

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870397

研究課題名(和文) ヒト染色体異常に基づく染色体改変モデルマウスの統合的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for animal model of chromosome rearrangement

研究代表者

野村 淳 (Nomura, Jun)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：70406528

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)：精神遅滞患者の大規模ゲノムデータから疾患と関連する新規の染色体領域を同定する目的で行われたプロジェクトから、15q25.2-25.3領域が同定された。

本研究は過年度に染色体工学により作製したヒト15q25.2-25.3領域欠失モデルマウスを用い、対象染色体領域の欠失がどのような行動パラダイムに影響を及ぼすか網羅的行動バッテリーを基に同定することを目的とした。この結果、社会性、空間記憶、作業記憶、抑うつ等は顕著な影響は認められないものの、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験から顕著な不安様行動が認められた。

現在、MRIによる脳の構造変化とともに、不安様行動につながる分子基盤を解析中である。

研究成果の概要(英文)：Recently, large scale genomic database revealed that 15q25.2-25.3 as a one of the novel risk loci for developmental disorders. Indeed three patients with 15q25.2-25.3 deletion exhibited autistic or neurological phenotypes indicating that this locus may involved in psychological/emotional aspects. To analyze association between this risk locus and behavioral abnormalities, we developed humanized mice model which recapitulate human 15q25.2-25.3 deletion by using chromosome engineering technique. In this term, first, we transferred mouse genetic background, 129 to C57BL/6J, to conduct behavioral neuroscience research. The speed congenic method enable us to start next study earlier than expected but spent one year. Next, we conducted comprehensive behavioral analysis to identify risk loci related behavioral abnormalities. Although typical autistic behaviors (e.g. social deficit and repetitive behavior) have not seen in this mouse, anxiety related behaviors were observed.

研究分野：神経化学・神経薬理

キーワード：染色体工学 精神疾患 疾患モデル 発達障害 ジーンターゲットング 自閉症 ES細胞 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

2011年、新たに発達障害患者の大規模ゲノムDNAデータを(15,767人小児発達障害患者, 8,329人成人健常者の対照群)用いた解析から、新規に発達障害と相関する染色体領域として15q25.2-25.3領域の欠失が報告された(Cooper GM et al., Nat. Genet., 2011)。

染色体レベルでの複数の遺伝子の欠失もしくは重複による遺伝子群のコピー数の変化は、一塩基多型SNPs(Single Nucleotide Polymorphisms)と比較し、コピー数多型CNV(Copy Number Variations)とよばれる。CNVは複数の遺伝子群のコピー数依存的な遺伝子発現(変化)を伴うことから、ガンをはじめ精神疾患においても相関が報告されている。今回報告された15q25.2-25.3領域はヘテロ欠失であるため、対象領域に含まれる遺伝子群の発現は半分程度まで減少する可能性が示唆される。

本研究では、対象領域を欠失する発達障害患者3例を報告しており、そのうち2例は自閉症、1例は筋疾患、さらに軽度の運動発達障害(認知機能は正常)を併発している。対象領域15q25.2-25.3は7つの遺伝子(そのうち3遺伝子: Zscan2, Wdr73, Znf592は機能未知)を含む660-kbの巨大な領域であるが、これら遺伝子群のヘテロ欠失が実際に精神神経機能に影響を及ぼすかは不明である。

一方、我々は過年度にヒト15q25.2-25.3領域に相当するマウス染色体領域Chr.7を同定した。マウス領域においてもヒト領域同様、7遺伝子を含んでおり相同性が高いと考えられた。これを踏まえ、我々は染色体工学を用い、はじめにマウスES細胞(AB2.2 ES cells, マウス129系統)を用い、ヒト15q25.2-25.3相同マウス染色体領域を欠失した変異ES細胞を樹立、その後、変異ES細胞をマウス胚盤胞にインジェクションしキメラマウスを作製した。キメラマウスは野生型マウスと交配することでヒト15q25.2-25.3領域に相当するChr.7をヘテロ欠失した染色体改変マウスを得た。

2. 研究の目的

本期間(平成26年~27年)は、我々が作製した染色体改変マウス(ヒト15q25.2-25.3染色体領域に相当するマウス領域をヘテロ欠失したCNVのモデル)を用い、主に以下の項目を実施する。

(1) コンジェニックラインの樹立

染色体工学を用いて樹立した染色体改変マウスは、遺伝的背景が129系統であるため、C57BL/6J系統への変更(戻し交配)が必要となった。特に脳神経科学分野においてマウス行動解析を実施する際には129系統では脳梁

の不形成等、器質異常を伴う事が報告されており、C57BL/6系統の遺伝的背景を有することが必須条件である。通常10回以上の交配によりレシピエント系統(C57BL/6J)と少なくとも99%以上同一となる事が既に報告されている(Markel P et al., Nat. Genet., 1997)。

(2) 染色体改変マウスの行動レベルの解析・行動(バッテリー)スクリーニング

C57BL/6ライン樹立後には、網羅的な行動解析(行動バッテリー)を実施、対象染色体の異常がどの行動パラダイムに影響を及ぼすかを同定する。同時に脳の解剖学的解析もMRI(Magnetic Resonance Imaging: 核磁気共鳴画像法)を導入し、解析を行う。対象とするCNVが脳の構造に影響を与えるかは不明であるが、最近自閉症モデルマウスにおいても様々な構造変化が認められることから(Ellegood J et al., Molecular Psychiatry., 2015)、マウス行動解析と脳の構造変化の解析を並行して実施する。

3. 研究の方法

(1) 通常の戻し交配による手法では遺伝的背景の変更にかかるため、IVF法(in vitro fertilization: 顕微授精)により時間の短縮を図った。最終的に10回以上の世代を経るのに約1年を有した。その間に得られた染色体改変マウスは一見顕著な異常は認められなかった。さらに繁殖にも問題が認められないことから染色体改変マウスの生殖機能は正常と考えられた。

(2) 行動バッテリーでは以下の13項目を以下順序で実施した。明暗箱移行試験、オープンフィールド試験、Y字迷路試験、高架型十字迷路試験、スリーチャンバー社会性試験、社会性相互試験、ロタロッド試験、聴覚性驚愕試験/プレパルス抑制試験、バーンズ迷路試験、逆転学習試験、尾懸垂試験、恐怖条件付け試験。なお各試験の間隔は最低3日間、通常1週間を確保し、試験時間は10:00-18:00の間に実施した。行動実験機器・解析装置は小原医科産業(株)のものを用いた。

4. 研究成果

遺伝的背景をC57BL/6J系統に統一した染色体改変マウスを用い行動バッテリー(スクリーニング)を実施した。

新奇環境における活動量、不安行動を解析するオープンフィールド試験では、活動量自体に変化は認められなかったが、顕著な不安様行動を染色体改変マウスで認めた。さらに不安様行動を解析する試験である高架式十字迷路試験においてもオープンフィールド試験同様に不安様行動を認めたことから、扁桃体を中心とした神経回路に何らかの異常を生じている可能性が示唆される。MRIは実施

中であるため現在まで結果が得られていないが、扁桃体もしくは不安等の情動に与する腹側海馬において染色体改変マウスでは構造変化が起こっている可能性が示唆される。

空間記憶の解析には、バーズ迷路を適用した。バーズ迷路では異常が認められなかったため、空間記憶は正常と考えられる一方、バーズ迷路を用いた固執性の評価試験（逆転学習試験）では、染色体改変マウスは野生型に比べ固執性の傾向が認められた。『固執性・繰り返し行動』は自閉スペクトラム症（ASD）で認められる主症状の一つであるため、対象領域はASDの一部症状に与する可能性も考えられる。

一方、固執性とともにASDの主症状の一つである『社会性・コミュニケーションの喪失』パラダイムでは、スリーチャンパー社会性試験、相互社会性試験を実施、ともに異常が認められなかったため、対象領域は社会性には影響を及ぼさない可能性が示唆された。Cooperによる過年度の報告（Nat. Genet., 2011）からは、2患者がASDと診断されていることから、対象領域は固執性のパートに選択的に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

小脳依存的な運動機能・運動学習機能（ロタロッド試験）は異常が認められず、少なくとも小脳の運動に関するパラダイムは正常と考えられる。

主に統合失調症、そして一部の神経変性疾患（ハンチントン病）患者ではプレパルス抑制試験（PPI: Prepulse inhibition test）での障害が報告されている。実際、本試験はげっ歯類からヒトまで同一プラットフォームで幅広く感覚機能を評価する指標として広く用いられているが、染色体改変マウスにおいても障害が認められた。対象領域である15q25.2-25.3領域のヘテロ欠失患者は、臨床サイドの報告から、表現型が非常に幅広いことが既に示唆されている。この中には統合失調症様表現型も報告されていること（Doelken et al. Am. J. Med. Genet. A, 2013）から少なくとも患者の表現型の一部が再現できたといえる。本領域は、直接もしくは間接的にPPIの表現型に与している可能性が示唆される。一方、『抑うつ表現型』を解析する試験である尾懸垂試験では染色体改変マウスに変化は見られず、抑うつ傾向は認められない。

本研究期間では、行動バッテリーによる表現型の同定、さらにMRIブレインイメージングによる脳内脆弱部位の同定をコアのパートとして設定していたが、MRIの結果はまだ得られていない。しかし、本パートで共同研究を実施しているカナダトロント小児科病院のトロントゲノミクス表現型解析センター、マウスイメージングセンター（MICE: <http://www.mouseimaging.ca/index.html>）

Jason P. Lerch 准教授にはすでに脳固定サンプル（15週齢）を郵送し、解析を開始して頂いている。前頭葉、腹側海馬、さらに扁桃体を中心とした脳の構造変化に着目し、今後の解析に繋げていきたいと考えている。

<参考文献>

Cooper GM et al., A copy number variation morbidity map of developmental delay., Nat. Genet., 2011 Aug 14;43(9):838-846.

Markel P et al., Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains., Nat. Genet., 1997 Nov;17(3):280-284.

Ellegood J et al., Clustering autism: using neuroanatomical differences in 26 mouse models to gain insight into the heterogeneity., Molecular Psychiatry. 2015 Feb;20(1):118-125.

Ellegood J et al., 3D visualization of the regional differences., Molecular Psychiatry. 2015 Feb;20(1):1.

Doelken SC et al., Proximal and distal 15q25.2 icrodeletions-genotype-phenotype delineation of two neurodevelopmental susceptibility loci. Am J Med Genet A. 2013 Jan;161A(1):218-224.

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)

Nomura J, Jaaro-Peled H, Lewis E, Nunez-Abades P, Huppe-Gourgues F, Cash-Padgett T, Emiliani F, Kondo MA, Furuya A, Landek-Salgado MA, Ayhan Y, Kamiya A, Takumi T, Haganir RL, Pletnikov MV, O'Donnell P, Sawa A. Role for neonatal D-serine signaling: prevention of physiological and behavioral deficits in adult Pick1 knockout mice. Molecular Psychiatry, 2016 Mar;21(3):386-93. DOI: 10.1038/mp.2015.61.

査読あり

Nomura M, Kaneko M, Okuma Y, Nomura J, Kusumi I, Koyama T, Nomura Y. Involvement of serotonin transporter gene polymorphisms (5-HTT) in impulsive behavior in the Japanese population. PLoS One. 2015 Mar 16;10(3):e0119743. DOI: 10.1371/journal.pone.0119743

査読あり

〔学会発表〕(計3件)

Nomura J, Jaaro-Peled H, Lewis E, Nunez-Abades P, Huppe-Gourgues F, Cash-Padgett T, Emiliani F, Kondo MA, Furuya A, Landek-Salgado MA, Ayhan Y, Kamiya A, Takumi T, Haganir RL, Pletnikov MV, O'Donnell P, Sawa A. Role for neonatal D-serine signaling: prevention of physiological and behavioral deficits in adult Pick1 knockout mice. 発達期におけるD-セリンの役割: Pick1 ノックアウトマウスをモデルとして, 第45回日本神経精神薬理学会・第37回生物学的精神医学会合同年会, 2015年9月24日~9月26日, 東京(タワーホール船橋).

野村 淳, 佐久間 哲史, 神田 暁史, 岸本 恵子, 前田 知花, 外丸 祐介, 山本 卓, 内匠 透, ゲノム編集技術による簡便・迅速かつ高効率な次世代染色体工学の開発, 2014年11月25日~11月27日, 横浜(パシフィコ横浜).

野村 淳, 佐久間 哲史, 神田 暁史, 岸本 恵子, 前田 知花, 外丸 祐介, 山本 卓, 内匠 透, ゲノム編集技術による簡便・迅速かつ高効率な次世代染色体工学の開発, 第4回ゲノム編集研究会, 2014年10月6日~10月7日, 広島(広島国際会議場).

〔図書〕(計3件)

岸本 恵子, **野村 淳**, 内匠 透, 自閉症の動物モデル, 細胞工学 自閉症の生物学, 秀潤社, Vol.34 (5): 460-465, 2015

仲西 萌絵, **野村 淳**, 内匠 透, 大規模な全エクソーム解析からみる自閉症の遺伝学的基盤(海外注目論文解説), 細胞工学 自閉症の生物学, 秀潤社, Vol.34 (5): 458-459, 2015

岸本 恵子, **野村 淳**, 内匠 透, 自閉症スペクトラム障害の動物モデル, Clinical Neuroscience 月刊 臨床神経科学 社会脳 Social Brain, 中外医学社, Vol.33 (2): 201-205, 2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brain.riken.jp/jp/>

http://takumi.brain.riken.jp/page_id/55.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 淳 (NOMURA, Jun)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
特任助教

研究者番号: 70406528

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: