

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640027

研究課題名(和文)新規小頭症マウスの発見・原因遺伝子のポジショナルクローニングと系統樹立

研究課題名(英文) Investigation of causative genes of new microcephaly by positional cloning and establishment of congenic strains for the new microcephaly model mice

研究代表者

島岡 達朗 (Shimaoka, Tatsuro)

埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・その他

研究者番号：10565865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1)病理組織学的研究により、小頭症発症個体の脳各部位で、成長が非常に遅れている事が明らかになった。大脳皮質：層構造が不明瞭。特に、外顆粒層、内顆粒層が消失していた。海馬：海馬・歯状回部位では、形成が極端に未熟か、消失していた。小脳：プルキンエ細胞層の上に皮質に相当する部分がなかった。嗅球：顆粒細胞層が未熟か、消失していた。(2)原因遺伝子を第5染色体まで絞り込んだが、候補遺伝子を決定できなかった。(3)小頭症モデルマウスの樹立化については、BALB/c及びC57BL/6系統へのコンジェニック化を進めている。なお、BALB/c系小頭症マウスは、理研バイオリソースセンターへ寄託済みである。

研究成果の概要(英文)：(1) Histopathological examination revealed that the growth was extremely delayed in each part of the brain of microcephaly-affected individuals. Cerebral cortex: Layer structure is unclear. In particular, the outer granule layer and the inner granule layer disappeared. Hippocampus: At the hippocampus-dentate gyrus site, formation was extremely immature or disappeared. Cerebellum: There was no cortex on the Purkinje cell layer. Olfactory bulb: Granular cell layer was immature or disappeared. (2) The causative gene was narrowed down to chromosome 5, but the candidate gene could not be determined. (3) Congenic strains to BALB/c and C57BL/6 are underway for the establishment of microcephaly model mice. Balb/c microcephaly mice have been deposited with the RIKEN BioResource Center.

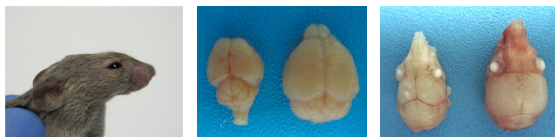
研究分野：実験動物学

キーワード：神経発生 分化 自然発症変異 小頭症 疾患モデル

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト小頭症は、脳の発育が悪く、頭蓋及び大脳半球が異常に小さい状態で生まれ、多くは精神遅滞と運動障害を持つ。その原因は遺伝子異常、胎児の有害物質暴露、および放射線の体内被曝などが知られている。原因遺伝子は、MCPH1、ASPM 及び CASK などの 7 遺伝子が同定され、その全てが中心体に局在することから脳の発生過程における中心体の機能に注目が集まっている。しかし、これらの遺伝子変異で説明できる小頭症は限られており、自然発症小頭症モデルの出現が待たれていた。このような研究背景において、2013 年 Fujikura らにより常染色体劣性遺伝性の自然発症マウスが報告された<sup>1)</sup>。この変異マウスは、生後 10 日齢における体重及び運動能は野生型に比べ有為に低く、全ての個体は生後 3 週間以内に死亡した。原因遺伝子はマウス第 1 染色体の新規遺伝子 Kif14(kinesin family member 14)であることが明らかにされ、laggard マウスと名付けられた。一方、申請者らが、2013 年に発見した小頭症マウスは、生後 3 日目で同腹正常個体と比較して体のサイズが小さく、生後 2 週過ぎには、頭部が平らな形状を示した(左写真)。その後、全身の痙攣、振戦及び削瘦が著しくなり、生後 3~4 週に全例が死亡する。交配実験の結果から遺伝様式は、常染色体劣性遺伝である事がわかった。原因遺伝子の染色体マッピングの結果、候補遺伝子領域を第 5 染色体の 54~57 センチモルガン付近に狭めた。マウス小頭症に関係する遺伝子の報告はこれまでに 127 遺伝子があり、第 5 染色体には、小頭症に関係した Lias、Pds5b、Shh および Cep135 の 5 遺伝子座が報告されているが、いずれの遺伝子も今回狭めた候補領域にはなかった。従って第 1 染色体に原因遺伝子を持つ laggard マウスとも異なり、世界で 2 番目の新規自然発症小頭症マウスとなる可能性が大きくなった。

(左写真: 発症マウス、中写真: 大脳皮質、右写真: 頭骸骨 左: 発症、右: 正常)



### 2. 研究の目的

幸運と日常の注意深い観察によって、マウス新生児のなかに正常個体に比べてサイズの小さく、やや血色の悪い変異個体を見いだした。変異個体は、形態学的、病理学的検索及び交配実験等から常染色体性劣性遺伝に従う新規の自然発症小頭症マウスであることがわかった。そこで新規疾患モデル樹立の為に、まず染色体マッピングとポジショナルクローニングによって原因遺伝子を特定する。次いで、交配実験によって原因遺伝子を遺伝的背景の異なる 3 近交系マウスに導入したコンジェニック小頭症モデル系統セットを

樹立する。さらに、これらのコンジェニックマウスの脳組織から初代培養細胞の作製をおこない、ヒト小頭症の原因究明、脳機能及び細胞分裂機構解析に有用なマウス個体モデルと初代細胞モデルを提供する。

### 3. 研究の方法

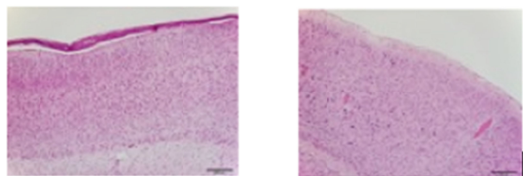
- (1) 本小頭症の原因遺伝子のポジショナルクローニングはマウス第 5 染色体に候補領域を絞り込んでおり、原因遺伝子が特定された変異箇所の詳細を解析する。
- (2) 原因遺伝子を 3 近交系マウスに導入したコンジェニック小頭症モデルマウスの樹立化は既に開始して、期間中に完成させる。
- (3) コンジェニック小頭症モデルマウス発症個体より、各種脳細胞の初代培養細胞を作製する。
- (4) 発症個体の行動様式の差異、病理組織学・免疫組織学的分析を行い、組織学的見地から wild type の違いを示す。

### 4. 研究成果

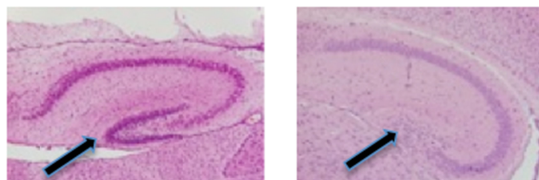
#### (1) 病理組織学的研究

病理組織用に確保した発症個体(2例)及び正常個体(2例)の脳をホルマリン固定~パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色にて、組織像の観察をした。結果、発症個体の各部位で成長が非常に遅れている事が明らかになった。

大脳皮質: 発症個体の層構造(5層)が不明瞭。特に外顆粒層、内顆粒層が消失していた。(左: 正常、右: 発症)



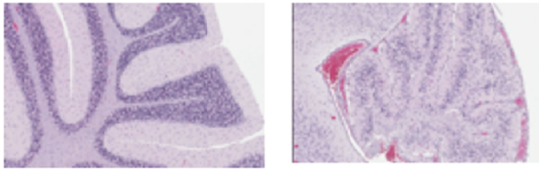
海馬: 海馬・歯状回部位は、記憶をつかさどる一領域で海馬への情報入力に重要な役割を担い、毎日数千の神経細胞が生まれてくる場所であるが、発症個体の海馬ではその形成が極端に未熟か、消失した状態であった。(左: 正常、右: 発症)



#### ( : 歯状回部位)

小脳: 生後の日齢により大きく変化を確認でき、正常個体では、生体に近い構造を示し、顆粒細胞はプルキンエ細胞層の下へ移動していた。もう 1 個体は顆粒細胞の殆どが皮質表層下にあり、未熟な構造を示した。一方、発症個体はプルキンエ細胞層の上に皮質に相当する部分がな

い。もう1個体は顆粒細胞が皮質下へ既に移動しているが、非常に少ない。  
(左:正常、右:発症)



(濃染領域:プルキンエ細胞層)

嗅球:顆粒細胞層が発症個体では未熟か、消失していた。

(2) 候補遺伝子である Zfp326 蛋白質の抗体(市販品)を用いて、免疫組織学的検索を実施した。

ホルマリン固定~パラフィン切片を用いて、抗マウス Zfp326 抗体-抗マウス IgG 抗体 HRP 標識にて評価を行った結果、小頭症発症マウスの染色度合いは薄く、免疫反応が弱かった。発症個体の脳は未発達で、細胞数が少ない事が起因していると推察した。

(3) 原因遺伝子を特定するため、第5染色体の候補領域の解析を行ない、候補遺伝子を探し、塩基配列における比較を行なった。

小頭症発症個体及び同腹正常個体のゲノム DNA を用いてマイクロサテライト DNA マーカーによる PCR 解析を実施し、Zfp326 遺伝子を最有力候補とした。ゲノム DNA より Zfp326 遺伝子の塩基配列を確認する為、エクソン領域の解析を実施した。本遺伝子は12個のエクソンから構成されている事より24個のプライマーを設定し、BALB/c系の発症および正常個体の解析を行なった。また、Zfp326 遺伝子のリファレンスとして、C57BL/6Jのゲノムシーケンスを用いた(ENSMUSG00000031227)。BALB/c系の発症および正常個体は同じ塩基配列を示した。

リファレンスである C57BL/6J と BALB/c 発症個体の塩基配列を比較した所、塩基配列では、エクソン1、エクソン11およびエクソン12で各1塩基、異なっていた。そして、アミノ酸配列では、エクソン12のみ、グリシン アスパラギン酸であった。これらの事より、C57BL/6J と BALB/c との系統差は確認できたが、発症個体と正常個体の変異は確認できない事より、本遺伝子が原因遺伝子で無いと判断した。

(4) コンジェニック小頭症モデルマウスの樹立については、BALB/c および C57BL/6 で継続して進めている。しかし、当実験動物施設改装工事の為(平成26年8月~平成27年12月)、マウス飼育が不可能となり、平成26年7月に本小頭症のヘテロ個体を理研バイオリソースセンターへ寄託した。平成28年3月に、初めて小頭症ホモ個体の出現が確認された。

(5) 以上の事情により、脳細胞を用いた初代

培養細胞の樹立は期間内で達成できなかったが、今後継続して樹立化を実施する予定である。

(6) 同様に、行動様式に関しても、発症個体の確保が困難であり、本開発期間内では検討できなかったが、継続して実施する予定である。

他方、2013年 Takao K.ら<sup>2)</sup>は Shn-2 KO マウスの脳で慢性的で軽度な炎症が起こっていること、脳の一部(海馬歯状回)が未成熟な状態にあることを発見した。さらに炎症を抑えることにより、このマウスの海馬歯状回の成熟状態を改善することにより、行動異常のうち作業記憶の障害と巣作り行動の障害が改善されたことを明らかにし、統合失調症患者の脳と極めてよく似ていると報告した。また、2014年 Katherine G. Akers ら<sup>3)</sup>は、海馬歯状回での神経新生と記憶の忘却との関係を検討し、幼若期に海馬歯状回において盛んに生じている神経新生によって記憶の忘却が促進され、神経細胞の新生が少ない成体期には記憶がおこりにくい事を明らかにした。

これらの報告より、今回発見した小頭症発症マウスは、海馬歯状回部位が未熟であることが確認されており、統合失調症や心的外傷後ストレス障害(PTSD)などの精神疾患のモデルマウスとして利用可能か否か、今後検討する。

#### <引用文献>

- 1) K.Fujikura, T.Setsu, et al., Kif14 Mutation Causes Severe Brain Malformation and Hypomyelination. PLOS ONE, 8, 2013, 1-17
- 2) K.Takao, K.Kobayashi, et al., Deficiency of Schnurri-2, an MHC Enhancer Binding Protein, Induces Mild Chronic Inflammation in the Brain and Confers Molecular, Neuronal, and Behavioral Phenotypes Related to Schizophrenia. Neuropsychopharmacology, 38, 2013, 1409-1425
- 3) K.G.Akers, A. Martinez-Canabal, et al., Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adult hood and infancy. Science, 344, 2014, 598-602

#### 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0件)

[学会発表](計0件)

[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〕

6．研究組織

(1)研究代表者

島岡 達朗（SHIMAOKA, Tatsurou）  
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・  
研究員  
研究者番号：10565865

(2)連携研究者

松島 芳文（MATSUSHIMA, Yoshibumi）  
埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・  
研究員  
研究者番号：10094955