

# 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NMP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・解析する事から各種精神神経筋疾患の統合的な病態解明をめざし、それら診断、治療法の開発につなげることを目的とする。具体的には、まず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に導入し、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、ALS、パーキンソン病等の各種神経変性疾患、遺伝性筋疾患などの各種神経筋疾患の動物モデルを作出する。次に、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、各種疾患の病態を理解し、新規診断法の開発に努める。さらにこれら疾患モデルの症状改善に有効な薬剤の探索などを通して、新たな治療法の開発につなげる。

### 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)

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)

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・江草 早紀・嶋岡 可純・宮下 聡・橋詰 晃一・山下 真梨子・足立 透真・白石 椋  
(疾病研究第一部)

大久保 真理子・林 晋一郎・井上 道雄・斎藤 良彦

(疾病研究第四部)

株田 千華・藤原 悠紀

(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・Yosif El-darawish・佐藤和貴郎・蓑手 美彩子

#### (遺伝子疾患治療研究部)

野上 健一郎・原 裕子

#### (MGC)

後藤 雄一・小笠原 真志

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・Lo Piccolo, Luca・田港朝也

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

京都大学大学院生命科学研究所

今吉 格

### 3. 研究成果

#### 1. バイオリソース・技術開発研究

(1) 公共データベースより RNAseq 等のビッグデータを集積し、新たな研究標的を見出すことを可能とする解析プラットフォームの構築を行った(星野)。(2) 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動物の作出(令和元年度は 37 系統の樹立を完遂)や解析基盤(動物棟改修に伴うマウス行動解析区画の整備も含む)のアップデートを推進した(井上高)。(3) NCNP の各種バイオリソースを活用し精神・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を目指した網羅的解析を進め、新規病因性バリエーションを見出した(飯田)。(4) ごく少数の細胞集団からエピゲノムプロファイリングを行う画期的手法を開発し、骨格筋幹細胞や神経系の機能獲得に関わるクロマチン構造動態の体系的解明を行った(大川)。

#### 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と NCNP 動物棟内のマウス行動解析バッテリーの再整備に向けた検討(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) ヒトゲノム解析から得られた新規自閉症関連遺伝子変異をマウスに導入して病態を解析する研究(内匠)、をそれぞれ推進し、有益な結果が蓄積されつつある。

#### 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など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) 免疫応答異常で引き起こされる中枢神経系の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の開発をめざす研究(山田真)、をそれぞれ行い、病態の解明につながるモデル動物も数多く得られた。

#### 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ン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  $Ca^{2+}$  ハンドリング特性を明らかにし、細胞内  $Ca^{2+}$  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)、を進めており、有用なモデル動物の作出を完遂した上で、臨床応用に向けた重要シーズが得られつつある。

令和元年 10 月 30 日 AP 東京八重洲通にて班会議開催

## 分担研究報告

(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。

(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 種類以上同定した。それぞれの細胞内局在、細胞接着能、神経突起伸長促進作用、等について調べた。先行して解析したのが、C 末端側のアラニンがスレオニンへ置換された A2105T 型変異である。in vitro 解析から、この変異が *DSCAML1* のコンフォーメーション異常を引き起こし、結果として細胞膜へ局在できなくなり、機能を失うことを明らかにした。また相同変異を持つノックインマウスを作成し解析したところ、イハラてんかんラットと同様な表現型を示すこ

とがわかったので、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確定した。

(ii) *Auts2* 遺伝子のノックアウトマウスでは、シナプスの数も入力も共に興奮性>抑制性となること、その結果として脳の興奮性が上昇する (cFos 陽性細胞の増加) ことが観察された。このことから、*AUTS2* 遺伝子に異常をきたした精神疾患患者では、E/I バランスが崩れて各種症状をが引き起こされている可能性が示唆された (Hori et al, *iScience*, 2020)。

小脳特異的 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 (Yamashiro et al, リバイズ実験中)

### 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た。*AUTS2* による興奮性シナプスの数の制御機構と、その破綻によるシナプス病態・精神疾患病理を明らかにした。

### 参考文献 (業績)

1. Hori K et al, *AUTS2* regulation of synapses for proper synaptic inputs and social communication. *iScience*, 2020;23:101183.
2. Arimura N et al, *DSCAM* regulates delamination of neurons in the developing midbrain. *Science Advances*, in press

## 分担研究報告

(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。

### 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 (論文投稿中)。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。

### 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。

### 参考文献 (業績)

1. 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

(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

前年度に作製した遺伝子 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 RNA-seq を行った。

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=1) の小脳切片から、組織ピッキング装置を用いてプルキニエ細胞を単離し、RNA-seq を行った。

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

### 結果

scRNA-seq にて各細胞において発現変化 ( $|\log_2 \text{FC}| \geq 1$ ) があった遺伝子 (Down DEGs,

Up DEGs) を抽出した。その結果、プルキニエ細胞群で、最も多くの遺伝子の発現変化が認められた。パスウェイ解析の結果、細胞間シナプス伝達や細胞形態形成に関与する遺伝子が多く見出された。

単離プルキニエ細胞での RNA-seq にて異常スプライシングの検出を試みたが、十分なリードを得ることができなかった。

一方、全小脳の RNA-seq で、Down DEGs: 622 遺伝子、Up DEGs: 509 遺伝子が検出された。その中には小脳形成に重要な *Fgf8*, *Fgf2* 遺伝子なども含まれており、パスウェイ解析では胚発生や細胞移動に関与する遺伝子が多く含まれるという特徴が示された。

さらに、スプライシングの解析では 136 遺伝子で異常スプライシングが見出された。これらの遺伝子は細胞骨格、細胞周期、RNA メチル化など広範囲に影響を及ぼすものが含まれていた。

### 考察

遺伝子改変マウスの小脳では、多数の遺伝子のスプライシング変化とともに、小脳発生に重要な遺伝子の発現量の変化を認めた。scRNA-seq では、特にプルキニエ細胞群で、発現変化を示した遺伝子を多数認め、この変化がこのマウスの表現型と関係していることが推測される。

遺伝子 X 産物はスプライシング因子を核内に運ぶ輸送体であり、遺伝子 X の異常が広範なスプライシング異常を引き起こすことが推測されていたが、今回の結果はその仮説を裏付けるものであり、脊髄小脳萎縮症の病態メカニズムの中心的な役割を示すものと考えている。

### 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し、脊髄小脳萎縮に至る。

### 参考文献

Okubo M, et al.: Exon skipping induced by nonsense/frameshift mutations in DMD gene results in Becker muscular dystrophy. *Human Genetics*. 139: 247-255, 2020.

## 分担研究報告

(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

本分担研究では、精神薬理研究部の三輪秀樹室長を中心に、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ている。

### 方法

統合失調症のGABA仮説に基づく病態モデルについて、①表面妥当性、②構成概念妥当性、③治療的操作の予測妥当性の各妥当性について検討する。平成31年度は、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について検討を進めた。さらに、slow waveの特性解析を行った。

遺伝子組換え実験および動物実験は国立精神・神経医療研究センター神経研究所組み換え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ている。

### 結果

統合失調症のGABA仮説に基づく新規病態モデルマウスの解析に向け、実験室及びテストバッテリー用行動実験室の準備を進めた。パルブアルブミン(PV)陽性特異的GAD67(GABA合成酵素の1つ)ノックアウトマウスはロタロッドによる運動学習障害を呈するが、このミュータントマウスの解剖・免疫組織化学的解析では、小脳の細胞層構造に目立った異常は認められておらず、バスケット細胞の軸索走行等の形成異常が関連していることを明らかにしている。さらに、海馬歯状回顆粒細胞

が未成熟状態(成熟顆粒細胞マーカーであるカルビンディン陽性シグナルが減弱)であり、新生顆粒細胞の移動位置にも異常を観察している。また、GAD67 floxマウスの視床網様核にAAV-Creをインジェクションすることによって作製される視床網様核特異的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ている。slow waveの特性に関しては対照群と有意な差は観察されなかった。このような視床網様核の遺伝子操作をするに際して、現在はウィルスベクターを視床網様核にインジェクションしているが、実験の効率性・再現のばらつきなどを改善するため、本研究班員(疾病研究第6部井上高良室長ら)との共同研究により視床網様核特異的Creマウスの作製を進めている。

統合失調症の環境要因として、「シヨ糖含有食の過剰摂取」が疫学的調査から明らかにされている。しかしながら、統合失調症の症状との関連性や統合失調症患者がコーピングとしてシヨ糖含有食を好んで摂取するのか、シヨ糖含有食を好んで摂取することがトリガーとなり発症するのかは不明な点が多い。そこで、統合失調症関連遺伝子glyoxalase1ヘテロ欠損マウスを対象として、シヨ糖食を摂取させたときに統合失調症様表現型を生じるかを解析した。その結果、パルブアルブミン陽性細胞の減少、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など統合失調症様表現型を観察することができ、シヨ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)。

### 考察

これまで、精神疾患の病態を明らかにするためには、動物モデルが多大な貢献をしてきた。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、既報 (Fujiwara K, Miwa H, et al. *Neuropsychopharmacology*, 2015) のさらなる詳細な解析を行っており、統合失調症との関連性を明らかにしようとするものである。統合失調症および双極性障害の患者脳において、海馬歯状回顆粒細胞の未成熟化が観察されており、本研究で解析した PV-GAD67 ノックアウトマウスにおいて、同様に海馬歯状回顆粒細胞の未成熟化が観察できたことから、統合失調症において「GABA 関連分子・シグナル」を標的とした臨床試験への応用研究が進展できる可能性がある複数の研究成果を得ることができたと考えている。

統合失調症陽性症状の「幻覚・幻聴」を評価できるモデル行動システムは確立されていない。また認知機能障害に関しても、その機能障害を寛解させる治療薬が開発途上にあることから、それを評価できる行動実験の確立も急務となっている。そのため、NCNP に既に備わっている各種の行動実験システムの効率化に加え、脳波や脳内電極を用いた電気生理学実験、機能イメージング実験等も同時に実施できる解析システムを確立する必要がある。そこで、行動下の細胞活動を計測するため、米国・MIT の Michael Halassa 博士との共同研究を開始し、in vivo 多点電極記録のシステムを導入し始めている。この計測システムを用いることで、より多くの情報を含む客観的な病態モデル解析が可能となるものと期待される。

## 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)

Fujiwara K, Miwa H, et al. Glutamate Decarboxylase 67 Deficiency in a Subset

of GABAergic Neurons Induces Schizophrenia-Related Phenotypes. *Neuropsychopharmacol* 40: 2475- 2486, 2015

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>

## 分担研究報告

(課題名) リソソーム分解系の分子構造と疾患との関連

(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、リソソーム膜タンパク質 SIDT2 が、核酸のリソソーム内への輸送において重要な分子であることを見いだした。SIDT2 は、RNA transporter として知られる線虫 SID-1 の脊椎動物オルソログであることから、RDA において transporter として機能すると考えられる。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

昨年度までに、SIDT2 の細胞質側配列に直接核酸が結合し、SIDT2 と核酸の結合には選択性が存在することを見いだした。今回、SIDT2 と疾患原因 mRNA との核酸結合性及びそ

の影響について解析した。疾患原因 mRNA としてはハンチントン病の原因である *HTT* mRNA を用いた。SIDT2 の細胞質側配列に GST を付加したタンパク質を精製し、変異型及び野生型 *HTT* mRNA は in vitro transcription により作製し、結合についてプルダウンアッセイにより解析した。さらに、SIDT2 の核酸結合モチーフ変異体についても同様にタンパク質精製を行い、核酸結合について解析を行った。また、SIDT2 及び変異型 *HTT* を培養細胞に発現させ、*HTT* mRNA の分解、*HTT* タンパク質の量や凝集への影響を、Tet-off システムによるチェイスアッセイや、フィルタートラップアッセイなどを用いて解析した。

### 結果

SIDT2 の細胞質側配列に直接 *HTT* mRNA が結合することを見いだした。また、この結合量は野生型 *HTT* より変異型で高く、CAG リピート依存的であることが示された。また、細胞レベルの実験では、*HTT* mRNA の分解が SIDT2 過剰発現で促進され、*HTT* mRNA は RNautophagy の基質となって分解された。さらに、SIDT2 の過剰発現により細胞内の変異型 *HTT* タンパク質の量を低減できることを明らかにし、その低減効果には SIDT2 と *HTT* mRNA の結合が重要であることを示した。

### 考察・結論

SIDT2 CD はハンチントン病原因遺伝子の *HTT* mRNA に、CAG リピート依存的に結合すること、*HTT* mRNA は RNautophagy の基質となること、SIDT2 の過剰発現により細胞内の変異型 *HTT* タンパク質の量を低減できることを明らかにした。RNautophagy は新たな治療法開発に利用できる可能性がある。

## 分担研究報告

(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、変容の分子基盤の整備は、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で、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

本年度に引き続き、リボヌクレオ蛋白複合体 Vault 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により実施した。

昨年度までに、蛋白質リン酸化酵素 Aurora A と結合する分子として、Vault 複合体の主要構成蛋白である MVP を見出した。Vault 複合体は蛋白質と RNA からなるリボヌクレオ蛋白複合体で、Vault に含まれる RNA は vault RNA (vtRNA) と呼ばれる。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、ERK シグナルが活性化され、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 シグナルの活性調節を *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 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

vtRNA は蛋白質に翻訳されないノンコーディング RNA (ncRNA) の一種である。ncRNA の役割は蛋白質合成におけるトランスファー RNA が象徴的であるが、蛋白質の安定化や局在化など、蛋白質分子のさまざまな機能調節にも関与することが、近年明らかにされている。vtRNA はほぼすべての真核生物にあるが、その生理機能はほとんど明らかになっていない。今回の結果は、神経細胞の細胞内シグナル調節因子としての vtRNA の機能の一端を明らかにしたと考えている。一方、vtRNA がどのようにして Vault 複合体からリリースされるのかを明らかにすることは究極の課題である。これまでの結果から、Aurora A による MVP のリン酸化がその引き金と想像されるが、その成否を今後の研究で明らかにする計画である。

### 参考文献 (業績)

1. Tsubota M., Fukuda R., Hayashi Y., Miyazaki T., Ueda S., Yamashita R., Koike N., Sekiguchi F., Wake H., Wakatsuki S., Ujiie Y., Araki T., Nishibori M., Kawabata A. Role of non-macrophage cell-derived HMGB1 in oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and its prevention by the thrombin/thrombomodulin system in rodents: negative impact of anticoagulants. **J Neuroinflamm.** (2019) 16: 199.
2. Kondo S., Takahashi K., Kinoshita Y., Nagai J., Wakatsuki S., Araki T., Goshima Y., Ohshima T. Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation delays Wallerian degeneration after optic nerve injury. **Biochem Biophys Res Commun.** (2019) 514: 1037-1039.
3. Kondo S., Takahashi K., Kinoshita Y., Nagai J., Wakatsuki S., Araki T., Goshima Y., and Ohshima T. Genetic inhibition of CRMP2 phosphorylation at serine 522 promotes axonal regeneration after optic nerve injury. **Sci Rep.** (2019) 9: 7188.

## 分担研究報告

(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

骨格筋線維の形質膜直下にジストロフィンが欠損する Duchenne muscular dystrophy (DMD) では、筋形質膜が脆弱になり、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 (RyR1) や sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) の活性低下により、筋線維の細胞質内 Ca<sup>2+</sup>濃度が恒常的に上昇し、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、酸化ストレス等が引き起こされ、筋線維が変性・壊死する。本年度はこの SERCA を活性化することで、筋変性を抑えることが可能か検証した。

### 方法

- ・DMD 患者由来 iPS 細胞から新規 EZ- sphere 法 (Sakai-Takemura et al., 2018) を用いて骨格筋細胞を誘導した。
- ・筋小胞体特異的な Ca<sup>2+</sup>インジケータータンパク質である rCEP1A1er (赤色蛍光) を発現するレンチウイルスベクターを構築し、ヒト iPS 細胞に導入した。
- ・既知の SERCA 活性化剤を DMD のモデル動物である mdx マウスの腹腔内へ連続投与し、病態が改善するか検討した (血清 CK 値、Grip テスト, treadmill テスト, エバンスブルー色素 (EBD) の筋線維内への取り込み, ex vivo 筋収縮力測定、HE 染色、中心核線維の計測、シリウスレッド染色等)。
- ・SERCA 活性化剤投与後、骨格筋からミトコンドリアを単離し、Seahorse XF24 Extracellular Flux Analyzer を用いて酸素消費量を測定した。

- ・SERCA 活性化剤投与群と非投与群、野生型マウス (C56/BL6) の前脛骨筋での遺伝子発現を RNA-seq で解析した。

### 結果

- ・rCEP1A1er を安定発現するヒト iPS 細胞株を得た。筋分化誘導することで筋管の SR 内の Ca<sup>2+</sup>の濃度のモニタリングが可能になった。
- ・SERCA 活性化剤を mdx マウスへ連続投与したところ、骨格筋の SERCA 活性が 50% 程度上昇していた。
- ・SERCA 活性化剤投与により、血清 CK 値が低下し、in vivo の筋力 (grip テスト)、運動能力 (treadmill テスト) が向上し、単離筋の twitch force, tetanic force とともに回復が見られた。
- ・SERCA 活性化剤投与により、ミトコンドリア機能に改善がみられた。
- ・通常、treadmill での走行後の mdx 筋では、筋形質膜の傷害を反映して、EBD の筋線維内への取り込みの上昇が認められる。SERCA 活性化剤によりこの EBD の取り込みが有意に抑えられた。

### 考察

SERCA 活性化剤は mdx マウスの筋変性を抑制したが、ミトコンドリアの機能回復が主要因と考えられた。

### 結論

- ・SERCA 活性化剤は mdx マウスの病態を改善した。薬剤による SERCA の活性化が DMD の治療法として有効である可能性が示された。今後は rCEP1A1er を発現するヒト iPS 細胞を用いて (1) 低用量で筋変性を抑制し、(2) 副作用が少なく長期に投与できる新規 SERCA 活性化剤の開発を行う。

### 参考文献

Sakai-Takemura F, et al. (2020) Prostaglandin EP2 receptor downstream of NOTCH signaling inhibits differentiation of human skeletal muscle progenitors in differentiation conditions. *Commun Biol*, 3(1):182.

## 分担研究報告

(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を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で実施する。

### 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

筋ジストロフィーマウス由来初代筋芽細胞を対象に、エクソン 23 スキップの誘導により高レベルの EGFP 発現誘導が可能な pCAGGS-EGFP の作出に成功し、プレートリー

ダーによる EGFP 蛍光の定量測定に成功した。EGFP 蛍光が従来の PCR によるエクソン・スキップ誘導効果と相関する事を確認できた。次に、EGFP レポーター Tg マウスを 4 系統作出し、qPCR によりトランスジーンのコピー数評価を行った。さらに、当該 Tg マウスを対象にアンチセンス・モルフォリノ核酸を前脛骨筋に筋注あるいは経静脈注射し、*in vivo* イメージングシステムにより、エクソン・スキップの薬効・薬理評価に最適な系統を選別できた。

### 考察

EGFP は蛍光波長が短く *in vivo* イメージングの際に生体バックグラウンドがアーチファクトになり得ることから、ホタルルシフェラーゼを使ったレポーター Tg マウスの作出を検討する。

### 結論

pCAGGS-EGFP レポーターを使った新規 Tg マウスを 4 系統作出し、*in vivo* イメージングに最適な系統の選別を行った。

### 参考文献

#### 【欧文原著】

Hara Y, et al. Novel EGFP reporter cell and mouse models for sensitive imaging and quantification of exon skipping. Scientific reports, accepted.

## 分担研究報告

(課題名) 動物モデルを用いた自己免疫性中枢神経疾患の研究

(所 属) 国立精神・神経医療研究センター  
神経研究所 免疫研究部

(氏 名) 大木 伸司

### 緒言

中枢神経系の難治性疾患には、免疫異常に起因する一群の自己免疫疾患が存在する。T細胞主体の多発性硬化症などでは治療薬の開発が進んでいる一方で、多様な症状を呈する自己免疫性脳炎など自己抗体依存性の稀少疾患は症例数が少ない。膠原病などと同様に根本的な治療法はなく、ステロイド治療などが中心となっている。本研究では、自己免疫疾患のプロトタイプとして膠原病自然発症マウスを用い、自己反応性T細胞による病態機序の解明と治療法開発を目指す。同マウス血清中に存在し、中枢神経組織、とくにシナプスに反応性を示す自己抗体を網羅的に検索し、その病原性を解析するとともに、自己抗体依存性の中枢神経病態と自己反応性T細胞の関係を明らかにする。

### 方法

膠原病様病態を自然発症する BXS<sup>B</sup>-Yaa 背景の NR4A2<sup>cK0</sup> マウスを作製し、自己反応性T細胞の性状解析とのサロゲートマーカーの探索を行う。同定したサロゲートマーカーを手掛かりに、自己反応性T細胞を標的とした新規治療法開発の可能性を探る。並行して、自己免疫疾患患者由来の自己反応性T細胞の挙動を解析し、NR4A2 との関係性を調べる。

### 結果

膠原病様病態を自然発症する BXS<sup>B</sup>-Yaa 背景の NR4A2<sup>cK0</sup> マウスでは、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が有意に低下した一方で、外来高原に

対する液性免疫は維持されていた。同マウスの自己反応性T細胞の性状解析から、新規のサロゲートマーカーA およびBを同定し、発症に伴う自己反応性T細胞の著しい増加を確認した。この自己反応性T細胞を標的とした予防的、あるいは治療的介入により、脾臓とリンパ節の腫大、血清中の IgG 抗体価と抗核抗体価が有意に低下した。自己反応性T細胞を標的とした自己抗体依存性疾患の全く新しい病態制御機構の一端が明らかとなった。

### 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治療が主流であり、多くの患者は多様な副作用に苦しんでいる。今回の結果から、自己反応性T細胞を標的とした自己抗体依存性疾患の選択的な病態制御機構の可能性が開かれ、B細胞標的治療法との併用などにより、疾患特異性が高らかに高い治療が実現できる可能性が示された。

### 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治療法により、自己抗体依存性疾患の病態改善効果を得た。

### 参考文献

- なし

## 分担研究報告

(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) 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

本研究のミッションは、(1) 新しい遺伝子診断法の開発や画期的治療薬の創出などの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) 精神・神経筋疾患の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

我々は、既に exome sequencing や染色体構造異常検出用の解析パイプラインを構築している。本研究では、さらなる exome sequencing 並びに 2,000 例の疾患ゲノムデータを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。具体的には、一連のゲノム情報解析を駆使し、バリエーションのアノテーションとキュレーションを行った。新規(候補)遺伝子が発見された場合には、機能解析、モデル動物作製のために当研究班内で変異情報を共有し、生物学的、医学的見地から解析を支援した。

## 結果

(1) 北京大学の研究者らとの国際共同研究により、眼咽頭遠位型ミオパチーの新規原因遺伝子 *GIPCI* を発見した。(2) 横紋筋特異的チトクロームC酸化酵素欠損症の新規遺伝子 *COX6A2* を発見した。(3) *ADSSL1* が、日本人のネマリンミオパチーで最も変異頻度の高い遺伝子であることを発見した。(4) 知的障害研究において4遺伝子を解析し、新規病変性バリエーションを発見した。(5) MGC

内のオリジナル *in house* ゲノム解析パイプラインを拡張した。なお、上記の研究は、神経研究所、NCNP 病院、他施設との共同研究による成果である。

## 考察

病変性バリエーション情報を当研究班、研究所、病院の医師らと共有することによって研究が効率的に進み、共同研究の有用性が実証された。

## 結論

MGC で管理する精神・神経筋疾患の生体試料を用いて、新規原因遺伝子の探索や新規病変性バリエーション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 (2019 年度代表論文)

(1) Deng J, Yu J, Li P, et al. Expansion of GGC repeat in *GIPCI* is associated with oculopharyngodistal myopathy. *American Journal of Human Genetics*, 106:793-804.

(2) Iida A, Takano K, Takeshita E, et al. A novel PAK3 pathogenic variant identified in two siblings from a Japanese family with X-linked intellectual disability: case report and review of the literature. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, 5. pii: a003988

(3) Inoue M\*, Uchino S\*, Iida A\*, (\*: Contributed equally to this work) *COX6A2* variants cause a muscle-specific cytochrome c oxidase deficiency. *Annals of Neurology*, 86: 193-202 (2019)

その他、上記以外に4報の英文原著論文が国際専門誌に掲載中。加えて、3報が、現在印刷中。

## 分担研究報告

(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

中枢神経系の疾患に罹患すると、様々な症状があらわれる。症状は、十分とはいえないがしばしば自然回復する。回復のメカニズムの一つに、傷害を受けた神経回路が自発的に修復することが指摘されている。神経回路が自然に修復するメカニズムには不明な点が多いが、修復を促進するメカニズムを解明し、その作用を増強することで、種々の神経疾患の後遺症を和らげることができると期待されている。本研究では、前年度に構築した *in vitro* のスクリーニング実験系を用い、神経突起の伸長効果を制御する機能を新規に見出した分子について、神経突起の伸長以外への作用の検討および候補分子の *in vivo* での発現様式を検討した。また、次年度に実施する *in vivo* の解析のためのツール作成を行った。

### 方法

神経突起の伸長の評価は、大脳皮質神経細胞の初代培養系に対して候補分子の siRNA を導入し、培養後に神経細胞を抗 TuJ1 抗体を用いて染色し、神経突起長を計測することで、各 siRNA 導入細胞における神経突起伸長への作用を評価した。また、同細胞を核染色し、培養後の細胞数を計測することで、導入した siRNA が細胞生存に寄与するかも検討した。

候補分子の全身での発現様式を評価するため、全身の各臓器から RNA を採取し、real time PCR 法を用いて各臓器での候補分子の mRNA 量を相対的に比較した。さらに、観察の範囲内で顕著に神経突起の伸長を制御する

作用があった分子に関して、その発現を抑制させるための shRNA および GFP を組み込んだアデノ随伴ウイルスベクターを作成した。

### 結果

神経症状と関連ある遺伝子群をデータベースより抽出し、脳での発現が検出される遺伝子計 40 種類に対して siRNA ライブラリーを作成し、各 siRNA を導入した神経細胞での神経突起長を計測したところ、神経突起長を有意に抑制させる siRNA を 2 種類見出した。なお、各 siRNA を導入した神経細胞数に差は認められなかったことから、神経細胞の生存維持には影響しないことが示唆された。特に顕著な突起伸長抑制効果があった siRNA の標的となる遺伝子として Syt4 があり、その全身の臓器で検討したところ、脳での mRNA の発現量が他臓器と比較して有意に高かった。今後、Syt4 遺伝子の発現を大脳皮質で特異的に抑制し、また抑制した神経細胞での神経回路の走行を可視化して観察するために、GFP と Syt4 shRNA を組み込んだアデノウイルスを作成し、ウイルスをマウス脳実質に注入した。14 日後に注入部位の組織において、Syt4 の発現抑制効果を mRNA レベルおよびタンパク質レベルで確認した。さらに、同ウイルスに組み込んだ GFP による軸索の可視化を、同じマウスの脊髄切片内で確認した。

### 考察

Syt4 遺伝子が、新規の軸索伸長阻害効果分子であることが *in vitro* の実験から示唆された。また同分子は脳に高発現する分子であり、ウイルスベクターを用いた *in vivo* 実験がマウスで可能と示唆された。

### 結論

今後 Syt4 遺伝子の発現を抑制することで *in vivo* での神経再生および機能回復への効果を検討することで、同分子の病態生理学的な意義を解析していきたい。

## 分担研究報告

(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

(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、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、家族性パーキンソン病 (PD) の原因となる  $\alpha$  シヌクレイン ( $\alpha$  Syn) 遺伝子変異による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た *in vivo* 解析を行った。

### 方法・結果・考察

$\alpha$  Syn 遺伝子の変異による影響を正確に評価するために、ゲノム挿入部位特定な遺伝子導入法を用いて、野生型  $\alpha$  Syn もしくは変異型  $\alpha$  Syn (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T) を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作成した。まず、定量的 RT-PCR 法にて導入遺伝子の発現量を比較したところ、実際に野生型・変異型  $\alpha$  Syn mRNA の発現量はほぼ同じレベルであった。次に複眼に  $\alpha$  Syn を発現

させたところ、個眼の不正・融合、剛毛の脱落など軽度の複眼変性を認めたが、野生型・変異型  $\alpha$  Syn 間では明らかな差は認めなかった。続いて神経系に  $\alpha$  Syn を発現させたところ、変異型  $\alpha$  Syn E46K、H50Q、G51D、A53T の発現では野生型に比べ、より早期の 3 週齢から有意な運動障害を認めた。ウェスタンブロットの結果、変異型  $\alpha$  Syn E46K タンパク質は野生型や他の変異型に比べて発現量が有意に高いことが明らかになり、薬剤誘導性

GeneSwitch システムを用いて遺伝子発現遮断後の  $\alpha$  Syn タンパク質の分解を検討したところ、変異型  $\alpha$  Syn E46K では野生型に比べて分解速度が有意に遅延していた。

### 結論

以上の結果から、変異型  $\alpha$  Syn E46K は分解抵抗性を獲得して、神経変性発症に寄与している可能性が考えられた。また、本研究で樹立した新規の  $\alpha$  Syn 発現パーキンソン病モデルショウジョウバエは、 $\alpha$  Syn 遺伝子変異のメカニズム解明に有用な動物モデルであると考えられる。

### 業績発表

Sakai R., et al. *PLoS One* 14(6): e0218261 (2019)

## 分担研究報告

(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

X染色体上のMeCP2遺伝子変異は、Rett症候群(RTT)をはじめ、自閉症、双極性障害などを含めた種々の発達障害・精神疾患への関与が示唆されているものの、発症機序の詳細は不明である。これまで、神経細胞におけるMeCP2の機能異常がRTT発症の原因と考えられてきたが、最近、非神経細胞(グリア細胞)の機能異常がRTT病態発症の一因である可能性が示唆され始めている。我々は、MeCP2がmicroRNA(miRNA)マイクロプロセッサーであるDrosha複合体と結合し、miR-199aのプロセッシングを促進することを同定した。そこで本研究では、MeCP2及びmiR-199a欠損グリア細胞の機能解析を行うことで、精神・神経疾患に対する新規分子基盤の提示を目指す。

### 方法

我々はこれまで野生型、MeCP2欠損及びmiR-199a欠損アストロサイト培養上清(ACM)ではタウリンが減少していることを見出した。そこで、タウリンをMeCP2欠損マウスに投与することで、MeCP2欠損マウスでみられる表現型が改善するかどうかについて解析を行った。

### 結果

MeCP2欠損マウスにタウリンを100 mg/kg/dayの濃度で投与し、MeCP2欠損マウスにみられるRTT様の表現型が回復するかどうかを解析した。その結果、MeCP2欠損マウスは成長遅滞を示すことが知られているが、タウリンを投与することで、MeCP2欠損マウス

の体重が増加することが明らかとなった。また、RTT様症状スコアリングを測定した結果、タウリン投与により、RTT様症状スコアリングが減少する、つまりRTT様の症状が改善することがわかった。さらに、タウリンを投与することでMeCP2欠損マウスの寿命が増加することが明らかとなった。

### 考察

本研究により、MeCP2欠損マウスにタウリンを投与することでRTT様の表現型が改善することが明らかとなった。今後は、タウリン投与がMeCP2欠損脳にどのような影響を与えるかについて、免疫染色を行いニューロンやミクログリアの形態変化について解析を行う予定である。

### 結論

これまでRTTについて様々な研究がなされてきたが、未だに有効な治療法は存在しない。今後はタウリンの投与がどのようなメカニズムによりMeCP2欠損マウスの表現型を改善しているかについて解析することで、新しい治療法の開発への展開が期待される。

## 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

無麻酔覚醒下マウスを用いて、機能的核磁気共鳴画像法 (fMRI, functional magnetic resonance imaging) を行った。機能的タスクとしては、社会性匂いによる嗅覚刺激を使用した。また、固定したマウス脳組織を用いて、拡散テンソル画像法 (DTI, diffusion tensor imaging) を行った。薬物投与としては、DCS (D-cycloserine) の急性投与を行った。

### 結果

安静時 fMRI を用いて、脳領域の機能的結合を調べたところ、自閉症 (15q dup) モデルマウスでは広範囲に渡り機能的結合の低下が認められた。これらの機能異常が神経構造の異常によるものかを調べるために DTI を用いて解剖学的結合を調べた。15q dup マウスでは解剖学的結合も広範囲で低下しており、機能的結合と相関がみられた。15q dup マウスへの DCS 投与により、社会的相互作用の異

常が軽減され、脳機能異常も前頭野を中心として改善した。

CNV の網羅的細胞モデルに関しては、神経細胞に分化後、形態的、機能的、そしてシングルセル RNA-seq 法を用いたオミクス解析を行い、現在論文準備中である。

### 考察

MRI の利点は、マウスからヒトまで同じ撮影法で非侵襲的に計測が可能なことである。無麻酔 fMRI を用いることで、疾患モデルマウスでの認知機能に関する領域の機能異常を計測することが可能になり、ヒト臨床 MRI データと直接的に比較することが可能になる。

### 結論

覚醒下マウスの fMRI 解析が、自閉症モデルマウスのような精神疾患モデルマウスの評価に有効であることを示した。

### 参考文献

1. Furumai R et al, Hum Mol Genet 28, 1947-1958, 2019.
2. Takumi T et al, Neurosci Biobehav Rev, 110, 60-76, 2020.
3. Tsurugizawa T et al, Sci Adv, 6, eaav4520, 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、大部分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していることが分かってきた。成体脳のニューロン新生は、記憶・学習などの高次脳機能に関与することが明らかになってきている。本研究では、ゲノム編集技術を用いて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。

### 方法

これまで、成体脳の新生ニューロンを特異的に遺伝子操作できる遺伝子改変マウスは国内外において少なく、新生ニューロンの生理的意義を解析することは困難であった。そこで、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する。作製した遺伝子改変マウスに対して、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アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターやレンチウイルスベクターを感染させて、生後脳や成体脳の新生ニューロンにおいて、選択的に遺伝子操作を行う。新生ニューロンにおいて、光や薬剤感受性の機能性分子を発現させ、新生ニューロンが神経回路や高次脳機能に与える影響について解析を行う。これまでに確立してきた光遺伝学ツールとも組み合わせ、解析する予定である。さらに、CRISPR/Cas9 および 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の作製を行う (NeuN-VenusNLS, VGAT-VenusNLS, Prox1-VenusNLS など)。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解析する。

### 結果

CRISPR/Cas9 システムを用いて、DCX や Tubb3 陽性の幼若ニューロンに特異的に Cre や FLP の組み換え酵素をそれぞれノックインした遺伝子改変マウスを作製した (DCX-iCre, DCX-FLPo, Tubb3-iCre, Tubb3-FLPo マウスの4種類)。それぞれ複数ラインが得られたため、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て、内在性の DCX や Tubb3 の発現パターンを最も再現しているラインを選択した (Yamada *et al.*, 投稿準備中)。今後は、光や薬剤感受性の機能性分子を搭載したウイルスベクターをこれらのマウスの海馬歯状回に感染させ、生後脳や成体脳における新生ニューロンの機能解析を行う予定である。

また、並行して光作動性転写因子の開発を行った。これまでに、植物由来の Cry2-CIB1 システムを利用して、光作動性 Tet システムの開発に成功している (Yamada *et al.*, 2018, 2020)。さらに、マウス脳において、より効率良く機能する改良版を開発中である。培養細胞レベルでは、従来のもよりも発現誘導が高いものを作製することができた。さらに、これらの系を搭載したウイルスベクターの構築も開始している。また、生後脳や成体脳の神経幹細胞を用いて、RNA シークエンス解析を行い、ニューロン新生に関与する新規の機能性分子の探索を実施した。

### 考察

新規に作製した遺伝子改変マウスは、特に胎児脳において、内在性の DCX や Tubb3 の発現を再現できていた。光操作技術と組み合わせることによって、生後脳・成体脳だけではなく、胎児脳における神経発生研究にも役立つことが期待される。

### 結論

CRISPR/Cas9 システムにより、非常に短期間で、目的の遺伝子改変マウスを作製することができた。さらに、光作動性転写因子の改良を進展させることができた。今後はこれらのノックインマウスに、光作動性転写因子を搭載したウイルスベクターを導入して、生後脳や成体脳における新生ニューロンの機能解析を行う予定である。

### 参考文献

Yamada *et al.*, Cell reports, 2018  
Yamada *et al.*, Neuroscience Research, 2020

## 分担研究報告

(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な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. n press)。

## 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。

## 結論

現在も他のヒストンバリエントの解析を進めており、引き続き必要な技術を適時開発しつつ研究を進める。

## 参考文献 (業績)

1. Chromatin integration labeling for mapping DNA binding proteins and modifications with low input. Handa T, ..., \*Ohkawa Y, \*Kimura H. *Nat Protocols*. in press

## 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), 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 CRSIPR/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 annual meeting where the results of our research were reported on Oct.30, 2019. 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.