

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03544

研究課題名(和文) X染色体不活性化がMICPCH症候群の脳機能障害を起こす神経回路メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the neural circuitry mechanism causing brain dysfunction in MICPCH syndrome due to X chromosome inactivation.

研究代表者

田淵 克彦 (Tabuchi, Katsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20546767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：MICPCH症候群は、小脳の低形成を特徴とする神経発達障害で、X染色体上の遺伝子CASKのヘテロ異常によって起こることが知られている。本研究では、X染色体不活性化が小脳低形成にどのような関わっているかについて、マウスモデルを用いて研究を行った。X染色体にEGFP発現カセットを有するHprt-eGFPとCASKノックアウトのトランスヘテロマウスを用いた研究および小脳顆粒細胞培養を用いた研究により、MICPCH症候群では、小脳顆粒細胞がCASK欠損により細胞自律的にアポトーシスを起こしており、これにはCASKとLiprin-a2との結合の異常が関わっていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MICPCH症候群は、日本ではCASK異常症として小児慢性特定疾患に指定されており、重篤な神経発生異常にもかかわらず、治療法が存在しない。特に、小脳低形成は進行性で、徐々に小脳が萎縮していくものであり、これを食い止める手段を発見することは急務であるが、現在の所、病態形成メカニズムが不明であるため困難な状況である。本研究で、CASKの異常による小脳顆粒細胞のアポトーシスと、Liprin-a2を介した分子メカニズムが病態形成に関与していることが発見された。このことは、これらの分子を標的とした治療法が開発できる可能性が見えてきたことを意味しており、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：MICPCH syndrome is a neurodevelopmental disorder characterized by cerebellar hypoplasia. It is known to be caused by heterozygosity of the CASK gene on the X chromosome. In this study, we investigated how X chromosome inactivation is involved in cerebellar hypoplasia using mouse models. By crossing CASK knockout mice with Hprt-eGFP mice, in which the EGFP expression cassette is on the X chromosome, we differentiated between CASK positive and negative neurons in the CASK heterozygote knockout brains. We also conducted cerebellar granule cell culture experiments to investigate the molecular mechanism involved in cerebellar hypoplasia. Through these experiments, we found that CASK deficiency caused apoptosis in cerebellar granule cells in a cell-autonomous manner. Additionally, we discovered that the disruption of CASK and Liprin-a2 binding caused by mutations within the CaMK domain of CASK is involved in the molecular mechanism underlying cerebellar hypoplasia in MICPCH syndrome.

研究分野：神経生理学

キーワード：CASK MICPCH症候群 X染色体不活性化 小脳低形成 小脳顆粒細胞

## 1. 研究開始当初の背景

MICPCH (Microcephaly with Pontine and Cerebellar Hypoplasia) 症候群は、小脳、橋の低形成を特徴とする X 連鎖性神経発達障害で、特徴的な顔貌に加え、知的障害、点頭てんかんなどを合併することが知られている。これまでに見つかった患者のほとんどは女性である。2008年に MICPCH 症候群の原因遺伝子として CASK が同定された (Najim et al. Nat Genet. 2008)。本症候群においては、CASK が唯一の原因遺伝子であり、CASK の機能不全が本症候群の症状を引き起こす原因となっていると考えられる。CASK 遺伝子は X 染色体上に存在し、MAGUK ファミリーに属するシナプス足場タンパク質をコードしている。我々のグループでは CASK のノックアウトマウスを用いて CASK の機能欠損が中枢神経系のシナプス機能に及ぼす影響について研究してきた。CASK ノックアウトマウスは、オスでは全個体が生直後に死亡する。MICPCH 症候群の患者がほとんど女性なのは、男性で CASK 遺伝子に機能欠損があった場合、胎生致死になるためだと思われる。メスのヘテロノックアウトマウスは、MICPCH 症候群の遺伝的バックグラウンドを再現したモデルになると考えられる。メスの X 染色体は、胚発生期のすべての細胞で 2 本あるうちの 하나가ランダムに X 染色体不活性化を受け、そのパターンは固定されたまま、そこから生み出される細胞へ受け継がれていくことが知られている。我々のグループでは、メスのヘテロノックアウトマウスの急性脳切片を作成し、ガラス電極で単一ニューロンから mRNA を吸引し、RT-PCR によって CASK の発現の有無を調べたところ (single-cell RT-PCR)、CASK ヘテロノックアウトマウスの脳では、CASK を発現する細胞と発現していない細胞が、約 50% ずつ、ランダムなモザイク状に分布していることを確認した。Patch clamp 法を用いて、これらのニューロンの電気生理学的特性を解析したところ、CASK 欠損ニューロンでは、興奮性のシナプス入力が増加し、抑制性のシナプス入力が低下していた。また、CASK はグアニレートキナーゼドメインを介して、転写因子である TBR1 に結合し、核へ移行して下流遺伝子の発現を制御しており、このメカニズムの破綻により興奮性・抑制性シナプス機能のバランス異常が起きていることも見出した (Mori et al., Molecular Psychiatry 2019)。これらの研究成果は、CASK 欠損によって起こるシナプス異常のメカニズムの解明につながるものであるが、MICPCH 症候群の病態メカニズムを解明するためには、まだまだ研究しなければならない問題が残されている。特に、小脳低形成は MICPCH 症候群の中で最も重篤な症状であるが、このメカニズムについては殆ど研究されていない。CASK メスヘテロノックアウトマウスでは、X 染色体不活性化により、CASK 発現細胞と CASK 欠損細胞が、成獣の体内でモザイク状に分布することになるが、CASK 欠損細胞がモザイク状に分布する中で引き起こされる小脳低形成は、CASK 欠損ニューロンのみで起こる細胞自律的 (cell autonomous) なものなのか？それとも周辺の正常ニューロンも巻き込んだ細胞非自律的 (non-cell autonomous) なものなのか？さらに、この小脳低形成は、どのような分子メカニズムによって引き起こされるかも不明である。

## 2. 研究の目的

本研究はこれらの問いに答えるため、CASK メスヘテロノックアウトマウスを用いて、X 染色体不活性化によるモザイク状の CASK 欠損が、脳全体に及ぼす影響について解析するとともに、小脳の低形成が起こるメカニズムについて研究することを目的とする。このために、X 染色体不活性化細胞をモニターできるマウス (Hprt-eGFP マウス) を CASK のヘテロノックアウトマウスと交配し、CASK 発現細胞と欠損細胞を識別する手法を取り入れる。小脳低形成のメカニズムを解明するために、小脳顆粒細胞培養系を用いて、CASK 欠損が顆粒細胞の生存にどのような影響を与えるのか、また、レスキュー実験を行うことで、どのような分子メカニズムによって小脳顆粒細胞死が起こるのかについて、重点的に研究を行う。

## 3. 研究の方法

(1) X 染色体不活性化を可視化するために、X 染色体上にある hprt 遺伝子座に eGFP 発現カセットを挿入した Hprt-eGFP マウスと CASK ノックアウトマウスを交配し、Hprt-eGFP と CASK KO がそれぞれ二つの X 染色体の一方ずつを分け合うトランスヘテロ接合マウスを作成した。このマウスでは、eGFP を発現する細胞は Hprt-eGFP 遺伝子座を有する X 染色体が機能する、すなわち CASK は正常に発現している。一方 eGFP の発現が見られない細胞は、CASK がノックアウトされた X 染色体が機能している、CASK 欠損細胞ということになる。発生段階ごとにこのマウスを灌流固定し、脳を摘出して組織切片を作成し、EGFP シグナルの分布を確認した。大脳皮質や皮質下領域を含め、EGFP の分布に偏りがあるか解析した。これらの領域は、CASK ヘテロ KO マウスでは目立った形態異常が見られないことから、これら領域で EGFP 陽性ニューロンの分布に偏りがあれば、これは X 染色体不活性化の skewness によるものだと判定できる。小脳に着目し、EGFP の発現様式と形態異常との関係について解析を行った。EGFP 陽性ニューロンの分布が偏っていた場合、これが発生段階によってどのように変化するのかについて解析を行った。小脳において、発生の初期段階から EGFP 陽性ニューロンしか見られなかった場合、CASK 欠損が、小脳の発生そのものに影響を与えていると判定する。幼若期に EGFP 陽性ニューロンと陰性ニューロンの両方

が存在していた場合、マウスの成熟に伴って EGFP 陽性ニューロンの割合が増えていけば、CASK 欠損ニューロンが選択的に死滅していることが示唆される。マウスが成熟しても、EGFP 陽性ニューロンと陰性ニューロンの比率に有意差が無ければ、小脳低形成は、CASK 欠損ニューロンと CASK 陽性ニューロンの両方が死滅している (CASK 欠損が細胞非自律的に CASK 陽性ニューロンの生存にも影響を与えている) と判定できる。これら形態学的解析に加え、ローターロード試験を行い、CASK ヘテロノックアウトマウスと野生型マウスで、小脳機能を介した運動機能異常について比較した。

(2) CASK 欠損による小脳低形成の分子メカニズムを解明する目的で、小脳顆粒細胞の培養実験を行った。生後 5 日目の CASK flox マウスと野生型コントロールマウスから小脳を摘出し、分散培養を作成した。CASK KO 小脳顆粒細胞を作成するため、培養 1 日目に、レンチウィルスを用いて Cre 組換え酵素を導入した。また、レスキュー実験のために、全長または変異を有する CASK コンストラクトを含むレンチウィルスの導入も行った。小脳顆粒細胞死がレスキューできなかった変異について、PyMoL および AlphaFold2.2 を用いて、これらの変異の構造機能相関について解析を行った。

(3) 本研究でメインで用いている CASK flox マウスが、loxP の挿入部位の問題で hypomorph になっていることから、新規の CASK flox マウスの作成を行った。CRISPR/Cas9 システムにより、受精卵に対して 2 世代かけて CASK の第 2 エクソンの両側にあるイントロンに、loxP の挿入を行った。

#### 4. 研究成果

(1) CASK KO; Hprt-eGFP トランスヘテロマウスの灌流固定脳切片では、大脳皮質や皮質下において、EGFP 陽性ニューロンと非陽性ニューロンは、全体にまばらに散らばっており、X 染色体不活性化による skewness は軽度にとどまり、CASK ヘテロ KO マウスでは、CASK 陽性ニューロンと CASK 欠損ニューロンは概ねモザイク状に分布していることが確認できた。このマウスの小脳の組織切片を観察すると、ブルキンエ細胞は生後 6 日目頃から既に CASK 欠損細胞の数がほとんど見られなくなり、一方、顆粒細胞は、生後 6 日目は CASK 欠損細胞も CASK 正常細胞とほぼ同じ割合でみとめられ、その後マウスが成熟するに伴って徐々に数が減少し、生後 35 日ごろまでには CASK 欠損細胞はほとんど見られなくなっていた。CASK 正常細胞の減少は特段見られなかったため、CASK 欠損が、細胞自律的な影響により小脳で細胞死を起こしていることが示唆された。また、ローターロード試験により、CASK ヘテロ KO マウスは、トレーニング開始 3 日目で、野生型マウスに比べてローターロードからの転落までの時間が優位に低下している結果が得られた。

(2) 本研究で用いている CASK モデルマウスは、もともと CASK 遺伝子の 5'UTR と第一イントロンに loxP が挿入されており、CASK flox マウスとして作成されている。このマウスでは、5'UTR に挿入されている loxP が、CASK の正常な発現を妨げているため、CASK flox マウスは hypomorph になっており、野生型マウスと比べて成長が遅く、体重も小さい傾向にある。しかし、CASK flox マウスから小脳を摘出し分散培養を行うと、顆粒細胞は正常に生存維持できた。レンチウィルスを用いて CASK flox ホモの小脳顆粒細胞培養に Cre 組換え酵素を導入し CASK ノックアウトにすると、時間経過とともに顆粒細胞が死滅することを確認した。TUNEL 染色により、顆粒細胞の死滅は、アポトーシスによるものだと判明した。CASK と結合するシナプス接着因子である Neurexin の triple KO マウスでは、小脳顆粒細胞からの BDNF の放出不全により小脳顆粒細胞死が起きており、これら培養細胞に BDNF を添加すると、小脳顆粒細胞死が改善される (Uemura et al., Cell Rep 2002)。CASK 欠損小脳顆粒細胞培養にも BDNF を添加したが、Neurexin triple KO とことなり、小脳顆粒細胞死はレスキューできなかった。CASK 欠損顆粒細胞培養に、レンチウィルスを用いて CASK の各ドメインを欠損したコンストラクトを導入すると、CASK 全長、L27 欠損、グアニレートキナーゼドメイン欠損コンストラクトでは小脳顆粒細胞死がレスキューできたのに対して、CaMK、PDZ、SH3 ドメインを欠損したコンストラクトではこれがレスキューできなかった。ヒト患者から見つかった CASK のミスセンス変異を有するコンストラクト (以下の 14 種類: CaMK ドメイン内 (R28L、D58E、R106P、G197R、L209P、R255C、Y268H)、PDZ ドメイン内 (R489W、M507I、M519T、R521V)、SH3 ドメイン内 (P625L、G637D、G659D)) を導入し、顆粒細胞死がレスキューできる変異とレスキューできない変異に分類した。レスキューできない変異のうち、4 種類 (R106P、L209P、R255C、Y268H) は CASK の CaMK ドメイン内の変異であった。PyMoL ソフトウェアを用いてこれらの変異を CASK の CaMK ドメインの 3 次元構造上にマッピングしたところ、このうち L209P は CaMK ドメインの内部に埋まっており、残りの 3 つ (R106P、R255C、Y268H) は Liprin-a2 との結合面に位置していることが判明した。Deep Mind 社が開発した AlphaFold 2.2 を用いて、機械学習によりこれらの変異の影響を調べたところ、L209P は CASK タンパク質の folding に影響を与えており CASK の発現そのものを阻害しているのに対し、R106P、R255C、Y268H は、Liprin-a2 との結合を特異的に阻害していることが判明した。さらに、免疫沈降実験を行い、これらの変異が CASK と Liprin-a2 との結合を阻害していることも確認した。これらのことから、MICPCH 症候群における小脳低形成には、CASK と Liprin-a2 との結合異常が

関与しているとの結論に達した。

(3) MICPCH 症候群のモデルマウスである CASK flox マウスは、loxP の配列の一つが、CASK の 5' -UTR 内に存在し、これが正常な CASK の発現を妨げ、CASK flox のホモ接合体では、hypomorph となり、野生型マウスと比較して成長が悪く、交配の効率もよくない。このため、新たな CASK flox マウスの作成を行った。loxP を CASK の第 2 コーディングエクソンを挟む形で挿入する設計にし、CRISPR/Cas9 システムによる受精卵での loxP のノックインを 2 世代で行うことで作成した。作成後、マウスの尾からゲノム DNA を抽出し、loxP を挟む形で PCR をかけ、PCR 産物を sequence することで、loxP が正しく挿入されていることを確認した。新しく作成した CASK flox マウスは、ホモ接合体でも野生型と同程度の成長を示し、loxP の挿入による CASK 遺伝子の発現不全は見られなかった。生後 20 日目の新規作成 CASK flox ホモマウスの内側前頭前皮質に Cre 組換え酵素発現アデノ随伴ウイルス (AAV) を導入し、行動実験を開始した。同時に、DeepLabCut と SimBA を使い、自動で social interaction などの社会行動を detect できるシステムの構築も行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kurihara Taiga, Kouyama-Suzuki Emi, Satoga Michiru, Li Xue, Badawi Moataz, Thiha, Baig Deeba Noreen, Yanagawa Toru, Uemura Takeshi, Mori Takuma, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 524
2. 論文標題 DNA repair protein RAD51 enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in brain neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 621 ~ 628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.132	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 該当する
1. 著者名 Cao Xueshan, Kouyama-Suzuki Emi, Pang Bo, Kurihara Taiga, Mori Takuma, Yanagawa Toru, Shirai Yoshinori, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 533
2. 論文標題 Inhibition of DNA ligase IV enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in mouse brain neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 449 ~ 457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.053	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 Yoshida Tomoyuki, 他20名, Tabuchi Katsuhiko, 他3名, Fukai Shuya	4. 巻 12
2. 論文標題 Canonical versus non-canonical transsynaptic signaling of neuroligin 3 tunes development of sociality in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22059-6	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 該当する
1. 著者名 Suzuki Tatsuo, Terada Nobuo, Higashiyama Shigeki, Kametani Kiyokazu, Shirai Yoshinori, Honda Mamoru, Kai Tsutomu, Li Weidong, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Non-microtubule tubulin-based backbone and subordinate components of postsynaptic density lattices	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000945	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 該当する

1. 著者名 Lai Esther Suk King, Nakayama Hisako, Miyazaki Taisuke, Nakazawa Takanobu, Tabuchi Katsuhiko, Hashimoto Kouichi, Watanabe Masahiko, Kano Masanobu	4. 巻 15
2. 論文標題 An Autism-Associated Neuroligin-3 Mutation Affects Developmental Synapse Elimination in the Cerebellum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 676891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2021.676891	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 -

1. 著者名 Kim Seungjoon, Park Dongseok, Kim Jinhu, Kim Dongwook, Kim Hyeonho, Mori Takuma, Jung Hyeji, Lee Dongsu, Hong Sookyung, Jeon Jongcheol, Tabuchi Katsuhiko, Cheong Eunji, Kim Jaehoon, Um Ji Won, Ko Jaewon	4. 巻 36
2. 論文標題 Npas4 regulates IQSEC3 expression in hippocampal somatostatin interneurons to mediate anxiety-like behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109417 ~ 109417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109417	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 該当する

1. 著者名 Badawi Moataz, Mori Takuma, Kurihara Taiga, Yoshizawa Takahiro, Nohara Katsuhiko, Kouyama-Suzuki Emi, Yanagawa Toru, Shirai Yoshinori, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Risperidone Mitigates Enhanced Excitatory Neuronal Function and Repetitive Behavior Caused by an ASD-Associated Mutation of SIK1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 706494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2021.706494	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 -

1. 著者名 Mehta Anuradha, Shirai Yoshinori, Kouyama-Suzuki Emi, Zhou Mengyun, Yoshizawa Takahiro, Yanagawa Toru, Mori Takuma, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 10
2. 論文標題 IQSEC2 Deficiency Results in Abnormal Social Behaviors Relevant to Autism by Affecting Functions of Neural Circuits in the Medial Prefrontal Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2724 ~ 2724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10102724	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 -

1. 著者名 Kim Dongwook, Jung Hyeji, Shirai Yoshinori, 他20名, Tabuchi Katsuhiko, Um Ji Won	4. 巻 91
2. 論文標題 IQSEC3 Deletion Impairs Fear Memory Through Upregulation of Ribosomal S6K1 Signaling in the Hippocampus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 821 ~ 831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopsych.2021.12.016	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 該当する

1. 著者名 Uemura Takeshi, Suzuki-Kouyama Emi, Kawase Shiori, Kurihara Taiga, Yasumura Misato, Yoshida Tomoyuki, Fukai Shuya, Yamazaki Maya, Fei Peng, Abe Manabu, Watanabe Masahiko, Sakimura Kenji, Mishina Masayoshi, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Neurexins play a crucial role in cerebellar granule cell survival by organizing autocrine machinery for neurotrophins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110624 ~ 110624
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110624	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

信州大学医学部分子細胞生理学教室 <a href="http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2seiri/ja/index.html">http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2seiri/ja/index.html</a>
---

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	森 琢磨 (Mori Takuma) (70545798)	信州大学・学術研究院医学系・助教  (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	付 ゆう  (Fu Yu)  (30830301)	信州大学・学術研究院医学系・助教    (13601)	削除：2019年11月28日

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