

# 30-9 ゲノム編集技術を用いたモデル動物作出による精神神経筋疾患の病態解明

主任研究者 国立精神・神経医療研究センター  
星野 幹雄

## 総括研究報告

### 1. 研究目的

CRISPR/Cas9 システムに代表される簡便なゲノム編集技術の登場で、動物個体への遺伝子欠損・変異導入が従来よりも遥かに迅速・安価・高効率で実現可能となり、疾患動物モデル作出に対するハードルは低下した。本研究課題ではNCP内で独自に導入・醸成されたこれら有用技術とバイオリソース・バンク、マウス行動解析ツールなどを各研究部で共有するプラットフォームを立ち上げ、数多くの疾患モデルを体系的に作出・解析することによって、各種精神神経筋疾患の統合的な病態解明とそれら診断、治療法の開発をめざした。

具体的には、バイオリソースから見出した疾患型の遺伝子欠損・変異・重複などを各種動物ゲノムへ導入することから、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、てんかん、Rett 症候群などの各種精神疾患、パーキンソン病などの各種神経変性疾患、遺伝性筋疾患を含む各種筋疾患の動物モデル作出を試み、得られたモデルを *in vitro*, *in vivo* で解析すると共に実際の疾患症例と照応することによって、各種疾患の病態解明と新規診断法の開発を模索し、これら疾患モデルの症状改善に有効な薬剤の体系的探索等を通して新たな治療法の開発につなげることを主要目的とした。さらには、これからの時代に対応するために、インシリコ解析・AI 解析をセンター内に広めるセミナーを行い、技術指導と共に共同研究を推進することや各研究部の優れた人材の相互理解と共同研究の推進のための交流の機会を高頻度で持つことも目標に掲げ、研究目的の達成を後押しすることとした。

### 2. 研究組織

#### 主任研究者

星野 幹雄 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・病態生化学研究部)

#### 分担研究者

井上 高良 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第六部)

野口 悟 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第一部)

山田 光彦 (国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所・精神薬理研究部)

株田 智弘 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第四部)

若月 修二 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第五部)

鈴木 友子 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部)

青木 吉嗣 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部)

大木 伸司 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・免疫研究部)

飯田 有俊 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・MGC 臨床ゲノム解析部)

村松里衣子 (国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・神経薬理研究部)

永井 義隆 (大阪大学大学院医学系研究科 神経難病認知症探索治療学寄附講座 ~2020/12/31、近畿大学医学部 脳神経内科 2021/1/1~)

中島 欽一 (九州大学大学院医学研究院 応用幹細胞医科学部門)

内匠 透 (神戸大学大学院医学研究科)

山田 真弓 (京都大学大学院生命科学研究科)

大川 恭行 (九州大学 生体防御医学研究所)

#### 研究協力者

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所  
(病態生化学研究部)

田谷 真一郎・堀 啓・大輪 智雄・有村 奈利子・嶋岡 可純・宮下 聡・橋詰 晃一・足立 透真・白石 棕

(疾病研究第一部)

林 晋一郎・斎藤 良彦・小笠原 真志・尾崎 文美・大久保 真理子

**(疾病研究第四部)**

株田 千華

**(疾病研究第五部)**

荒木 敏之・大野 萌馨

**(疾病研究第六部)**

井上 由紀子・平賀 孔

**(免疫研究部)**

Ben Raveney・張 晨陽・佐藤 和貴郎

**(遺伝子疾患治療研究部)**

野上 健一郎・竹村 英子・丸山 友輔

**(MGC)**

後藤 雄一

国立精神神経医療研究センター・精神保健研究所

**(精神薬理研究部)**

三輪 秀樹・古家 宏樹・國石 洋・小林 桃子  
大阪大学大学院医学系研究員

武内 敏秀・上山 盛夫・田港 朝也・三輪 隆志・吉川 碧

東京都医学総合研究所

鈴木 マリ

九州大学大学院医学研究院

中嶋 秀行

### 3. 研究成果

#### 1. バイオリソース・技術開発研究・動物行動解析プラットフォームの提供

(1) CRISPR/Cas9に基づくゲノム編集技術や細菌人工染色体(BAC) 改変・修飾技術を用いた疾患モデルマウスの作出(3年間で遺伝子改変マウス118系統を作出完了)と解析基盤(NCNP内の網羅的動物行動解析実験の基盤整備も含む)のアップデートを進めた(井上高)。(2)NCNPの各種バイオリソースを利活用し、精神・神経・筋疾患の新規原因遺伝子単離とそれら病態カスケードの解明に向けた網羅的解析を行った(飯田)。(3)ごく少数の細胞集団から各種エピゲノム情報を取得可能な画期的手法を開発し、神経系機能獲得に関わるクロマチン構造動態の解明を進めた(大川)。(4)RNA-seq等のビッグデータ解析基盤を新たに構築し、NCNP内で共有可能とする利活用体制を整備した(星野)。(5)センター内で各研究部が独立に保有していた動物行動解析装置を統合し、行動解析バッテリーを含む多様な行動解析を行えるようにした(山田)。

#### 2. 精神疾患研究

(5) 精神疾患関連遺伝子 AUTS2 およびイハラてん

かんラットの原因遺伝子 DSCAML1 の各種疾患型変異導入マウスを用いた解析(星野)、(6)統合失調症のGABA仮説に基づく各種モデルマウス作出を新規医薬品・医療機器開発のための非臨床試験につなげる研究(山田光)、(7)オートファジーによるRNA/DNA分解系関連遺伝子を破壊したマウス個体の病理解明(株田)、(8)MeCP2の標的miRNA発現を操作したマウスの解析に基づく Rett 症候群病理の解明(中島)、(9)ヒトゲノム解析で得られた自閉症関連コピー数多型や遺伝子変異を細胞やマウス個体に導入解析する研究(内匠)、を進めた。

**3. 神経疾患研究** (10)リボスクレオ蛋白複合体 Vault の神経細胞における機能解析を通して神経回路の形成と維持、変容の分子基盤に迫る基礎研究(若月)、(11)免疫応答異常が原因の中樞神経系難治性疾患のうち自己反応性T細胞が関わる病態マウスモデルの作出とその診断・治療法の開発(大木)、(12)神経回路を修復するメカニズムの探索から神経変性疾患の新規治療薬開発を行う研究(村松)、(13)ショウジョウバエにおけるゲノム編集技術の開発と、それを用いたポリグルタミン病発症の病理解明を目指す研究(永井)、(14)マウス成体脳における神経細胞新生を支える分子カスケードの解明から新生過程を外因性に制御可能なシステム開発をめざす研究(山田真)、を推進した。

**4. 筋疾患研究** (15)ゲノム編集技術により患者変異を再現したマウスを体系的に作出し、多様な遺伝性筋疾患の分子病態解明をめざすのと同時にそれらモデルを用いて新規治療法開発につなげる研究(野口)、(16)生体内でジストロフィン遺伝子のエキソスキッピングを可視化する遺伝子操作マウスを作出し、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)に対する核酸医薬の網羅的スクリーニングに応用する研究(青木)、(17)DMD患者由来のiPS細胞から分化させた筋肉のCa<sup>2+</sup>ハンドリング特性を明らかにし、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を正常化して筋変性を抑える薬剤の探索を行う研究(鈴木)、を進めた。

#### 5. インシリコ解析・AI解析の普及と技術指導

(18)ビッグデータ解析セミナーを複数回行うとともに、それら解析技術を用いた支援や共同研究を数多く開始した(星野)。

#### 6. センター内研究員の相互理解、共同研究の推進

(19)サイエンスミーティングを開催し、それぞれの研究の相互理解と30以上の共同研究が進んだ。

令和2年12月10日 班会議開催 (Web 班会議)

## 分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集による精神疾患動物モデルの作出とその解析

(所 属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 病態生化学研究部

(氏 名) 星野 幹雄

### 緒言

*AUTS2* 遺伝子および *DSCAML1* 遺伝子 (イハラてんかんラットの原因遺伝子) はさまざまな精神疾患に関与する可能性が示唆されている。本研究では、ゲノム編集技術を用いてげっ歯類モデルを作成し、これらの遺伝子・蛋白質の果たす役割とその破綻による疾患病理の解明に努める。

### 方法

(i) 患者データベースから *DSCAML1* 遺伝子の変異をスクリーニングし、同定された遺伝子変異 (A2105T 変異 *Dscaml1*) と相同な変異を持つノックインマウスを作成、解析する。さらにそのマウスの表現型が改善する治療薬を探索する。

(ii) *Auts2* の終脳・小脳特異的 cKO マウスの表現型を解析する。特にシナプス形成について解析する。

### 結果と考察

(i) ゲノムシーケンスにより NCNP の発達障害を伴うてんかんデポジットリーから、*DSCAML1* 遺伝子の SNP を 30 種類以上同定し、その中で *in vitro* 解析により A2105T 型変異が細胞膜局在ができなくなり分子機能を失うことがわかった。そこで、相同変異を持つノックインマウスを作成したところ、イハラてんかんラットと同様な表現型と、ヒト疾患と矛盾がない脳波異常が検出された。以上から、この変異がヒトてんかん症例の原因となっていることが示唆された。この発見は論文として報告した (Hayse et al, *iScience* 2020)。また、A2105T 型変異は分子シャペロンでその細胞内局在と機能が回復することを培養細胞系で見出した。そのシャペロンを A2105T 変異型 *Dscaml1* ノックインマウスに経口投与したところ、表現型の改善が見られたことから、

シャペロンが治療薬として使える可能性が示された (投稿準備中)。

(ii) 終脳特異的な *Auts2* の cKO マウスの解析から、*AUTS2* タンパク質が興奮性シナプスの数の制限に働くこと、この破綻によって E/I バランスが崩れ、社会性行動にも異常をきたすことを発見し、論文として報告した (Hori et al, *iScience* 2020)。また、小脳特異的な cKO マウスの解析から、*AUTS2* が小脳プルキンエ細胞の成熟と、登上繊維シナプス、平行線維シナプスの発生に関与することを見出した。この機能を失うと、協調運動や社会性行動に異常をきたすことを見出し、論文として報告した (Yamashiro et al, *iScience* 2020)

### 結論

*DSCAML1* 遺伝子の異常によって引き起こされるヒトてんかんを初めて同定し、さらにその治療薬の可能性となる薬剤を同定した。*AUTS2* による終脳および小脳における機能と、その破綻による病態・精神疾患病理を明らかにした。

### 参考文献 (業績)

1. Yamashiro et al, *AUTS2* governs cerebellar development, Purkinje cell maturation, motor function and social communication. *iScience*, 2020, 23 (12): 101820.
2. Hayase et al, Down Syndrome Cell Adhesion Molecule Like-1 (*DSCAML1*) links the GABA system and seizure susceptibility. *Acta Neuropathologica Commun*, 2020, 8(1):206
3. Hori K et al, *AUTS2* regulation of synapses for proper synaptic inputs and social communication. *iScience*, 26;23 (6):101183, 2020
4. Arimura N et al, *DSCAM* regulates delamination of neurons in the developing midbrain. *Science Advances*, 2;6(36):eaba1693, 2020

## 分担研究報告書

(課題名) CRISPR/Cas9 および BAC システムを用いた病態モデルマウスの作出  
(所 属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 疾病研究第六部  
(氏 名) 井上 高良

### 緒言

精神・神経疾患に関わる網羅的ゲノム・エピゲノム情報の蓄積は近年飛躍的に進んだ一方、ゲノムの9割以上を占める遺伝子非コード領域の機能理解については解析技術基盤が未熟なため大きく立ち後れている。本研究では遺伝子非コード領域に多数存在するゲノム欠失変異や SNP の機能的意義を、独自に醸成した細菌人工染色体 (BAC) システムや CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術によって体系的に究明することを目的とする。また同技術基盤を班内で効率良く共有可能なプラットフォームの確立・維持をめざす。

### 方法

シナプス接着分子クラシックカドヘリン (Cdh) をはじめとした自閉症スペクトラム障害 (ASD) 関連遺伝子に着目し、それら遺伝子群そのものの機能やそれら遺伝子非コード領域に多数存在する ASD 関連 common variant 群の意義について、申請者固有の BAC を解析単位とした手法や CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて多因子性に操作し、ASD の実状に即した病態モデリングを試みる。

### 結果

*Cdh4/6/8/11* 遺伝子を様々な組み合わせでノックアウトした個体を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて作出することに成功し、初期脳・神経系構築過程に表現型を見出した (Hiraga et al., 2020)。また CRISPR/Cas9 法によるノックインマウス作製技術に関する総説を執筆する (井上 (上野) ら, 2019) とともに、同法を用いて Cdh その他の遺伝子発現を正確に可視化するエピトープタグノックインマウスを多数作出した (学会発表)。さらに BAC システムを利用して巨大遺伝子 *Cdh6/8* や *Autism susceptibility candidate gene 2* の非コード領域における転写制御機序を解析

した。なお、令和2年度においては新型コロナ感染症拡大による制限が多であったにもかかわらず、その他の班内共同研究も含め46系統の遺伝子操作マウス作出に成功し、本課題3年間のモデルマウス提供総計は118系統となった。

### 考察

ASD に関連する分子群を同時に複数ノックアウトしたり、様々なタグノックインによってそれら発現動態を可視化したり、それら遺伝子発現制御ダイナミクスを体系的にスクリーニングしたりする技術が確立したことによって、これまで以上に非コード領域の機能理解が深まることが期待されるのに加え、複雑な ASD 病態を初めてモデリング可能とする解析基盤が整ったといえる。

### 結論

本研究によって得られた成果と申請者独自技術や新規開発手法を効率的に組み合わせることにより、多因子性 ASD の実態を反映した病態モデリングが今後著しく進展することが見込まれる。また NCNP 内で遺伝子改変モデルマウスを機動的に作出可能なプラットフォームも確固たるものとなり、NCNP 内の統合的な研究進展につながることを期待される。

### 参考文献 (業績)

- Hiraga K, Inoue YU, Asami J, Hotta M, Morimoto Y, Tatsumoto S, Hoshino M, Go Y, Inoue T: Redundant type II cadherins define neuroepithelial cell states for cytoarchitectonic robustness. *Commun Biol*, 3, 574, 2020 年 10 月  
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01297-2>
- 井上 (上野) 由紀子, 森本由起, 井上高良: クローニングフリー CRISPR/Cas9 法によるノックインマウス作製術. *生体の科学 (医学書院)*, Vol. 70 No. 4 pp 350-356, 2019 年 8 月  
<https://doi.org/10.11477/mf.2425201012>

## 分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を応用した遺伝性筋疾患の診断、病態解析、治療法開発

(所属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 疾病研究第一部

(氏名) 野口 悟

### 緒言

これまで、劣性遺伝型脊髄小脳萎縮症の原因遺伝子として 24 遺伝子が単離され、それぞれの病態の特徴が解析され、発症に至るメカニズムの解明と治療法の開発が進められてきた。我々は、小脳萎縮、運動失調を呈する 2 家系 3 患者 (劣性遺伝家系) の全エクソーム解析を行い、新規遺伝子 X に両アレル性の複合ヘテロ接合変異を同定した。この遺伝子は、これまでいかなる疾患への関連も報告されていないものであった。本研究の目的は、我々が見出した遺伝子変異が、脊髄小脳萎縮症の新規原因遺伝子となりうるのかを証明するとともに、遺伝子産物の機能異常からもたらされる病態メカニズムを明らかにすることである。この研究により、脊髄小脳萎縮症の新たな原因、発症メカニズムと治療標的が明らかとなることが期待される。

### 方法

#### マウス

遺伝子 X 両アレル性変異複合ヘテロ接合性マウスを用いた。

Single cell RNA-seq (scRNA-seq)

6 日齢の遺伝子改変マウス、コントロールマウスの全小脳から単離した細胞群 (ともに 3 個体由来) の scRNA-seq を行った。

RNA-seq

6 日齢の遺伝子改変マウス、コントロールマウス (ともに N=3) の全小脳を用い、定法に従って RNA-seq を行った。

scRNA-seq の解析は Cell ranger、スプライシングの解析には MISO を用いた。

### 結果

脊髄小脳変性症患者にて新規原因遺伝子候補 (遺伝子 X) を同定し、ヒト患者で見出した遺伝子変異を導入した疾患モデルマウスを樹立した。同マウスにて運動失調の表現型を

観察するとともに、小脳の萎縮を認め、同定した変異が疾患の原因であることを確定した。同マウスの小脳発達における組織病理学的観察では、小脳発生期のプルキンエ細胞に著しい形態変化を観察するとともに、顆粒細胞数の減少を確認した。モデルマウス小脳のシングルセル RNASeq 解析では、小脳組織から 9 種類の異なる細胞種を同定した。プルキンエ細胞に最も広範な発現変化を認めるとともに、成長因子、サイトカインや成長因子遺伝子の発現減少を同定した。一方、小脳全体の RNASeq では広範な遺伝子のスプライシングパターンに質的、量的変化が生じていた。

### 考察

遺伝子 X のタンパク質産物の発現がプルキンエ細胞に強く認められた。このことから、同細胞が遺伝子 X の変異により最も強い影響を示す疾患標的細胞であり、同細胞からのサイトカインの分泌低下により、顆粒細胞の増殖/移動が 2 次的に影響を受けているものと考えられた。遺伝子 X 産物の機能として、スプライシングにかかわる分子の核内輸送にかかわることが報告されている。以上のことから、遺伝子 X の変異により、プルキンエ細胞にて、広範な遺伝子にスプライシング異常が引き起こされることで、同細胞の形態/機能変化を来し、その下流現象として顆粒細胞数の減少が引き起こされているものと考えられた。

### 結論

遺伝子 X の変異は小脳細胞の広範なスプライシング変化を引き起こすとともに、プルキンエ細胞、顆粒細胞に遺伝子発現変化を引き起こした。これにより小脳萎縮に至ると考えられた。

### 参考文献

1. Saito Y. et al. ADSSL1 myopathy is the most common nemaline myopathy in Japan with variable clinical features. *Neurology* 95, e1500-e1511, 2020.

## 分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を用いたモデル動物の新規医薬品・医療機器開発のための非臨床試験への応用可能性の検討

(所 属) 国立精神・神経医療研究センター  
精神保健研究所 精神薬理研究部

(氏 名) 山田 光彦

### 緒言

ゲノム編集技術を用いたモデル動物の非臨床試験への応用可能性について、統合失調症のGABA仮説に基づく新規病態モデルマウスをツールとして検討した。

### 方法

視床網様核におけるGABA伝達異常のノンレム睡眠スピンドル波発生への影響、小脳神経回路発達におけるGABAシグナルの役割について検討を進めた。また、統合失調症関連遺伝子glyoxalase1及びWDR3について検討を進めた。遺伝子組換え実験および動物実験は組み換えDNA実験安全倫理委員会、動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

### 結果

GAD67 flox マウスの視床網様核にAAV-Creをインジェクションして作製した視床網様核特異的GAD67欠損マウスにおいて、スピンドル波発生密度の減少および持続時間の減少を観察した。さらに、疾病研究第6部井上高良室長らと共同で、視床網様核特異的Creマウスの作製を進めた。一方、PV-GAD67 KOマウスは、ロタロッド試験において著しい協調運動機能の障害を示した。また組織学的解析により、カリウムチャンネルKv1.1の発現分布とバスケット細胞軸索走行の異常が観察された。また、スライス標本を用いた電気生理学的解析により、バスケット細胞-プルキンエ細胞間シナプス伝達について、連続する2回のシナプス刺激に対する応答比(paired pulse ratio)の異常が観察された(Miwa H, *Research Square*, 2020)。

統合失調症関連遺伝子glyoxalase1ヘテロ欠損マウスでは、PV陽性細胞の減少、オープンフィールド試験での過活動および新規物体認識時のガンマオシレーションパワーの異常を観察した(Hirai S, Miwa H et al. *bioRxiv*, 2020)。

WDR3遺伝子欠損マウス(WDR3-HKOマウス)をfloxedマウスの凍結精子を用いて作成した。

X-gal染色及び新たに作成したポリクローナル抗体を用いWDR3が海馬で高発現していることを明らかとした。

### 考察

統合失調症死後脳解析からGABA関連分子の異常が観察され、その中でもパルブアルブミン陽性細胞においてGABA合成酵素であるGAD67の発現低下が報告されている。本研究では、PV-GAD67 KOマウスにおいて、海馬歯状回顆粒細胞の未成熟化が観察したことから、「GABA関連分子・シグナル」を標的とした臨床試験への応用を示唆するものである。

統合失調症関連遺伝子glyoxalase1ヘテロ欠損マウスを用いた研究の結果より、ショ糖含有食の過剰摂取は統合失調症発症の環境要因としてのリスクファクターである可能性を示唆することができた(Hirai S, Miwa H et al. *bioRxiv*, 2020)。

一方、WDR3遺伝子は、NMDA型グルタミン酸受容体遮断薬であるphencyclidine及びドーパミン作動薬であるmethamphetamineの双方に応答を示して、ラット脳内で発現量の上昇が認められた遺伝子である。本研究により、WDR3が海馬で高発現していることが明らかとなったことから、WDR3が認知機能に関連している可能性が示唆された。

今後は、統合失調症の症状である幻覚・幻聴や認知機能障害を評価できる行動実験の確立が急務と考える。

### 結論

研究班のさらなる連携により、ゲノム編集技術を用いたモデル動物の新規医薬品・医療機器開発のための非臨床試験への応用研究の進展が強く期待される。

### 参考文献(業績)

1. Hirai S, Miwa H, et al. Brain Angiopathy and Impaired Glucose Metabolism in Model Mice with Psychiatric-Related Phenotypes. *bioRxiv*.  
<https://doi.org/10.1101/2020.02.14.939546>
2. Miwa H, Kobayashi K, Hirai S, Yamada M, Watanabe M, Okado H, Yanagawa Y. Roles of GABA Signaling in Directing Basket Cell Axonal Projections Toward Purkinje Cells in the Cerebellum. *Research Square*.  
<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-95440/v1>

## 分担研究報告書

(課題名) リソソーム分解系の分子機構と疾患との関連

(所 属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 疾病研究第四部

(氏 名) 株田 智弘

### 緒言

細胞内成分の適切な分解は神経細胞を含む多くの細胞・組織の恒常性維持に必須のプロセスである。神経細胞内のタンパク質やRNAの蓄積は神経変性疾患の原因となると考えられている。細胞内異常 RNA やタンパク質の分解促進をできれば、有効な治療法となり得ると期待されている。そのためには細胞内分解システムの理解が必要であるが、RNA 分解機構をはじめ細胞内分解機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。我々は近年、新たな細胞内核酸分解システム

RNautophagy/DNautophagy (RDA)を見いだした。また RDA における核酸輸送体として SIDT2 を見いだした。本研究では、RDA のメカニズム解析を行うとともに、ゲノム編集技術などを用いて RDA の機能減弱動物や機能活性化動物を作製・解析する。以上により脳神経系における RDA の生理的役割を明らかにする。さらに、現在タンパク質を分解する新規経路も発見しており、この経路のメカニズムと生理的意義についても解明を目指す。

### 方法

培養細胞および単離リソソームを用いて実験を行なった。また、班内共同研究によりゲノム編集技術を用いて SIDT2 KO マウスを作出・解析した。

### 結果

RDA に続き、「タンパク質が ATP 依存的に直接リソソームに取り込まれ分解される」という新規経路を発見した。また、この経路において、SIDT2 はタンパク質をリソソーム内に輸送することも見いだした。基質に関しては、 $\alpha$ -synuclein や Tau など神経変性疾患の原因となるタンパク質を含む多様な細胞質タンパク質が新規経路によって分解された。班内の共同研究により、SIDT2 を原因とするヒト疾

患を機関内の whole exome sequencing data から探索し、「ニューロパチーおよび縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー」の家系とその患者から、新たに SIDT2 変異を見いだした。生化学実験により、この変異は dominant negative 変異であることを示した。また、SIDT2 KO マウスを解析し、筋萎縮と縁取り空胞を確認することができた。以上、SIDT2 を介した細胞内分解系の破綻は protein aggregation disease の原因となることを示した。

### 考察・結論

タンパク質が直接的にリソソームに取り込まれ分解されるという新規のオートファジー経路を発見した。この経路に重要なリソソーム膜タンパク質 SIDT2 を同定した。

### 参考文献 (業績)

1. Hirayama K, Fujiwara Y, Terada T, Shimizu K, Wada K, \*Kabuta T. Virtual screening identification of novel chemical inhibitors for aberrant interactions between pathogenic mutant SOD1 and tubulin. *Neurochem Int.* 2019; 126: 19-26.
2. Hase K, Contu VR, Kabuta C, Sakai R, Takahashi M, Kataoka N, Hakuno F, Takahashi SI, Fujiwara Y, Wada K, \*Kabuta T. Cytosolic domain of SIDT2 carries an arginine-rich motif that binds to RNA/DNA and is important for the direct transport of nucleic acids into lysosomes. *Autophagy.* 2020; 16(11): 1974-1988.

## 分担研究報告書

(課題名) イオン恒常性の破綻による精神・神経疾患発病機構の解明  
(所属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 疾病研究第五部  
(氏名) 若月 修二

### 緒言

アルツハイマー病などの神経変性疾患、自閉症などの精神疾患患者の脳では、神経ネットワークの破綻が発病の主因である可能性が指摘されており、神経ネットワークの形成と維持、変容の分子基盤を明らかにすることは、疾患発病の分子機構を理解し、予防や治療の手がかりを得る上でも極めて重要である。本研究では、神経突起の変容機構に着目し、神経ネットワークの形成と維持、破綻におけるさまざまな細胞内反応の寄与を総合的に評価することにより、精神・神経疾患発病の新しい分子基盤を解明することを目的とする。

### 方法と結果

昨年度に引き続いて、本年度はリボヌクレオ蛋白複合体 Vault の主要構成成分である vault RNA (vRNA) の神経細胞における機能解析を、主に初代培養細胞を用いたシナプス形成の培養モデルなどにより検討した。

vtRNA が神経細胞のどのような細胞内反応の制御に関わるのかを探るため、培養神経細胞に vtRNA を過剰発現させて、各種細胞内反応の活性化状態を調べたところ、MAPK

(mitogen activated protein kinase) の一種である ERK が活性化され、かつシナプス形成が促進されることがわかった。vtRNA による ERK の活性調節を *in vitro* リン酸化アッセイにより検討したところ、ERK の制御酵素である MEK1 (mitogen-activated protein kinase kinase 1) に vtRNA が直接結合して活性化することで、ERK が活性化されることがわかった。これらの結果は、vtRNA による ERK シグナル制御機構の存在を示唆するとともに、シナプス形成の新しい制御機構を提示した。

### 結論と考察

シナプス形成において MAPK シグナリング経路は、樹状突起での局所蛋白質合成、樹状突

起スパインの形成と安定化など、幅広く重要な役割を担う。シナプス形成において MAPK シグナリング経路がどのように活性調節されるのか、その正確なメカニズムはこれまで解明されていなかったが、本研究により、vtRNA が MAPK シグナリング経路を活性化し、シナプス形成を調節する可能性が強く示唆された。近年、MAPK が学習と記憶などの脳の高次機能の調節に必要なこと、vtRNA の発現調節の異常が知的障害などの神経発達障害の発症と関連性があること、なども報告されている。今後、この研究結果を土台として、新たな作用機序に基づく神経発達障害の治療法の開発につなげたい。

### 参考文献 (業績)

1. [Wakatsuki S.](#), Takahashi Y., Shibata M., Adachi N., Numakawa T., Kunugi H., and Araki T. Small non-coding vault RNA modulates synapse formation by amplifying MAPK signaling. *J Cell Biol.* (2021) 220: e201911078.
2. [Wakatsuki S.](#), Ohno M., and Araki T. Human vault RNA1-1, but not vault RNA2-1, modulates synaptogenesis. *Commun. Integr. Biol.* (2021) 14: 61-65.
3. Klionsky DJ, et al. (Wakatsuki S as co-authors) Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (4th edition). *Autophagy.* (2021) 17: 1-382.

## 分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を用いた骨格筋の Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシス制御因子の解明

(所属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

(氏名) 鈴木 友子

### 緒言

Duchenne muscular dystrophy (DMD)では、骨格筋線維の形質膜直下のジストロフィンが欠損することで、膜が脆弱になり、筋収縮により膜が破綻し、細胞外からカルシウム (Ca<sup>2+</sup>) が細胞内に流入する。更に筋小胞体 (SR) のリアノジンレセプターが leaky になることや、Ca<sup>2+</sup> を SR に取り込むポンプである主要な sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) の活性低下により、細胞質内 Ca<sup>2+</sup> 濃度が恒常的に上昇する。その結果、Ca<sup>2+</sup> 依存性のプロテアーゼの活性化、ミトコンドリア機能低下、酸化ストレスが引き起こされ、筋線維が変性・壊死すると考えられている

(Nogami et al., 2020)。本年度は SERCA を薬剤で活性化することで、DMD モデルマウスである mdx マウスの筋変性・壊死を抑えることを明らかにし、そのメカニズムを調べた。

### 方法

・アロステリックな SERCA 活性化剤である CDN1163 を mdx マウスの腹腔内へ連続投与し、血清 CK 値、Grip テスト、treadmill を用いた走行テスト、エバンスブルー色素 (EBD) の筋線維内取り込み、単離筋の筋収縮力測定、中心核線維の計測、シリウスレッド染色等を行った。

・CDN1163 投与後、骨格筋からミトコンドリアを単離し、酸素消費量と ROS 産生量を測定した。

・CDN1163 投与群と非投与群、及び野生型マウス (C57BL/6) の前脛骨筋の遺伝子発現を RNA-seq で解析した。

### 結果

・CDN1163 を mdx マウスへ連続投与したところ、骨格筋における SERCA の発現量には変化がなかったが、活性が 50% 程度上昇していた。

・CDN1163 投与により、血清 CK 値が低下し、

筋収縮力が改善していた。筋収縮力の改善は野生型マウスでも見られた。

・CDN1163 投与により、ミトコンドリアの酸素消費速度が上がり、ROS 産生とミトコンドリアの膨張が抑えられるなど、機能に改善がみられた。

・通常、treadmill で強制的走行させた後の mdx 筋では、EBD の筋線維内への取り込みの上昇が認められる。CDN1163 投与により EBD の取り込みが有意に抑えられた。

・CDN1163 投与による遺伝子発現の変化は軽微であった。

・以上の結果を国際誌に発表した (Nogami et al., 2021)

### 考察

SERCA 活性化剤は mdx マウスの筋変性・壊死を抑制し、筋収縮力を改善した。細胞質内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が正常化したことによるミトコンドリアの機能回復が要因と考えられた。

### 結論

SERCA 活性化剤は mdx マウスの筋変性を抑制し、筋収縮力を改善した。薬剤による SERCA の活性化が DMD の治療法として有効であることが示唆された。今後は低用量で筋変死を抑制し、かつ副作用が少なく長期に投与できる新規 SERCA 活性化剤をスクリーニングし、薬剤の開発を行う。

### 参考文献

1. Nogami K, et al. iNOS is not responsible for RyR1 S-nitrosylation in mdx mice with truncated dystrophin. *BMC Musculoskeletal Disord.* 21:479. 2020.
2. Nogami K, et al. Pharmacological activation of SERCA ameliorates dystrophic phenotypes in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet* 2021 Online ahead of print.

## 分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を用いたモデル動物作出による精神神経筋疾患の病態解明

(所属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 遺伝子疾患治療研究部

(氏名) 青木 吉嗣

### 緒言

筋ジストロフィーを対象に蓄積された核酸医薬開発基盤を他の難治性神経・筋疾患に応用するには、効率的かつ簡便な核酸配列のスクリーニングおよび薬物動態の評価が必要である。本研究の目的は、EGFP 蛍光により非侵襲的にエクソン・スキップの誘導効果の評価可能な新規トランスジェニック (Tg) マウスを対象に、リアルタイム *in vivo* イメージングシステムを用いて、アンチセンス核酸医薬の薬効・薬理を詳細に検討することである。EGFP-Tg マウスの作出は井上高良先生と共同実施する。

### 方法

EGFP コード領域を、ジストロフィンエクソン/イントロンゲノム配列で分断し、モルフォリノ化合物を添加してエクソン・スキップが起こった時のみ EGFP 蛍光が表出されるような新規ベクターを設計および構築する。EGFP レポーターを筋細胞に導入し、エクソン・スキップの誘導効果をプレートリーダーで評価するアッセイ系を確立する。更に、EGFP レポーターを用いた Tg マウスを新規作出し、*in vivo* イメージングシステムの使用により、エクソン・スキップの薬効・薬理を簡便に評価可能なアッセイ系を確立する。

### 結果

発現ベクター上の EGFP コード領域を、ジストロフィンエクソン/イントロンゲノム配列で分断し、エクソン・スキップの誘導により、高感度に EGFP シグナルを検出可能な pCAGGS-EGFP を構築した。EGFP レポーターを筋細胞に導入し、エクソン・スキップの誘導効果をプレートリーダーで評価するアッセイ系を確立した。EGFP レポーターを用いたトランスジェニックマウスを新規作製した。IVIS *in*

*vivo* イメージングシステムの使用により、エクソン・スキップの薬効・薬理を簡便に評価可能なアッセイ系の予備検討を行った。pCAGGS-EGFP レポーター・トランスジェニックマウスを対象に、IVIS *in vivo* イメージングシステムの使用により、エクソン・スキップの薬効・薬理を簡便に評価可能なアッセイ系を確立し、成果を論文化した。

### 考察

EGFP は蛍光波長が短く *in vivo* イメージングの際の生体アーチファクトが課題である。課題克服には、ホタルルシフェラーゼを使ったレポーター Tg マウスが有用な可能性がある。

### 結論

pCAGGS-EGFP レポーター・トランスジェニックマウスを作出し、アンチセンス核酸医薬の薬効・薬理を詳細に検討することに成功した。

### 成果物：欧文原著

1. Hara Y, et al. Novel EGFP reporter cell and mouse models for sensitive imaging and quantification of exon skipping. *Scientific reports*, 2020 (PMID: 32572084).

## 分担研究報告書

(課題名) 中枢神経系の自己免疫疾患に関わる病原性 T 細胞の性状解析

(所 属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 疾病研究第六部

(氏 名) 大木 伸司

### 緒言

中枢神経疾患の中には、免疫異常に起因する一群の難治性疾患が存在する。病原性 T 細胞が主導する多発性硬化症 (MS) の病態解明や治療薬開発が進む一方で、自己免疫性脳炎などの自己抗体依存性疾患の病態制御法はあまり進んでおらず、全身性の自己免疫疾患である膠原病と同様、ステロイドや免疫抑制剤などの非特異的治療が主体である。我々は、MS の動物モデルである実験的自己免疫性能脊髄炎 (EAE) において、T 細胞特異的な NR4A2 遺伝子欠損により、自己抗原反応性の T 細胞応答が有意に低下することを見出している。本研究では、自己反応性 T 細胞を標的とした自己抗体依存性疾患の病態制御法の確立を目指し、膠原病様病態を自然発症するモデルマウスを用いた解析を行う。発症と連動して変化する自己反応性 T 細胞の性状解析を進め、同細胞を標的とした治療法の確立を目指す。

### 方法

・ BXSB-Yaa マウス背景の NR4A2cK0 マウスの作製 ; B6 背景の NR4A2cK0 マウスを、膠原病様病態を自然発症する BXSB-Yaa マウスに戻し交配し、BXSB-Yaa マウス背景の NR4A2cK0 マウスを樹立した。NR4A2cK0 マウスと対照マウスの間、膠原病様病態の発症を比較解析した。

・ 発症と連動する自己反応性 T 細胞の性状解析 ; 血清中の自己抗体産生を、ELISA やビーズサスペンションアレイを用いて定量し、膠原病病態の発症の指標とした。発症前後に脾臓やリンパ節で増加する T 細胞の表面分子の発現変動を、フローサイトメーターを用いて解析し、必要に応じてソーティングした細胞の定量遺伝子発現比較と機能解析を行った。

・ 自己反応性 T 細胞標的治療の膠原病様病態改善効果 : 自己反応性 T 細胞のサロゲートマ

ーカーを標的とした治療的介入による、膠原病様病態の改善効果を、上記の様々なパラメーターを指標として解析、評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては、NCNP 内の動物実験倫理問題検討委員会の承認を得て実施した。ヒト試料を用いた研究を実施するために、被験者より書面による説明と同意確認 (インフォームドコンセント) を取り、NCNP 内の倫理委員会の承認を得た上で、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に沿って進めた。

### 結果

・ BXSB-Yaa マウス背景の NR4A2cK0 マウスの病態解析 ; 発症に伴う脾臓やリンパ節の腫大、血清中の IgG 抗体価と抗核抗体価の増加が、NR4A2cK0 マウスでは有意に抑制されていた。一方、同マウスの外来抗原に対する液性免疫は維持されており、NR4A2 が自己反応性 T 細胞の機能を選択的に制御している可能性が示された。

・ 自己反応性 T 細胞のサロゲートマーカーの同定 ; 発症前後の膠原病様病態を自然発症する BXSB-Yaa 背景の同マウスの NR4A2cK0 マウスの脾臓、およびリンパ節で選択的に増加する T 細胞群の性状解析を進め、自己反応性 T 細胞の新規サロゲートマーカーとして、Nrp1-1 と PD-1 を同定した。発症に伴う Nrp1-1/PD-1 陽性 T 細胞の著しい増加を確認し、サブセット解析を行なった。

・ 自己反応性 T 細胞標的治療の膠原病様病態の改善 : Nrp-1 を標的としたペプチド性製剤を用いて、自己反応性 T 細胞を標的とした治療を行なった結果、脾臓とリンパ節の腫大、および血清中の IgG 抗体価と抗核抗体価が有意に低下した。治療後の個体では、脾臓、およびリンパ節における Nrp1-1/PD-1 陽性 T 細胞の顕著な減少が認められ、この治療介入が確かに自己反応性 T 細胞を標的としていることが確認された。

### 考察

膠原病を中心とした自己抗体依存性疾患では、いまだにステロイドや免疫抑制剤による治療が主流であり、多くの患者はこれらの古典的治療が潜在的に有する多く副作用に苦し

んでいる。最近になり、膠原病を中心とした自己抗体依存性疾患に対する、B細胞標的治療が導入されつつあるが、まだその効果は限定的であり、再発の完全な予防は実現できていない。今回、Nrp-1に作用するペプチド性製剤を用いた自己反応性T細胞標的治療により、自己抗体依存性疾患の選択的な病態制御が可能であることが初めて示された。本研究が提示する自己反応性T細胞標的治療法は、疾患に関わる自己抗原の同定が不要な画期的なアプローチに基づいている。これを例えば上記のB細胞標的治療法と併用することにより、副作用がより少なく、患者をより長期の寛解に導く画期的な治療法の可能性が開かれた。

## 結論

自己反応性T細胞の新規サロゲートマーカーを同定し、同細胞を標的とした新しい自己反応性T細胞標的治療により、病態改善効果を得た。これまでにない自己抗体依存性疾患の、画期的な治療法の可能性が開かれた。

## 参考文献

なし

## 分担研究報告書

(課題名) 精神・神経筋疾患バイオリソースと臨床ゲノム情報解析による新規原因遺伝子の探索

(所 属) 国立精神・神経医療研究センター  
メディカル・ゲノムセンター 臨床ゲノム解析部

(氏 名) 飯田 有俊

### 緒言

本研究の目的は、(1) 新しい遺伝子診断法の開発や臨床応用を目指して、精神・神経筋疾患の原因遺伝子を単離すること、(2) 病態カスケードの解明を目指して、バリエーション情報の支援を行うことである。

### 方法

検体は、主に NCNP で保存、管理している疾患患者由来の核酸を用いた。方法は、疾患ゲノム解析法を用いた。ゲノム解析パイプライン、疾患遺伝子データベースは、MGC に構築して使用した。本研究は、NCNP 倫理委員会にて承認されている。本研究では、疾患ゲノムデータを用いたインフォマティクス解析を行い、候補遺伝子(変異)を発見した。

### 結果

(1) 眼咽頭遠位型ミオパチー(OPDM)に於ける2つの新規原因遺伝子(*GIPC1*と*NOTCH2NLC*)の発見を報告した。OPDMは、常染色体優性遺伝形式を呈する筋疾患である。主な臨床像は、進行性の遠位筋の筋力低下、眼瞼下垂などである。

2019年に最初の原因遺伝子*LRP12*が報告された。我々は、2020年度に第二、第三の原因遺伝子となる*GIPC1*と*NOTCH2NLC*を報告した。3遺伝子とも5' UTR領域にあるCGGリピートの異常伸長が共通の病因メカニズムであることがわかった。

(2) 小児発症型進行性ミオパチーの新規原因遺伝子*UNC-45B*を発見し、国際共同研究コンソーシアムとして報告した。

なお、これらの研究は、神経研究所、NCNP病院、国内外の研究施設、医療機関との共同研究による成果である。

### 考察

今年度、2つの疾患から新規原因遺伝子を3種類報告した。変異情報を当研究班と共有することによって研究が効率的に進んだ。

### 結論

MGCで管理する精神・神経筋疾患の生体試料を用いて、新規原因遺伝子の変異と臨床像の相関研究等を行い、新しい疾患概念を確立した。

### 参考文献 (2020年度掲載分、抜粋)

1. Abe-Hatano C, **Iida A**, *et al.* Whole genome sequencing of 45 Japanese patients with intellectual disability, *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 2021 Feb 24. doi:10.1002/ajmg.a.62138.
2. Donkervoort S, Kutzner CE, *et al.* Pathogenic Variants in the Myosin Chaperone UNC-45B Cause Progressive Myopathy with Eccentric Cores. *American Journal of Human Genetics*, 2020 Dec 3;107, 1078-1095.
3. Ogasawara M, **Iida A**, *et al.* CGG expansion in NOTCH2NLC is associated with oculopharyngodistal myopathy with neurological manifestations. *Acta Neuropathologica Communications*,  
上記以外に、6報の英文原著論文が国際専門誌に掲載中である。

## 分担研究報告書

(課題名) 神経回路の修復に関わる分子機構の解明

(所属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 神経薬理研究部

(氏名) 村松 里衣子

### 緒言

種々の要因により脳と脊髄からなる中枢神経系が傷つくと、傷ついた部位に応じて様々な神経機能障害があらわれる。病巣では、たとえ神経細胞死を免れたとしても神経回路が破綻する様子が観察される。破綻した神経回路を修復させることで症状の緩和が期待されるが、現時点で神経回路の修復薬はない。

個体発生期の神経回路形成や末梢神経系の神経修復と比較すると、成体での脳神経回路の自発的な修復力は弱い。しかし、疾患の種類や個人差はあるものの、わずかではあるが神経回路は自然に修復する。本研究は、成体脳に残されている神経回路の修復力に着目し、どのように神経回路の修復力が維持されているか、またその機序を賦活化することで神経回路の修復力が高まるかを検討することを目的とする。

神経回路の修復は、内因性と外因性の機序で制御される。外因性の機序については、中枢神経系に備わる分子の機能解析という形で、神経回路の修復への作用が報告されている。一方で、内因性の機序については、広く細胞の発達と関連するメカニズム(cAMP 量の変動や微小管重合)の神経回路修復に対する作用を検討するものが主流で、神経細胞に特化した分子発現に着目した知見は乏しい。一般的な話として、細胞の機能変化には細胞種特異性が備わることがしられるため、本研究では脳の神経細胞に発現が豊富な分子に着目し、その分子の中に神経回路の修復を制御する作用をもつものが含まれるという仮説のもと検討を行った。

### 方法

本研究では、マウスの実験での検討の際に脊髄損傷モデルを扱うこと、また行動評価系としては脊髄損傷に伴う運動機能障害を評価することを目的としていたため、“motor

dysfunction”の症状を呈する現象とリンクする遺伝子を公開データベースより抽出し、その中から脳で高発現する遺伝子、さらに神経細胞で高発現する遺伝子を絞り込み、その上位 20 遺伝子に対する siRNA を導入した神経細胞の形態学的な解析を *in vitro* で行った。候補遺伝子の一部に対する siRNA を導入した細胞では、神経突起の伸長が阻害された。同処置を施した細胞で、細胞死は観察されず、候補遺伝子の一部が神経突起の自発的な伸長促進作用の維持を担うものであることが示唆された。

候補とした分子の中で、Syt4 遺伝子について成体マウス内での発現様式を解析した。これまでに正常な成体マウスにおいては、全臓器のうち脳で候補分子の mRNA レベルが最も高く、またマウス脳切片での組織染色により、大脳皮質の第五層、運動野における NeuN 陽性細胞に豊富である様子を検出しているが、既報では、培養グリア細胞でも Syt4 が発現すると知られるため、アストロサイトやオリゴデンドロサイトの共染色を実施するため、各細胞の染色条件を確立した。

Syt4 の *in vivo* での機能解析のため、脊髄損傷マウスに対して同遺伝子に対する shRNA を導入する手法の確立し、行動変化を経時的に観察している。現時点で、受傷直後のスコアに Syt4 発現抑制群と対照群に差はなく、時間経過に伴う症状の自然回復が Syt4 発現抑制群では低下する傾向を得ている。

### 考察

同定した遺伝子の発現が、傷害時と正常状態で異なるかなど詳細な解析を進め、神経回路の修復を制御する新しい分子としての意義を確立し、知的財産の獲得を通じて、神経回路修復薬の開発へつなげていきたい。

### 結論

神経回路の修復を制御する可能性を持つ候補分子を見出した。

### 参考文献

なし

## 分担研究報告書

(課題名) ハイスループット *in vivo* 病態解析・創薬に向けた神経疾患モデルショウジョウバエバンクの構築

(所 属) 大阪大学大学院医学系研究科  
神経難病認知症探索治療学寄附講座  
近畿大学医学部脳神経内科

(氏 名) 永井 義隆

### 緒言

アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、ポリグルタミン病など多くの難治性神経疾患において遺伝子レベルの異常が明らかになり、病態解明・治療法開発を目指した研究が進んでいる。しかし、マウスなどの哺乳類モデルを用いた解析には膨大な労力・時間・経費を要することから、より迅速で簡便に解析が可能な動物モデルが必要とされている。そこで、本研究ではハイスループット解析に適するショウジョウバエに着目して、1) 様々な神経疾患モデルショウジョウバエのバンクを構築し、広く一般ユーザーへ公開して全国的な共同研究を展開する。また、2) 疾患モデルショウジョウバエを用いて、神経疾患病態解析および治療研究を推進する。

今年度は、家族性 ALS の最も多い原因遺伝子変異 (C9-ALS) である *C9orf72* 遺伝子非翻訳領域内の GGGGCC リピート配列の異常伸長が引き起こす神経変性メカニズムを解明することを目的として、ショウジョウバエモデルを用いて研究を行った。

### 方法・結果・考察

昨年度までに樹立した異常伸長 GGGGCC リピートを発現する C9-ALS ショウジョウバエモデルを用いて、候補遺伝子スクリーニングを行った。スクリーニング候補として GGGGCC リピート RNA に結合する RNA 結合タンパク質 (RNA binding protein: RBP) に着目した。交配により異常伸長鎖 (50 もしくは 89 リピート) と候補 RBP を共に複眼に発現させ、複眼変性に対する modifier 効果を指標にスクリーニングを行った。その結果、50 および 89 リピートの両系統で複眼変性の改善が認められる 3 つの RBP を同定した。リアルタイム PCR

でリピート RNA の発現量を定量したところ、2 つの RBP では発現量が減少していたが、1 つの RBP (RBP1) は発現量に変化がないことが判明した。

次に、RBP1 の RNA foci 形成とリピート関連非 ATG 依存性翻訳 (RAN 翻訳) によるジペプチドリピート (DPR) の産生への効果を調べた。その結果、RBP1 の共発現により RNA foci の形成および DPR 産生が減少することが明らかになった。

### 結論

以上の結果から、RBP1 は GGGGCC リピート RAN に結合し、その発現量を減少させることなく RAN 翻訳を抑制し、複眼変性を抑制すると考えられた。

### 参考文献 (業績)

論文投稿中

## 分担研究報告書

(課題名) レット症候群関連 miRNA モデルマウスの分子病態解明

(所属) 九州大学大学院医学研究院 応用幹細胞医科学部門

(氏名) 中島 欽一

### 緒言

MeCP2 遺伝子変異は、Rett 症候群 (RTT) をはじめ、自閉症など種々の発達障害・神経疾患への関与が示唆されているが、発症機序の詳細は不明である。これまで、MeCP2 はニューロン成熟に関与するとされてきたが、近年神経幹細胞の運命決定への関与が明らかとなっている。これまでに我々はマウス神経幹細胞において、MeCP2 が miR-199a を介して神経幹細胞のニューロンへの分化を促進し、アストロサイトへの分化を抑制することを明らかにしてきた。そこで、ここでは RTT 患者由来 iPS 細胞から脳オルガノイドを作製し神経幹細胞の分化傾向を検討した。

### 方法

RTT 患者由来 iPS 細胞から脳オルガノイドを作製し神経幹細胞の分化に異常がみられるかについて解析を行った。また、我々は MeCP2 欠損マウス脳では BMP シグナル下流転写因子 Smad1 の発現が増加し、BMP シグナルが亢進していることを見出していた。そこで RTT 患者由来脳オルガノイドに BMP シグナル阻害剤を添加し異常な神経幹細胞の分化が改善するかどうかについて検討した。

### 結果

RTT 患者由来脳オルガノイドは正常の脳オルガノイドと比較し、ニューロンへの分化が減少し、アストロサイトへの分化が増加していることが明らかとなった。また、BMP シグナル阻害剤を添加することで異常な神経幹細胞の分化を改善できることがわかった。

### 考察

本研究により、RTT 患者脳でも神経幹細胞の分化に異常が起きている可能性が示唆された。MeCP2 欠損アストロサイトは非自律的にニューロンの正常な樹状突起形成を阻害する

ことが報告されている。そのため、RTT 患者脳では神経幹細胞の分化異常により増加したアストロサイトがニューロンの樹状突起形成をさらに阻害している可能性が考えられた。

### 結論

本研究成果は、これまでほぼ接点のない発達障害・精神疾患と miRNA 生合成制御とを結びつけた独創的な試みとして位置づけられ、miRNA 生合成調節の破綻により神経発達障害が誘発される可能性が示唆された。

### 参考文献 (業績)

1. Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Imamura T, Trujillo C, Ishizu M, Uesaka M, Pan, M, Noguchi H, Okada K, Aoyagi K, Anodoh-Noda T, Okano H, Muotri A & Nakashima K: MeCP2 controls neural stem cell fate specification through miR-199a-mediated inhibition of BMP-Smad signaling. *Cell Reports*, 2021. In press.

## 分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を用いた自閉症モデル研究

(所属) 神戸大学大学院医学研究科

(氏名) 内匠 透

### 緒言

我々は自閉症スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder, ASD) のモデル動物作製及びその解析による病態解明を目指す。具体的には、ヒト遺伝学的解析で発見した遺伝子変異を有するヒト変異体導入マウスを CRISPR/Cas9 法を用いて構築し、*in vitro*, *in vivo* で解析する。また、CRISPR/Cas9 法を用いて、染色体上の長い領域の欠失、重複等を可能にする「次世代」染色体工学を確立した。本次世代染色体工学を利用して、自閉症のコピー数多型 (copy number variation, CNV) の細胞モデルを構築する。

### 方法

アデノ随伴ウイルスベクターを用いて Ca イオンセンサー (GCaMP) をマウスの大脳島皮質に導入し、無顆粒島皮質 (AI) へ GRIN レンズを埋め込んだのちに、頭部に固定した微小蛍光顕微鏡を用いて、マウス自由行動下での Ca イメージングによる神経活動の記録を行った。

### 結果

ホームケージにて、9 匹のマウスから取得した神経細胞の細胞記録を解析したところ、社会的相互作用に相関して活動するソーシャル・オン (Social ON) 細胞と、反対に社会的相互作用を示さないときに活動するソーシャル・オフ (Social OFF) 細胞を同定した。全部で 737 個のニューロンのうち、ソーシャル・オン細胞が 22.8% (168 個)、ソーシャル・オフ細胞が 1.4% (10 個) であった。さらにソーシャル・オン細胞 168 個のうち、社会的相互作用がありマウスが静止しているときに活動する細胞が 60.1%、社会的相互作用しているときに活動する細胞が 7.1% であった。また、接触様式別では鼻と鼻の接触が 35.7%、体幹との接触が 20.2%、肛門との接触が 5.4% であった。

直線型のチャンバーにおいても AI 内のニューロンを解析したところ、やはり知らないマウスに反応するソーシャル・オン細胞と、また、逆の活動をするソーシャル・オフ細胞を同定した。

### 考察

島皮質の構造、機能が統合失調症や自閉症といった様々な精神神経疾患で変化していることが知られており、今回の結果は、これら島皮質の社会性機能について細胞レベルでの知見を与える。

### 結論

マウス島皮質において、社会性行動に関わるソーシャル細胞を同定した。

### 参考文献

1. Miura I et al, PLoS Genet 18, e3000584, 2020.

## 分担研究報告書

(課題名) ゲノム編集技術を用いた、生後脳や成体脳における新生ニューロンの生理的意義の解析

(所属) 京都大学大学院 生命科学研究科  
(氏名) 山田 真弓

### 緒言

中枢神経系において、ほとんどの神経細胞は胎生期あるいは出生後しばらくの時期にのみ、神経幹細胞から生み出されると考えられてきた。しかし、近年の研究によって、哺乳類の成体脳においても神経幹細胞が存在し、側脳室周囲の脳室下帯や海馬の歯状回といった特定の領域では、ニューロン新生が継続的に続いていることが分かってきた。成体脳において生み出される多くの新生ニューロンは既存の神経回路に組み込まれるが、そのメカニズムについては不明な点が多く、また、ニューロン新生の生理的意義についてはほとんど明らかにされていない。これは成体脳の新生ニューロンを特異的に遺伝子操作することが困難であったからであると考えられる。本研究課題では、ゲノム編集技術を用いて、新生ニューロンを特異的に遺伝子操作できるような遺伝子改変マウスを作製し、新生ニューロンが神経回路や高次脳機能に与える影響を解析することを目的とした。

### 方法

CRISPR/Cas9 システムを用いて、DCX や Tubb3 などの幼若ニューロンに特異的に発現する遺伝子の遺伝子座に、Cre や FLP などの組み換え酵素をノックインした遺伝子改変マウスを作製した (Inoue *et al.*, 2021, Imayoshi and Yamada *et al.*, 論文投稿中)。また、神経幹細胞に発現する転写因子 *Ascl1* の遺伝子座に CreERT2 をノックインした遺伝子改変マウスを用いて、新生ニューロン特異的に蛍光タンパク質を発現させ、薬剤により海馬の神経細胞に障害を与えた際の影響を観察した。

### 結果

DCX-Cre や Tubb3-Cre マウス等を、蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスと掛け

合わせ、lineage trace 解析を行なった。マウス胎児脳において、蛍光タンパク質で標識された細胞は、内在性の DCX あるいは Tubb3 と発現パターンがほぼ完全に一致していることが確認できた。次に、組換え酵素依存的に蛍光タンパク質を発現誘導できるようなアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを、これらの遺伝子改変マウスの成体脳海馬にインジェクションした。成体脳においては、新生ニューロンだけではなく、多くのニューロンで組換えが生じていた。そこで、*Ascl1-CreERT2* マウスと蛍光タンパク質を発現するレポーターマウスを用いて、成体脳の新生ニューロンだけを選択的に蛍光タンパク質で標識し、既存の神経回路への組み込み様式を解析した。その結果、成体脳の嗅球や海馬歯状回において、ニューロン新生が一生恒常的に起きていることを明らかにした。また、トリメチルスズにより、海馬の神経細胞に対して特異的に障害を引き起こし、新生ニューロンの神経回路への組み込みに異常が生じることを観察した。さらに、転写因子 *Ascl1* が示すダイナミックな遺伝子発現変動のニューロン新生における機能的意義を解析するために、遺伝子発現の光操作技術の開発に取り組んだ (Yamada *et al.*, *Cell Reports*, 2018, Yamada *et al.*, *iScience*, 2020)。また、生後脳や成体脳から神経幹細胞を収集して RNA シークエンス (RNA-seq) を行い、ニューロン新生に関与する機能性分子の探索を行なった。

### 考察

トリメチルスズにより、海馬の既存のニューロンに障害を引き起こした際に、新生ニューロンの神経回路への組み込みに異常が見られた。このことから、海馬の既存のニューロンが新生ニューロンの移動に関与していることが示唆された。今後は、BAC トランスジェニックなどのゲノム編集技術を用いて、特定のニューロン集団において蛍光タンパク質 Venus をノックインした遺伝子改変マウス (NeuN-VenusNLS, VGAT-VenusNLS, Prox1-VenusNLS など) の作製を行い、ニューロン新生を阻害/活性化した際に、神経回路の構造に与える影響を詳細に解析する。

## 結論

遺伝子改変マウスを用いて、成体脳の新生ニューロンを特異的に標識し、その移動様式や既存の神経回路への組み込み様式を観察した。さらに、薬剤により既存のニューロンに障害を与えた際の、新生ニューロンへの影響を観察した。また、RNA-seqを行い、成体脳の神経幹細胞の遺伝子発現について、発達・加齢に伴う発現変化を調べた。Cre等の組換え酵素依存的に機能性分子を発現誘導できるようなAAVベクターやレンチウイルスベクターの開発とともに、遺伝子発現の光操作技術の開発にも取り組んだ。

## 参考文献

1. \*Yukiko U. Inoue, Yuki Morimoto, **Mayumi Yamada**, Ryosuke Kaneko, Kazumi Shimaoka, Shinji Oki, Mayuko Hotta, Junko Asami, Eriko Koike, Kei Hori, Mikio Hoshino, Itaru Imayoshi and \*Takayoshi Inoue; An Optimized Preparation Method for Long ssDNA Donors to Facilitate Quick Knock-In Mouse Generation, *Cells* 2021, 10, 1076.
2. **Mayumi Yamada**, Shinji C. Nagasaki, Yusuke Suzuki, \*Itaru Imayoshi; Optimization of light-inducible Gal4/UAS gene expression system in mammalian cells. *iScience.*, 23, 101506, September 25, 2020. DOI:10.1016/j.isci.2020.101506
3. **Mayumi Yamada**, Shinji C. Nagasaki, Takeaki Ozawa, \*Itaru Imayoshi; Light-mediated Control of Gene Expression in Mammalian Cells. *Neuroscience Research*, Mar; 152:66-77, 2020. DOI: 10.1016/j.neures.2019.12.018
4. **Mayumi Yamada**, Yusuke Suzuki, Shinji C. Nagasaki, Hiroyuki Okuno, \*Itaru Imayoshi; Light control of the tet gene expression system in mammalian cells. *Cell Reports*, 25, p.487-500, October 9, 2018, DOI:10.1016/j.celrep.2018.09.026

## 分担研究報告書

(課題名) ゲノムワイドな遺伝子発現制御機構を基盤とした神経組織特異的クロマチン構造の解明

(所属) 九州大学 生体防御医学研究所  
(氏名) 大川 恭行

## 緒言

細胞が特定の機能を有するためには、遺伝子が適切に選択され発現する機序が必要である。この基盤となっているのが DNA とヒストンで構成されるクロマチン構造である。一方で、組織には特異的クロマチン構造が存在し、細胞特異的な機能獲得を制御していると考えられてきたがその多くは不明なままである。これまでに、申請者は、骨格筋細胞分化において、骨格筋特異的遺伝子が染色体上で特定のヒストンバリエントにより、未分化段階で予め“マーキング”されることが、分化時の遺伝子発現誘導に必要であることを明らかにしてきた (Harada et al, EMBO J, 2012; Harada et al, NAR, 2015)。そこで本研究では、神経組織に高発現する機能未知のヒストン遺伝子の機能解析を行い、神経系における機能獲得を司るクロマチン構造基盤の解明を目指す。

## 方法

次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析ならびに生化学的手法でゲノム上の神経特異的ヒストンの取り込み領域を同定し、ヒストンバリエントにより構築されるクロマチン構造を明らかにした上うえで構造形成メカニズムの解明を行う。また、生理的な機能解析のためノックアウトマウスの作成を行う。

## 結果

神経特異的なヒストンのノックアウトマウスの作成、樹立に成功した。現在、各種オミクス解析を中心とした機能解析を行い、神経系機能の解明を進めた。今年度はマウスの脳組織構造解析や行動解析を進めており論文投稿準備を進めている。また、これら極少数の成体幹細胞のエピゲノムプロファイリングを行うための新解析技術を開発した (Nat Protocols. 2020)。

## 考察

これら研究及び開発により、神経細胞特異的なヒストンバリエントを同定している。従来、知られていない多くのヒストンが組織特異的な機能を有している可能性があり生理的機能の解明が急務であろう。また、開発した技術は、マルチオミクス技術への基盤技術として活用できることから今後も開発を継続していくことが必要であると考えられる。

## 参考文献 (業績)

1. Qianmei Wu, Takeru Fujii, Akihito Harada, Kosuke Tomimatsu, Atsuko Miyawaki-Kuwakado, Masatoshi Fujita, Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa Genome-wide analysis of chromatin structure changes upon MyoD binding in proliferative myoblasts during the cell cycle *J Biochem.* 2021.
2. Isao Tamura, Ryo Maekawa, Kosuke Jozaki, Yasuyuki Ohkawa, Haruka Takagi, Yumiko Doi-Tanaka, Yuichiro Shirafuta, Yumiko Mihara, Toshiaki Taketani, Shun Sato, Hiroshi Tamura, Norihiro Sugino. Transcription factor C/EBP  $\beta$  induces genome-wide H3K27ac and upregulates gene expression during decidualization of human endometrial stromal cells *Mol Cell Endocrinol.* 2021.
3. Yuki Sakamoto, Mayuko Sato, Yoshikatsu Sato, Akihito Harada, Takamasa Suzuki, Chieko Goto, Kentaro Tamura, Kiminori Toyooka, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Ikuko Hara-Nishimura, Shingo Takagi, Sachihiko Matsunaga. Subnuclear gene positioning through lamina association affects copper tolerance. *Nat Commun.* 2020.
4. Hiroki Inada, Miyako Udono, Kanae Matsuda-Ito, Kenichi Horisawa, Yasuyuki Ohkawa, Shizuka Miura, Takeshi Goya, Junpei Yamamoto, Masao Nagasaki, Kazuko Ueno, Daisuke Saitou, Mikita Suyama, Yoshihiko Maehara, Wataru Kumamaru, Yoshihiro Ogawa, Sayaka Sekiya, Atsushi Suzuki.

- Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor. *Cells Nat Commun*, 2020.
5. Tomoko Yamaguchi, Yumi Ikeda, Katsuhisa Tashiro, Yasuyuki Ohkawa, Kenji Kawabata. The role of galanin in the differentiation of mucosal mast cells in mice. *Eur J Immunol*. 2020.
  6. Junichiro Yuda, Jun Odawara, Mariko Minami, Tsuyoshi Muta, Kentaro Kohno, Kazuki Tanimoto, Tetsuya Eto, Takahiro Shima, Yoshikane Kikushige, Koji Kato, Katsuto Takenaka, Hiromi Iwasaki, Yosuke Minami, Yasuyuki Ohkawa, Koichi Akashi, Toshihiro Miyamoto. Tyrosine kinase inhibitors induce alternative spliced BCR-ABL Ins35bp variant via inhibition of RNA polymerase II on genomic BCR-ABL. *Cancer Sci*. 2020.
  7. Kenichi Horisawa, Miyako Udono, Kazuko Ueno, Yasuyuki Ohkawa, Masao Nagasaki, Sayaka Sekiya, Atsushi Suzuki. Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input. The Dynamics of Transcriptional Activation by Hepatic Reprogramming Factors. *Mol Cell*. 2020.
  8. Tomoko Yamaguchi, Yumi Ikeda, Katsuhisa Tashiro, Yasuyuki Ohkawa, Kenji Kawabata. The role of galanin in the differentiation of mucosal mast cells in mice. *Eur J Immunol*, 2020.
  9. Hiroshi Ochiai, Tetsutaro Hayashi, Mana Umeda, Mika Yoshimura, Akihito Harada, Yukiko Shimizu, Kenta Nakano, Noriko Saitoh, Zhe Liu, Takashi Yamamoto, Tadashi Okamura, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura, Itoshi Nikaido. Genome-wide kinetic properties of transcriptional bursting in mouse embryonic stem cells. *Sci Adv*. 2020.
  10. Tetsuya Handa, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Shoko Sato, Masaru Nakao, Naoki Goto, Hitoshi Kurumizaka, Yasuyuki Ohkawa, Hiroshi Kimura. Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input. *Nat Protoc*. 2020.
  11. Misuzu Kurihara, Kagayaki Kato, Chiaki Sanbo, Shuji Shigenobu, Yasuyuki Ohkawa, Takeshi Fuchigami, Yusuke Miyanari. Genomic Profiling by ALaP-Seq Reveals Transcriptional Regulation by PML Bodies Through DNMT3A Exclusion. *Mol Cell*. 2020.
  12. Junichiro Yuda, Jun Odawara, Mariko Minami, Tsuyoshi Muta, Kentaro Kohno, Kazuki Tanimoto, Tetsuya Eto, Takahiro Shima, Yoshikane Kikushige, Koji Kato, Katsuto Takenaka, Hiromi Iwasaki, Yosuke Minami, Yasuyuki Ohkawa, Koichi Akashi, Toshihiro Miyamoto. TKIs Induce Alternative Spliced BCR-ABL Ins35bp Variant via Inhibition of RNA Polymerase II on Genomic BCR-ABL. *Cancer Sci*. 2020 .

## Systematic studies and modeling of neuropsychiatric and muscular diseases based on genome editing technology

**Mikio Hoshino, M.D. Ph.D.**

Department of Biochemistry and Cellular Biology, National Institute of Neuroscience,  
National Center of Neurology and Psychiatry (NCNP)

### [Purpose of the study]

The recent progress in genome editing technology allows us to rapidly and systematically generate animal models for diseases. Now that many of causative genetic elements for various muscular, neurological and psychiatric diseases have been identified in genome-wide association studies, it is highly expected that those elements, if evaluated in animal models, could stand as immediate targets for diagnosis and therapy. However, studies and modeling of neuropsychiatric and muscular diseases are still in an immature state and little is established to treat those diseases by regenerative means of medicine.

Based on useful information accumulated in the bioresource bank of NCNP, a novel platform for big data analyses, and our advanced protocols for genome editing, our group aims at development of various useful animal models for neuropsychiatric and muscular diseases to better understand the intricate pathology.

### [Members]

**Chief scientist:** Mikio Hoshino (NCNP)

**Shared scientists:** Takayoshi Inoue (NCNP), Satoru Noguchi (NCNP), Mitsuhiro Yamada (NCNP), Tomohiro Kabuta (NCNP), Shuji Wakatsuki (NCNP), Yuko Suzuki (NCNP), Yoshitsugu Aoki (NCNP), Shinji Oki (NCNP), Aritoshi Iida (NCNP), Rieko Muramatsu (NCNP), Yoshitaka Nagai (Osaka University; Kindai University), Kinichi Nakashima (Kyushu University), Toru Takumi (Kobe University), Mayumi Yamada (Kyoto University), Yasuyuki Ohkawa (Kyushu University)

### [Results]

Regarding research for technology and bioresource development, Dr. Hoshino's group established a novel platform for big data analyses in the lab and Dr. Inoue's group drastically improved CRISPR/Cas9 based genome editing methods as well as bacterial artificial chromosome mediated functional genome mapping strategies to generate plenty of disease model mouse lines. Dr. Iida's group found out novel pathological variants based

on useful information accumulated in the bioresource bank of NCNP. Dr. Ohkawa's group developed powerful epigenomic profiling technology from small population of cells and revealed chromatin dynamics in skeletal muscle stem cells and developing neural cells.

As for studies and modeling of psychiatric diseases, Dr. Hoshino's group revealed complex gene regulatory features for the autism spectrum disorder (ASD), schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder, substance dependence and mental retardation related gene locus, *Auts2*. They also found out novel three types of human disease associated missense mutations in *DSCAML1*, the causative gene for epilepsy and modeled the mutations by knock-in mice. Dr. Mi Yamada's group tried to generate various schizophrenic model mice based on the GABA hypotheses for effective drug screenings. Dr. Kabuta's group investigated the RN/DNautophagy system to find out the essential function of DNA/RNA transporters in lysosomes. Dr. Nakashima's group showed ideal ways in investigating complex mechanisms of neuropsychiatric diseases such as ASD, Rett syndrome, bipolar disorders and mental retardation. Dr. Takumi's group shared the useful information in editing huge genomic territory to recapitulate intricate ASD pathology with us.

Regarding studies and modeling of neurological diseases, Dr. Wakatsuki's group revealed possible roles of the ribonucleoprotein complex, Vault in neural circuit formation, maintenance and modification. Dr. Oki's group tried to model the complex neuro-immunological diseases caused by self-reactive T cells in mice. Dr. Muramatsu's group screened molecules involved in neural circuit repair processes to identify several candidates. Dr. Nagai's group established the useful fruit fly bank for the modeling of various neurodegenerative diseases and clarified the correlation between GGGGCC repeat elongation and amyotrophic lateral sclerosis pathology in the fly model. Dr. Ma Yamada's group focused on the molecular cascade for mouse adult neurogenesis and visualized the process *in vivo* by means of CRSIPR/Cas9 based genome editing methods.

For muscular diseases, Dr. Noguchi's group comprehensively modeled mutations identified from various familial muscular diseases by using the CRSIPR/Cas9 system. Dr. Aoki's group successfully generated transgenic mouse lines to reliably monitor exon-skipping efficiency of Dystrophin gene *in vivo* and established the screening platform for nucleic acid medicine to treat Duchenne muscular dystrophy. Dr. Suzuki's group aimed to model muscular diseases by editing the human iPS cell genome and adjusted the protocol for muscle differentiation and drug screening.

We held the scientific meeting monthly to promote tens of collaborative projects across NCNP. We additionally held the annual meeting where the results of our research were reported on Dec.10, 2020. We realized that the genome editing technology indeed accelerates animal modeling of diseases. Our findings also suggested considerable cross-talks among causative genes for different neuropsychiatric diseases, such as ASD, Rett syndrome, bipolar disorders, schizophrenia and so on.