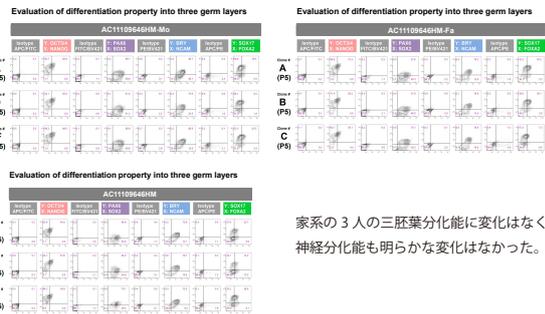
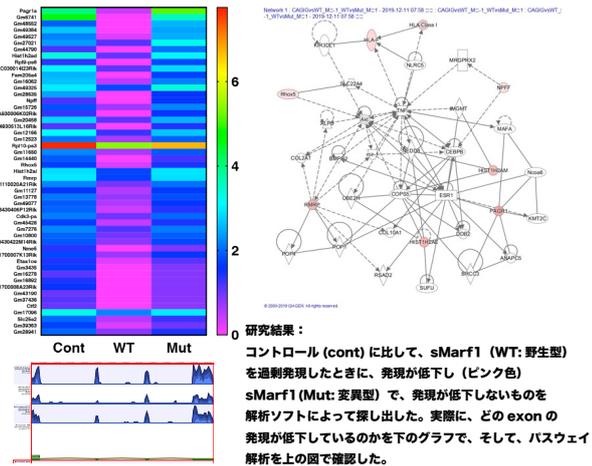
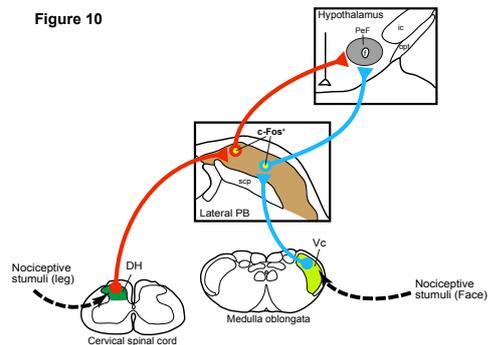


Figure 10



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Abe Yuichi, Honsho Masanori, Kawaguchi Ryoko, Matsuzaki Takashi, Ichiki Yayoi, Fujitani Masashi, Fujiwara Kazushirou, Hirokane Masaaki, Oku Masahide, Sakai Yasuyoshi, Yamashita Toshihide, Fujiki Yukio	4. 巻 295
2. 論文標題 A peroxisome deficiency?induced reductive cytosol state up-regulates the brain-derived neurotrophic factor pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 5321 ~ 5334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011989	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 藤谷昌司	4. 巻 82
2. 論文標題 解剖献体を用いたCST(Cadaver Surgical Training)について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 西日本泌尿器科学会誌	6. 最初と最後の頁 20-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Hirohiko Asano, Yosuke Arima, Shigefumi Yokota, Masashi Fujitani	4. 巻 512
2. 論文標題 New nociceptive circuits to the hypothalamic perifornical area from the spinal cord and spinal trigeminal nucleus via the parabrachial nucleus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 705-711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.153	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 Yosuke Arima, Shigefumi Yokota, Masashi Fujitani	4. 巻 9
2. 論文標題 Lateral parabrachial neurons innervate orexin neurons projecting to brainstem arousal areas in the rat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39063-y	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤谷昌司、有馬陽介、大谷嘉典、水上洋一
2. 発表標題 16p13.11 微小重複症の原因遺伝子解明を目指して
3. 学会等名 第10回自閉症学研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤谷昌司、有馬陽介
2. 発表標題 16p13.11微小重複による 神経新生亢進の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第74回日本解剖学会中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中由芽、片瀬創平、大谷嘉典、内匠透、藤谷昌司
2. 発表標題 染色体15q11-13微小重複症ASDモデルマウスにおけるAISの長さの解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 宮嶋久雄、糸数隆秀、田辺章悟、藤谷昌司、山下俊英
2. 発表標題 脊髄損傷後の組織修復機構におけるIL-17Aと上衣細胞の役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 藤谷昌司、大谷嘉典、山中由芽、赤松和土
2. 発表標題 微小重複症モデル動物・細胞における神経生物学的解析
3. 学会等名 医療療育総合センター セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Arima Y, Otani Y, Fujitani M Pain,	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 675
3. 書名 Anesthetics and Analgesics , Book 3 The Neurobiology, Physiology, and Behavior of Pain	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	水野 誠司  (Mizuno Seiji)  (20393150)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・遺伝子医療研究部・非常勤研究員    (83902)	
研究分担者	斎藤 潤  (Saito Megumu)  (90535486)	京都大学・iPS細胞研究所・准教授    (14301)	

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
---------	---------