

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02747

研究課題名(和文) ヒト型自閉症モデルマウスによる発症メカニズムの解明と創薬開発への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism in human autism model mice and application to drug discovery development

研究代表者

西山 正章 (Nishiyama, Masaaki)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50423562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：クロマチンリモデリング因子CHD8をコードする遺伝子の変異は、自閉スペクトラム症(ASD)と強く関連している。CHD8ハプロ不全はヒトおよびマウスで自閉症の表現型をもたらす。髄鞘形成障害はASDの患者で観察されているが、オリゴデンドロサイト機能障害が自閉症の表現型の原因であるかどうかは不明であった。オリゴデンドロサイトにおけるChd8の欠損は、髄鞘の低形成を引き起こし、活動電位の伝播を遅らせ、社会的相互作用や不安様行動の増加を含む行動異常を引き起こした。これらの結果は、CHD8ハプロ不全によるオリゴデンドロサイトの機能障害がいくつかの神経精神医学的な表現型を生じさせることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれの結果は、オリゴデンドロサイトの発達、髄鞘形成、およびASDの病因におけるCHD8の役割を明らかにした。髄鞘形成障害が行動異常に寄与する可能性があることを考えると、髄鞘形成の促進は、ASDに関連した行動異常の治療のための潜在的な戦略の一つになる。この考えと一致して、最近の研究では、薬剤による髄鞘形成または神経伝導の改善により、神経発達障害のマウスモデルにおける異常な社会的行動が回復することが明らかになっている。全体として、われわれの結果は、オリゴデンドロサイトがASDの病因において重要な役割を果たすことを示しており、特定のASD表現型の治療への新しい方法の開発に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the gene encoding the chromatin remodeler CHD8 are strongly associated with autism spectrum disorder (ASD). CHD8 haploinsufficiency also results in autistic phenotypes in humans and mice. Although myelination defects have been observed in individuals with ASD, whether oligodendrocyte dysfunction is responsible for autistic phenotypes has remained unknown. Ablation of Chd8 specifically in oligodendrocytes of mice impaired myelination, slowed action potential propagation and resulted in behavioral deficits including increased social interaction and anxiety-like behavior. Our results thus indicate that dysfunction of oligodendrocytes as a result of CHD8 haploinsufficiency gives rise to several neuropsychiatric phenotypes.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチンリモデリング 自閉症

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (ASD) は、社会的相互作用とコミュニケーションの障害、ならびに制限された反復的な行動によって特徴付けられる神経発達障害である。近年の ASD 患者を対象としたエクソーム解析で、シナプス機能、転写調節、またはクロマチンリモデリングに関連するタンパク質をコードする遺伝子の多くの変異が特定された。これらの遺伝子の中で、クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 8 (CHD8) をコードする遺伝子は、ASD 患者において最も高頻度で変異している遺伝子座として報告された。この *CHD8* に変異を有する患者は、巨頭症、異なる顔貌、胃腸の異常、認知障害、不安などの特徴を示す。*CHD8* 変異が脳の発達と機能にどのように影響を与えるかを理解することは ASD の病態を解明するカギである。

CHD8 は ATP 依存性のクロマチンリモデリング因子として機能し、はじめは Wnt- β -カテニンシグナル伝達経路の負の調節因子として同定された。マウスにおいて *Chd8* のホモ接合性の欠失は胎生致死になるのに対し、ヘテロ接合性変異マウスは巨頭症、不安様行動の増加、社会行動の変化、認知障害などの自閉症様表現型を示す。*CHD8* はシナプス機能と神経発達に関連する ASD リスク遺伝子の発現を調節しており、神経前駆細胞または脳における *Chd8* 変異は、これらの遺伝子発現の調節異常を引き起こす。しかし、*Chd8* のヘテロ接合性変異が行動表現型に影響を与える責任細胞種については不明のままであった。

2. 研究の目的

種々の神経細胞において *CHD8* の機能を喪失した変異体と *CHD8* を発現誘導できるトランスジェニックマウスを作製する。これらのマウスを用いて、自閉症の発症時期、責任部位、責任細胞種を特定し、自閉症の発症メカニズムを解明することによって、新しい疾患治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

Olig1-Cre マウスと floxed *Chd8* 対立遺伝子がヘテロ接合であるマウスを交配することにより、オリゴデンドロサイト系列細胞で *Chd8* が削除されている *Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスを作製した。遺伝学、細胞生物学、組織学、および行動テストによってこれらのマウスを特徴づけた。

4. 研究成果

(1) オリゴデンドロサイト特異的 *Chd8* ヘテロ接合変異マウスは、髄鞘形成障害および神経伝導速度の低下を示す

オリゴデンドロサイト系列細胞における *CHD8* の役割を調べるために、われわれは *Olig1* プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (*Olig1-Cre* マウス) と、Floxed *Chd8* 対立遺伝子のヘテロ接合マウス (*Chd8^{+/F}* マウス) を交配することにより、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスを作製した。*Chd8^{+/F}* マウスと同様に、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスは、脳梁において髄鞘が薄く、g-ratio が高かった。蛍光免疫染色により、Caspr の染色の長さは *Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスとコントロールマウスで差がなかったが、Nav1.6 の染色の長さは *Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスで長く、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスにおいてもランビエ紋輪が広がっているこ

とが示された。さらに、コントロールマウスと比較して、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスの脳梁では、CAP 伝達の潜時が増加し、神経伝導速度が低下していた。さらに *Olig1-Cre* による *Chd8* の欠失が神経の特性に影響を与えるかどうかをさらに調べるために、コントロールおよび *Chd8* 変異 (*Chd8^{+/F}* および *Olig1-Cre/Chd8^{+/F}*) マウスにおいて、社会的行動に関連すると考えられる内側前頭前野の脳皮質の 2/3 層の錐体ニューロンの電気生理学的解析を行った。自発興奮性 (sEPSC) または自発抑制性 (sIPSC) シナプス後電流の振幅も周波数も、コントロールと *Chd8^{+/F}* マウスまたは *Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスの間で差がみられなかった。これらの結果から、内側前頭前野の錐体ニューロンの興奮性および抑制性のプレシナプスの入力とポストシナプスの特性が、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスで正常であることが示唆され、*Chd8* 変異によるオリゴデンドロサイトの自律的な異常が機能的に重要であることを強調した。

(2)オリゴデンドロサイト特異的 *Chd8* ヘテロ接合変異マウスは、*Chd8^{+/F}* マウスの異常な行動表現型を再現する

次にオリゴデンドロサイト系列細胞の CHD8 ハプロ不全が、*Chd8^{+/F}* マウスと *CHD8* 変異を有する ASD 患者の両方でみられる ASD 様行動表現型の主な原因になり得るかどうかを調べた。明暗選択箱試験を行い、不安様行動を評価した。不安は、*CHD8* 変異を含む ASD 患者でよくみられる症状の一つである。CHD8 ハプロ不全マウスを含む多くの ASD モデルマウスも不安様行動を示す。明暗選択箱試験では、*Chd8^{+/+}* マウス以外のコントロールマウスと比較して、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスでは明室の滞在時間が有意に減少していた。明室の中の移動距離は、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスで大幅に減少しており、不安様行動の増加を示した。さらに、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスでは、*Chd8^{+/+}* マウスおよび *Olig1-Cre/Chd8^{+/+}* マウスと比較して、明室と暗室の間の移行数が大幅に減少するか、もしくは減少する傾向にあった。これらの結果は、遺伝子型間の運動性の違いによるものではなく、オリゴデンドロサイトにおける CHD8 ハプロ不全が不安様行動の増加を引き起こすことを示唆した。

また、ASD の顕著な特徴である社会的相互作用の障害を評価するために行動テストを実施した。*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスでは、マウス同士の接触回数は遺伝子型間で差がなかったのに対し、一回の接触あたりの接触時間は増加する傾向があり、総接触時間は大幅に増加していた。社会的相互作用テスト中の、遺伝子型間の運動性に違いは観察されなかった。また、社交性と社会的新奇性に対する嗜好を評価するために、三部屋式社会性行動試験を実施した。三部屋式社会性行動試験では、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスとコントロールマウスは、*Chd8^{+/F}* マウスと同様に、新奇マウス (Stranger 1) に対して有意な嗜好性を示した。一方で、社会的新奇性に対する嗜好試験では、コントロール (*Chd8^{+/+}* および *Chd8^{+/F}*) マウスは、見知ったマウス (Stranger 1) よりも新奇マウス (Stranger 2) への有意な嗜好性を示したが、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスは新奇マウスへの嗜好性を示さなかった。したがって、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスは、社交性ではなく、社会的新奇性に対する嗜好に軽度の障害を示した。まとめると、これらの結果は、*Olig1-Cre/Chd8^{+/F}* マウスが *Chd8^{+/F}* マウスの行動表現型の一部を再現することを示唆した。

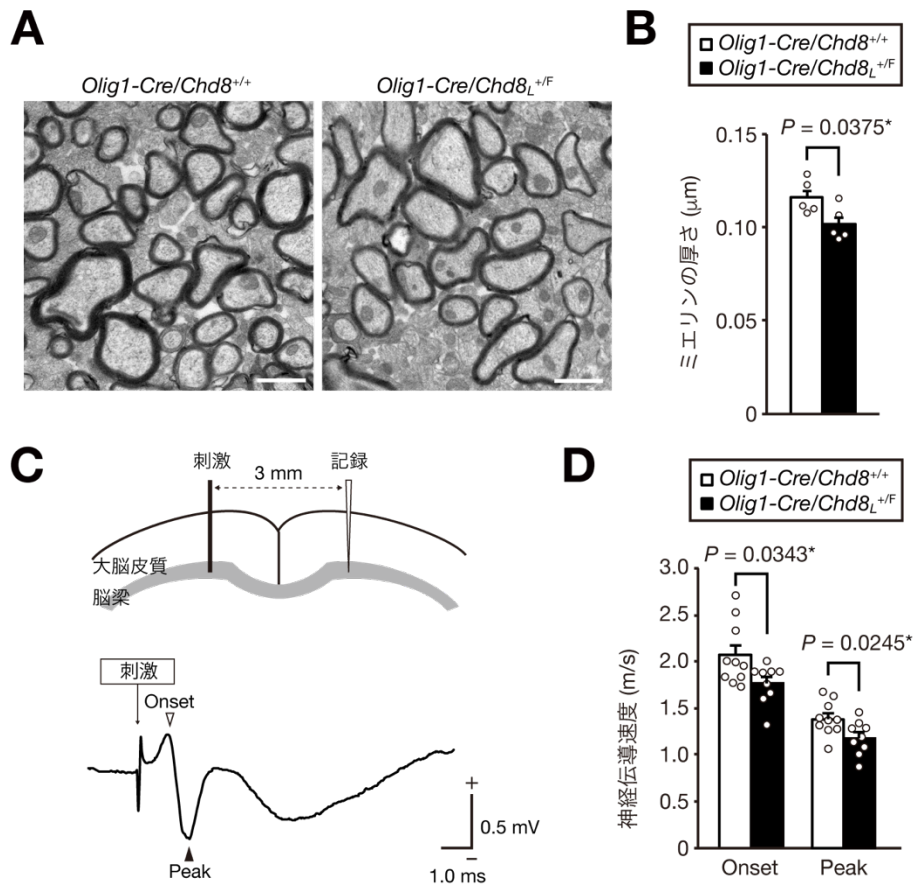


図1. オリゴデンドロサイト特異的*Chd8*ヘテロ接合体変異マウスは、髄鞘形成障害と活動電位伝達の低下を示す。

A) 9週齢の *Olig1-Cre/Chd8^{+/+}* および *Olig1-Cre/Chd8^{L+/F}* マウスの脳梁の電子顕微鏡画像。スケールバー、1 μm。

B) (A) の画像と同様の画像からそれぞれ決定された髄鞘の厚さ (n = 5、各遺伝子型について合計 450 の軸索を調べた)。*P < 0.05 (unpaired Student' s t test)

C) 脳梁の刺激および記録電極の配置、および CAP 記録の代表的なトレース。刺激と「Onset」または「Peak」との潜時を測定した。

D) 成体 *Olig1-Cre/Chd8^{+/+}* (n = 10) および *Olig1-Cre/Chd8^{L+/F}* (n = 9) マウスの脳梁における CAP の潜時と伝導速度。

データは平均±SEM で示す。*P < 0.05 (unpaired Student' s t test)。

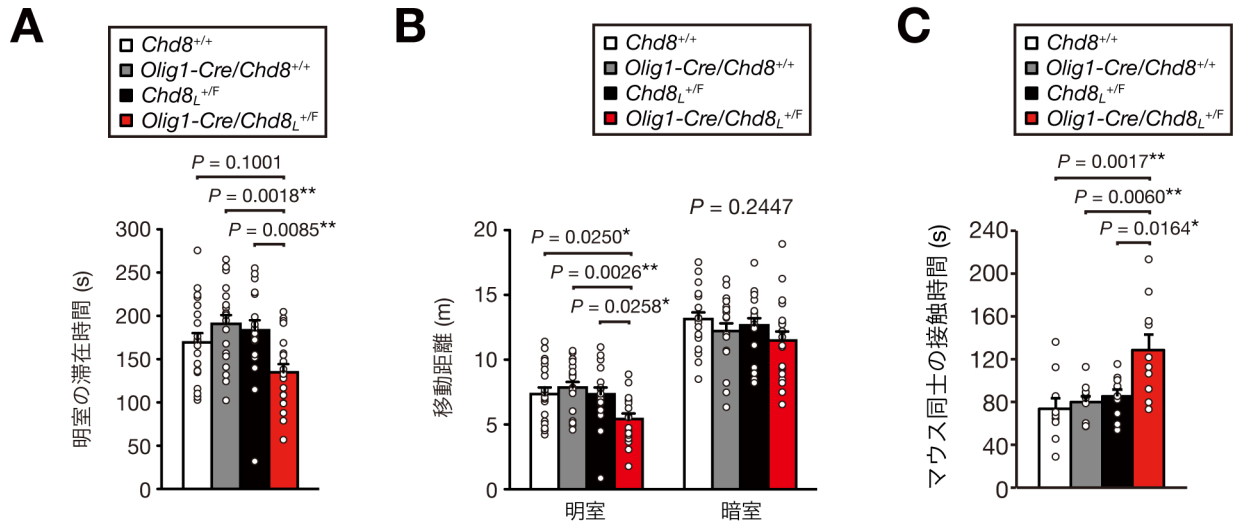


図1. オリゴデンドロサイト特異的*Chd8*ヘテロ接合体変異マウスは、不安様行動の増加と社会的行動の障害を示す。

A, B) 明暗選択箱試験のマウスにおける 10~14 週齢の雄マウスの明室での滞在時間 (A)、明室と暗室での総移動距離 (B) (n = 20)。

C) 社会的相互作用試験におけるマウス同士の総接触時間 (n = 10)。

データは平均±SEM で示す。*P < 0.05, **P < 0.01 (one-way ANOVA with Tukey' s post hoc analysis)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nita Akihiro, Muto Yoshiharu, Katayama Yuta, Matsumoto Akinobu, Nishiyama Masaaki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 34
2. 論文標題 The autism-related protein CHD8 contributes to the stemness and differentiation of mouse hematopoietic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108688 ~ 108688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawamura Atsuki, Abe Yoshifumi, Seki Fumiko, Katayama Yuta, Nishiyama Masaaki, Takata Norio, Tanaka Kenji F., Okano Hideyuki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Chd8 mutation in oligodendrocytes alters microstructure and functional connectivity in the mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 160 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00699-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawamura Atsuki, Katayama Yuta, Nishiyama Masaaki, Shoji Hiroataka, Tokuoka Kota, Ueta Yoshifumi, Miyata Mariko, Isa Tadashi, Miyakawa Tsuyoshi, Hayashi-Takagi Akiko, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 29
2. 論文標題 Oligodendrocyte dysfunction due to Chd8 mutation gives rise to behavioral deficits in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 1274 ~ 1291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddaa036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamauchi Yuhei, Nita Akihiro, Nishiyama Masaaki, Muto Yoshiharu, Shimizu Hideyuki, Nakatsumi Hirokazu, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 25
2. 論文標題 Skp2 contributes to cell cycle progression in trophoblast stem cells and to placental development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 427 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muto Yoshiharu, Moroishi Toshiro, Ichihara Kazuya, Nishiyama Masaaki, Shimizu Hideyuki, Eguchi Hidetoshi, Moriya Kyoji, Koike Kazuhiko, Mimori Koshi, Mori Masaki, Katayama Yuta, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 216
2. 論文標題 Disruption of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis promotes liver carcinogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 950 ~ 965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20180900	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kita Yasuyuki, Katayama Yuta, Shiraishi Taichi, Oka Takeru, Sato Tetsuya, Suyama Mikita, Ohkawa Yasuyuki, Miyata Keishi, Oike Yuichi, Shirane Michiko, Nishiyama Masaaki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 23
2. 論文標題 The Autism-Related Protein CHD8 Cooperates with C/EBP to Regulate Adipogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1988 ~ 2000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.04.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masaaki Nishiyama
2. 発表標題 Oligodendrocyte dysfunction due to Chd8 mutation gives rise to behavioral deficits in mice
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仁田 暁大, 武藤 義治, 片山 雄太, 松本 有樹修, 西山 正章, 中山 敬一
2. 発表標題 自閉症関連遺伝子CHD8は造血幹細胞の分化に寄与する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本 康寛, 古寺 哲幸, 福間 剛士, 中山 敬一, 西山 正章
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子CHD8の動態追跡による自閉症の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内 悠平, 仁田 暁大, 西山 正章, 武藤 義治, 清水 秀幸, 中津海 洋一, 中山 敬一
2. 発表標題 Skp2は胎盤幹細胞の細胞周期を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白石 大智, 片山 雄太, 西山 正章, 真柳 浩太, 神田 大輔, 浦 聖恵, 鯨井 智也, 胡桃坂 仁志, 中山 敬一
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子CHD8の機能異常によるASD発症の分子基盤の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川村 敦生, 片山 雄太, 西山 正章, 昌子 浩孝, 阿部 欣史, 関 布美子, 高田 則雄, 田中 謙二, 徳岡 広太, 植田 禎史, 宮田 麻理子, 伊佐 正, 岡野 栄之, 宮川 剛, 林 朗子, 中山 敬一
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子 CHD8の変異によるオリゴデンドロサイト機能異常と自閉症発症への関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山 正章
2. 発表標題 クロマチンリモデリングの可視化による自閉症の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白石 大智, 片山 雄太, 喜多 泰之, 西山 正章, 中山 敬一
2. 発表標題 CHD8機能異常による自閉症スペクトラム障害の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 喜多 泰之, 片山 雄太, 白石 大智, 岡 毅寛, 白根 道子, 西山 正章, 中山 敬一
2. 発表標題 脂肪分化におけるクロマチンリモデラーCHD8のgenome-wide解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 正章, 中山 敬一
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子CHD8の動態追跡による自閉症の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仁田 暁大, 武藤 義治, 片山 雄太, 松本 有樹修, 西山 正章, 中山 敬一
2. 発表標題 自閉症関連遺伝子CHD8は造血幹細胞の分化に関する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川村 敦生, 片山 雄太, 西山 正章, 昌子 浩孝, 徳岡 広太, 植田 禎史, 宮田 麻理子, 伊佐 正, 宮川 剛, 中山 敬一
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子CHD8の変異によるオリゴデンドロサイト機能異常と自閉症発症への関与
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本 康寛, 中山 敬一, 西山 正章
2. 発表標題 クロマチンリモデリング因子CHD8の動態追跡による自閉症の発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市原 知哉, 武藤 義治, 諸石 寿朗, 西山 正章, 片山 雄太, 中山 敬一
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼFBXL5による鉄代謝制御とその上流制御因子の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学医薬保健研究域医学系 組織細胞学
<http://ana1.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------