

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08183

研究課題名（和文）知的障害を呈するSotos症候群モデルマウスの樹立とその発症機構の解明

研究課題名（英文）Establishment of Sotos syndrome model mice with intellectual disability and elucidation of the onset mechanism

研究代表者

東元 健（Higashimoto, Ken）

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：30346887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Sotos症候群（SS）は知的障害を伴う過成長症候群である。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遺伝子である。我々は、SSモデルマウスを樹立するために、大脳皮質、海馬でNsd1をノックアウトしたマウスを樹立した。このマウスは、ヘマトキシリン染色による組織学的解析とMRI解析により、側脳室の拡大や歯状回の短縮を伴う海馬面積の減少を認めた。また、行動表現型解析では空間記憶の低下を認めた。これらの結果より、海馬の成熟神経細胞に焦点を当て、エピゲノム解析と遺伝子発現解析を網羅的に行い、行動表現型に関与する候補遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sotos症候群（SS）の知的障害発症メカニズムは全く解明されていない。このことは、モデルマウスが確立していないことが一因である。我々は、初めて大脳皮質と海馬でSSの原因遺伝子であるNsd1を破壊したマウスを作成した。このマウスは海馬面積の減少や空間記憶の低下を示した。また、これら表現型に関与するNsd1の下流に存在する遺伝子を同定した。このように、モデルマウスを使用した分子レベルでの解明は、新たな治療基盤の確立の礎になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sotos syndrome (SS) is an overgrowth syndrome associated with intellectual disability. The responsible gene is the Nsd1 gene, which encodes histone H3 lysine 36 methyltransferase. We established conditional knockout mice in which the Nsd1 is deleted in the cerebral cortex and hippocampus. The mice showed a decrease in hippocampal area with shortening of the dentate gyrus and enlargement of the lateral ventricles by hematoxylin staining and MRI analyses. Behavioral phenotyping also showed a decrease in spatial memory. Based on these results, we focused on mature neurons in the hippocampus and conducted comprehensive epigenetic and gene expression analyses. Thereby, we identified some candidate genes involved in the behavioral phenotype.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：Sotos症候群 知的障害 Nsd1 モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Sotos 症候群 (SS) は、知的障害を伴う過成長症候群である。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。しかし、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。つまり、現在のところ、SS のモデルマウスは存在しない。モデルマウスの樹立は、SS の知的障害発症メカニズムの解明には必須である。そのため、本研究では、SS 知的障害モデルマウスを樹立することから着手した。

2. 研究の目的

SS 知的障害モデルマウスを樹立し、まずその解剖学的、組織学的な表現型と行動表現型を明らかにする。次に、表現型、つまり知的障害の発症原因となる分子メカニズムを、網羅的エピゲノミクス・網羅的遺伝子発現解析を行い、これら解析結果をバイオインフォマティクスにより統合的に解析することにより明らかにする。将来的には、このモデルマウスを、その発症機構をもとに開発した分子標的治療薬やエピジェネティック治療薬、あるいは既存の治療薬のスクリーニングに用いることにより、SS 患者の知的障害に対する治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) SS 知的障害モデルマウスの樹立

ハプロ不全に相当する全身性ヘテロ欠損マウスの表現型は正常であり、一方、全身性ホモ欠損マウスは胚性致死を示す。そこで、Nsd1 flox マウスを Emx1-Cre トランスジェニックマウスと交配し、大脳皮質、海馬、嗅球の興奮性神経細胞特異的に Nsd1 をノックアウトしたマウス (SS モデルマウス) を作製した。

(2) SS モデルマウスの表現解析

週齢による体重の測定

1 週齢から 15 週齢まで週齢ごとに行った。

脳の重量測定

15 週齢マウスを灌流固定後、マウス脳を取り出し、その重量を測定した。

組織学的解析

12 週齢マウスの冠状断新鮮凍結切片を作成後、ヘマトキシリン染色を行った。

MRI 解析

15 週齢マウスの脳を MRI にかけて、正中矢状断、冠状断、水平断において様々な脳領域における二次元解析を行った。

行動表現解析

以下の行動テストバッテリーを行った。一般的身体所見・神経学的スクリーニング、明暗選択テスト、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、ローターロッドテスト、ホットプレートテスト、社会的相互作用テスト、社会的行動テスト、聴覚性驚愕反応とプレパルス抑制テスト、ポーソルト強制水泳テスト、位置認識試験、Beam テスト、Pattern separation、バーンズ迷路テスト、恐怖条件付けテスト、尾懸垂テスト。

(3) 免疫組織化学染色

8 週齢マウスにおいて、海馬の神経新生の状態を、抗 DCX 抗体を用いて共焦点顕微鏡にて観察した。

(4) マウス海馬より成熟神経細胞核の分離

14 週齢マウスより海馬を取り出し、ダウンス型ホモジナイザーにかけて、その後 Percoll 密度遠心勾配により細胞核を分離した。その後、分離した核を蛍光標識された抗 NeuN 抗体を用い、FACS ソーティングによって、海馬成熟神経細胞核を分離した。

(5) 海馬成熟神経核を用いた網羅的エピゲノム解析と網羅的遺伝子発現解析

網羅的 DNA メチル化解析と網羅的遺伝子発現解析

上記の海馬成熟神経核より、DNA と RNA を同時に抽出した。EM-seq に DNA を用い網羅的 DNA メチル化解析を行った。一方、RNA-seq に RNA を用い網羅的遺伝子発現解析を行った。

ヒストン修飾のゲノム網羅的解析

海馬成熟神経核も用い、CUT&Tagを行った。使用した抗体は、抗 H3K36me2 抗体、抗 H3K36me3 抗体、抗 H3K27me3 抗体、抗 H3K27ac 抗体の 4 種類である。

4. 研究成果

(1) SS モデルマウスの表現型解析の結果

体重と脳の重量

コントロールに比べて、4 週齢において体重減少が見られ、その後 9 週齢にかけて体重が catch up しコントロールと同等になった。15 週齢時点での脳の重量はコントロールと差はなかった。また、脳の外見において大きさや形態に特に異常は認めなかった。

ヘマトキシリン染色

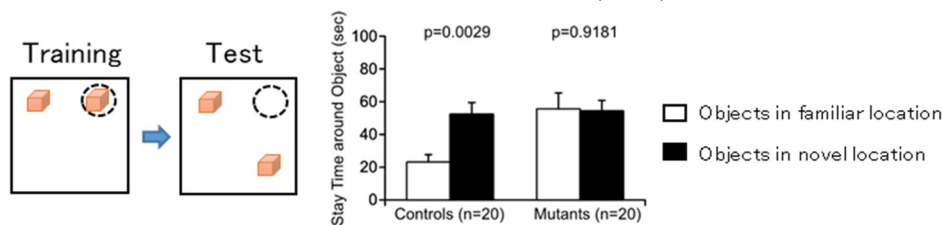
コントロールに比べて、脳梁正中交差の尾側側で早期喪失、歯状回の upper と lower blade 短縮を伴う海馬面積の減少を認めた。

MRI 解析

コントロールに比べて、脳梁頭尾長の短縮が見られた。この結果は、ヘマトキシリン染色で見られた脳梁正中交差の尾側側の早期喪失に一致する。その他に、脳梁膨大部の菲薄化、海馬面積の縮小、側脳室体部の拡大が認められた。一方、冠状断、水平断共に脳面積全体の变化はなかった。

行動表現型解析

位置認識試験において、空間記憶の低下を示した(下図)。



(2) 海馬神経新生

統計を行えるだけの匹数を解析していないが、コントロールに比べて、明らかに海馬の神経新生が減少していた。また、神経の形態も神経突起が十分に伸びていなかった。

(3) 網羅的エピゲノミクス解析

バイオインフォマティクスによる解析が終わっていないので、IGV による視覚的感想を述べる。Nsd1 ノックアウト ES 細胞で報告された結果同様に、遺伝子間領域の H3K36me2 レベルの低下、DNA メチル化の低下、H3K27me3 レベルの上昇、H3K27ac レベルの減少を認めた。また、いくつかのプロモーター領域では DNA の低メチル化がおきていた。

(4) 網羅的遺伝子発現解析

SS モデルマウスで発現が上昇した遺伝子は 1549 個、発現が低下した遺伝子は 908 個であった。Gene Ontology 解析では、発現が低下した遺伝子に神経投射やシナプスに関わる遺伝子が多く見られた。また、発現が上昇した遺伝子、発現が減少した遺伝子の Top5 を抽出した時、その中に SS モデルマウスの表現型に関与すると思われる遺伝子が含まれていた。

(5) 研究成果のまとめ

空間記憶の低下は、海馬が大きく関与している。事実、海馬面積の減少やプレリミナリーながらも海馬神経新生に異常が認められた。記憶・学習には海馬神経新生が関与していることから、今後、神経新生阻害の分子メカニズムを解明する予定である。また、海馬成熟神経細胞における網羅的遺伝子発現解析と網羅的エピゲノム解析の結果をバイオインフォマティクスにより統合することにより、遺伝子発現異常のメカニズムを解明する予定である。これらの結果により、Nsd1 の下流に存在し、SS の知的障害発症に主に関与する遺伝子を同定できればと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sun F, Hara S, Tomita C, Tanoue Y, Yatsuki H, Higashimoto K, Soejima H.	4. 巻 185
2. 論文標題 Phenotypically concordant but epigenetically discordant monozygotic dichorionic diamniotic twins with Beckwith-Wiedemann syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A.	6. 最初と最後の頁 3062-3067
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.62364.	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 Higashimoto K, Watanabe H, Tanoue Y, Tonoki H, Tokutomi T, Hara S, Yatsuki H, Soejima H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Hypomethylation of a centromeric block of ICR1 is sufficient to cause Silver-Russell syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Genet.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jmedgenet-2020-106907.	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 Kodera C, Aoki S, Ohba T, Higashimoto K, Mikami Y, Fukunaga M, Soejima H, Katabuchi H.	4. 巻 47
2. 論文標題 Clinical manifestations of placental mesenchymal dysplasia in Japan: A multicenter case series.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res.	6. 最初と最後の頁 1118-1125
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14647.	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 Mori H, Takahashi H, Mine K, Higashimoto K, Inoue K, Kojima M, Kuroki S, Eguchi T, Ono Y, Inuzuka S, Soejima H, Nagafuchi S, Anzai K.	4. 巻 12
2. 論文標題 TYK2 Promoter Variant Is Associated with Impaired Insulin Secretion and Lower Insulin Resistance in Japanese Type 2 Diabetes Patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes (Basel).	6. 最初と最後の頁 400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12030400.	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 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Soejima H, Sun F, Yatsuki H, Higashimoto K, Hara S
2. 発表標題 Phenotypically concordant but epigenetically discordant monozygotic dichorionic diamniotic twins with Beckwith-Wiedemann syndrome.
3. 学会等名 European Society of Human Genetics Conference, 2021 Virtual Conference. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原 聡史、孫 菲菲、富田 知世子、田上 由香、八木 ひとみ、東元 健、副島 英伸
2. 発表標題 表現型は一致するがDNAメチル化状態が一致しないBeckwith-Wiedemann症候群双胎（二絨毛膜二羊膜）の1例
3. 学会等名 第66回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八木 弘子、佐藤 知彦、神尾 卓哉、東元 健、副島 英伸、照井 君典
2. 発表標題 Beckwith-Wiedemann症候群に合併した副腎性クッシング症候群の一例
3. 学会等名 第29回特定非営利活動法人東北内分泌研究会・第41回日本内分泌学会東北地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東元 健、渡邊 聖、田上 由香、外木 秀文、徳富 智明、原 聡史、八木 ひとみ、副島 英伸
2. 発表標題 Hypomethylation of a centromeric block of ICR1 is sufficient to cause Silver-Russell syndrome
3. 学会等名 第65回日本人類遺伝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東元 健, 渡邊 英孝, 三宅 紀子, 森田 純代, 堀居 拓郎, 畑田 出穂, 松本 直通, 副島 英伸.
2. 発表標題 DNA methylation analysis of multiple imprinted DMRs in Sotos syndrome reveals IGF2-DMR0 as a DNA methylation-dependent, P0 promoter-specific enhancer.
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
<https://www.biomol.med.saga-u.ac.jp/mbg/>

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
研究協力者	高雄 啓三 (Takao Keizo)		
研究協力者	松久 葉一 (Matsuhisa Fumikazu)		
研究協力者	吉岡 芳親 (Yoshioka Yoshichika)		

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
研究協力者	村田 祐造 (Murata Yuzo)		
研究協力者	佐久本 孟寿 (Sakumoto Takehisa)		
研究協力者	北嶋 修司 (Kitajima Shuji)		
研究協力者	青木 茂久 (Aoki Shigehisa)		
研究協力者	吉浦 孝一郎 (Yoshiura Koh-ichiro)		
研究協力者	副島 英伸 (Soejima Hidenobu)		
研究協力者	中島 欽一 (Nakashima Kinichi)		
研究協力者	甲斐 翔太郎 (Kai Shotaro)		

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
研究協力者	中林 一彦 (Nakabayashi Kazuhiko)		

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