

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461555

研究課題名(和文)インプリンティング変異によるプラダーウィリー症候群モデルマウスの解析

研究課題名(英文)molecular analysis of Prader-Willi syndrome model mice with imprinting mutation

研究代表者

木住野 達也 (KISHINO, Tatsuya)

長崎大学・先端生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：70315232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はプラダーウィリー症候群(PWS)のインプリンティングセンター(IC)のメチル化異常をもち新生仔期致死を呈するPWSモデルマウスを作製し、インプリンティング確立機構を配偶子、初期胚において解析した。PWS-ICの機能に影響を与える最初の因子はゲノム構造の変化であり、DNAメチル化の影響は二次的なものであることが判明した。同モデルマウスの救済実験としてBACトランスジェニック(Tg)マウスを作製し交配したが、Ndn Tg及びMkrn3 Tgにおいて新生仔期致死を回避することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：We created Prader-Willi syndrome (PWS) model mice, which show neonatal lethality because of abnormal DNA methylation on the PWS imprinting center (IC). We analyzed molecular mechanism of establishment of genomic imprinting in gametes and early embryos using our PWS model mice. We found that the main epigenetic factor which could affect gene expression in the imprinted region is genomic constitution and next DNA methylation after implantation. To rescue neonatal lethality in PWS model mice, we created Ndn and Mkrn3 transgenic mice, but both of them could not rescue the PWS model mice.

研究分野：小児神経学

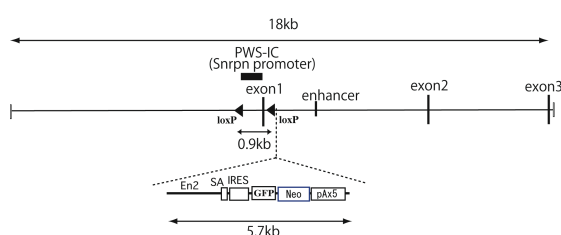
キーワード：プラダーウィリー症候群 インプリンティング モデルマウス DNAメチル化 トランスジェニックマウス Necdin Mkrn3

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラダーウィリー症候群 (PWS) は新生児期の筋緊張低下、乳児期以降の食欲亢進と肥満、中等度の精神発達遅滞、特異顔貌を特徴とする先天性疾患である。染色体 15q11-13 が責任領域であり、ゲノムインプリンティングが関与しているため、父親由来アレルの不全で発症する。PWS の発症原因は分子遺伝学的に以下の 5 グループ 1) 染色体領域の欠失、2) 片親性ダイソミー、3) インプリンティング変異、4) 遺伝子の異常 (*Snord 116*)、5) 原因不明 に分類される。

PWS は隣接遺伝子症候群で、父親由来アレルからのみ発現する *NECDIN*, *MKRN3* 等の隣接する複数のインプリンティング遺伝子が、PWS の症状に関与していると考えられている。これらのインプリンティング遺伝子はインプリンティング・センター(IC)によって発現が制御されている。ヒトにおいては *SNRPN* 上流に PWS-IC が想定されており、PWS-IC の不全によっても PWS が発症する。PWS-IC は発生過程におけるインプリンティングの維持に関与していると考えられている。PWS-IC 領域のインプリンティング変異を持つマウスとして PWS-IC コンディショナル KO:GFP-KI マウス(以降 KI マウスと呼ぶ)を我々は作製した。KI マウスは PWS-IC を *Lox* ではさんだコンディショナル KO で、*Snrpn* プロモーター領域及び上流の複数のプロモーターを介した IC-transcript(long ncRNA)の発現を抑制するため、IRES-GFP-Neo-pAx5 (SV40 polyA signal を 5 個タンデムに連結)をノックイン(KI)している(下図)。



KI された ES 細胞、マウス個体において、父親由来アレルからのみ発現する同領域の遺伝子は全て発現が消失していた。さらに PWS-IC の DNA メチル化解析では ES 細胞、マウス個体において両アレルでメチル化していた(正常マウスでは父親アレルはメチル化していない)。また、父親由来 KI マウスでは新生児期致死を示し、従来作製された PWS モデルマウスにみられる新生児期致死と同じであった。母親由来 KI マウスでは正常の成育を示した。

2. 研究の目的

PWS-IC 領域のインプリンティング変異を持つ同 KI マウスは、その遺伝子発現、新生仔期致死の症状より PWS モデルマウスと考えられるが、1) 配偶子形成期、及び初期胚のどの時期に PWS-IC の異常メチル化が生じているか 2) 異常メチル化を引き起こした原因は何か 3) 同マウスは PWS の様々な症状を呈するか 4) 呈する場合、その病態解析と治療法の創出を目的とした。

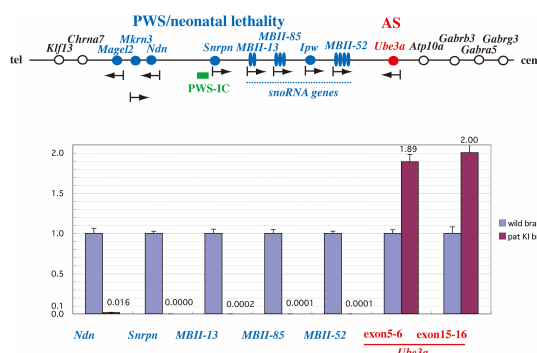
3. 研究の方法

申請者らが新たに作製した PWS-IC メチル化異常の KI マウスの、異常メチル化となった原因を、配偶子特異的メチル化確立機構及び体細胞におけるメチル化維持機構の両面から、細胞レベルで解析を行う。アレル特異的遺伝子発現、DNA メチル化を解析するために KI マウスのバックグラウンドである C57BL/6 とは異なる strain である PWK と交配して、F1 マウスを解析に用いる。遺伝子改変マウス(配偶子特異的 Cre 発現マウス、*Dnmt1* 欠失マウスなど)と交配し、DNA メチル化異常だけでなく、ヒストン修飾、クロマチン構造の変化を解析し、PWS-IC の DNA メチル化の意義を解明する。マウスの表現型解析は 8 継代(F8)以上交配した後にを行い、PWS の症状との相関を調べる。

4. 研究成果

(1) *Snrpn-Ube3a* 領域の遺伝子発現解析

KI マウスと strain の異なる PWK マウスを交配した F1 マウスの解析から、父親由来アレルからのみ発現する同領域の遺伝子(*Ndn*, *Mage12*, *Mkfn3*, *Snrpn* など)は父親由来 KI マウスにおいて、全て発現は消失していた。母親アレルからのみ発現する *Ube3a* は脳において正常の 2 倍の発現量を認めた。母親由来 KI マウスにおいては野生型と同様の遺伝子発現であった(下図)。



(2) DNA メチル化解析 (*Snrpn* プロモーター)

父親由来 KI マウスにおいて

体細胞:両アレルでメチル化

配偶子:メチル化なし

初期胚:胚盤胞まではメチル化なし

であった。同 KI マウスでは着床後に父親由来の KI アレルにおいて異常なメチル化が起きていることが判明した。

(3) PWS-IC と遺伝子発現の関連

PWS-IC 領域と遺伝子発現の関連を見るために配偶子特異的 Cre 発現マウスと交配して PWS-IC を KO したマウスにおいて上記(1)の遺伝子発現解析を行った。PWS-IC が欠失していても遺伝子発現に変化は見られなかった。このことから、KI マウスにおいては PWS-IC 以前に KI によってインプリンティングに影響が出たと考えられた。

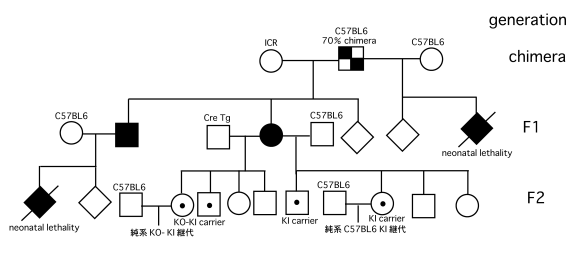
(4) DNA メチル化と KI アレルの不活性化

DNA メチル化による KI アレルの不活性化との関連を調べるために、Dnmt1KO マウスと KI マウスを交配したマウス(Dnmt1^{-/-}, patKI)にて遺伝子発現解析を行った。Dnmt1^{-/-}は胎生致死であるので E10 の組織で発現を解析したところ、KI マウスでは DNA メチル化にかかわらず遺伝子の発現は見られなかった。

以上(1)～(4)の結果より本 KI マウスの KI アレルにおける遺伝子発現制御は KI による構造的な不活性化によるものが最初に起き、次に DNA メチル化による不活性化が起きているものと考えられた。

(5) 表現型解析

父親由来 KI アレルを持つマウスは生後 48 時間以内に死亡する新生仔期致死であり、他の strain に background を変えても新生仔期致死に変化はなかった(下図)。



表現型の解析には新生仔期致死を回避する必要があり、トランスジェニック(Tg)マウスとの交配による Tg rescue の目的で Tg マウス作製に着手した。

(6) BACTg マウスの作製と交配

Ndn, *Mage12*, *Mkrn3* を含む BAC クローン(RP23-59P20)の BAC Tg の作製を行った。3 ラインの Tg マウスを樹立した。*Ndn*, *Mage12*, *Mkrn3* の 3 遺伝子全てを含む Tg マウスは樹立できなかったが、*Ndn*Tg, *Mkrn3* Tg, 及び *Ndn*+*Mkrn3* Tg を樹立した。それぞれの Tg マウスと KI マウスを交配して、KI マウスの新生仔期致死を回避できるかどうか観察したが、いずれの交配でも Tg からの遺伝子発現によって *Ndn*, *Mkrn3* の発

現は回復したが、新生仔期致死は回避できなかった。

次に *Snord116* を含む BAC クローン

(RP23-276M11)の BAC Tg の作製を行った。同 Tg マウスにおいても完全長の BAC Tg は得られなかったが、一部 *Snord116* を含む Tg マウスの樹立は成功した。現在 KI マウスと交配し、新生仔期致死を回避できるかどうか観察中である。

(7) 治療法の創出

最近、異なる PWK モデルマウスにおいて G9a 阻害剤(UNC0642)の有効性が報告された(Nature Medicine 2017)。当 KI マウスにおいても G9a 阻害剤を妊娠中及び新生仔期に投与したが、新生仔期致死を回避できなかった。KI マウスの胎児線維芽細胞に G9a 阻害剤を投与したが、*Snrpn* 等の発現は見られず、論文の結果を再現できていない。

< 引用文献 >

Kim Y, et al. Targeting the histone methyltransferase G9a activates imprinted genes and improves survival of a mouse model of Prader-Willi syndrome. Nat Med. 2017 23:213-222.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nakagaki A, Osanai H, Kishino T.

Imprinting analysis of the mouse chromosome 7C region in Dnmt1-null embryo. GENE 査読有 553,63-68.2014.

Cheron G, Márquez-Ruiz J, Kishino T, Dan B. Disruption of the LTD dialogue between the cerebellum and the cortex in Angelman syndrome model: a timing hypothesis. Front Syst Neurosci. 査読有 2014 Nov 19;8:221.doi:0.3389/fnsys.2014.00221.eCollection 2014.

〔学会発表〕(計 7 件)

木住野達也 「BAC トランスジェニック(Tg)マウス作製過程に同定されたメイプルシロップ尿症モデルマウス」日本小児神経学会 2017.6.15-17 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

木住野達也「Mkrn3 ノックアウトマウス (KO)及びトランスジェニック(Tg)マウスの解析」日本分子生物学会
2016.11.30.-12.02 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

木住野達也「ドロップレットデジタルPCR(ddPCR)を用いたアンジェルマン症候群責任遺伝子 Ube3a のアレル別発現の絶対定量解析」日本小児神経学会
2016.6.03-05 京王プラザホテル(東京都・新宿区)

木住野達也「Angelman 症候群原因遺伝子 UBE3A トランスジェニックマウスの解析」日本小児神経学会 2015.5.29-30 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)

木住野達也「アンジェルマン症候群モデルマウス(Ube3a KO マウス)の UBE3A トランスジェニックレスキュー」第 50 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会(招待講演)
2014.12.5-6 和歌山県立医大(和歌山県・和歌山市)

木住野達也「Dnmt1 欠失マウスにおける染色体 7C インプリンティング領域の解析」日本小児神経学会 2014.5.28-30 アクトシティ浜松(愛知県・浜松市)

木住野達也「Dnmt1 欠失マウスにおける染色体 7C インプリンティング領域の解析」日本分子生物学会 2013.12.03-07 神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

木住野 達也 (KISHINO, Tatsuya)
長崎大学・先導生命科学研究支援センター・准教授
研究者番号：70315232