

## ポイント

- ・ 転写抑制因子 RP58 の変異により生じる知的障害のモデル動物として、RP58 ヘテロ欠損マウスを解析し、主に行動解析結果から、モデルマウスとしての妥当性を明らかにしました。
- ・ 上記モデルマウスを解析し、興奮性シナプス障害を発見しました。
- ・ これらの発見により、RP58 ハプロ不全の病態機序の解明、新たな予防・治療法の開発につながると考えられます。

## 研究の背景

知的障害は発達期に生じる障害で、知的能力と適応能力に制約を伴う状態であり、人口の1-3%が何らかの障害を有していると考えられています。環境、栄養、外傷、代謝、中毒など様々な原因がありますが、遺伝子変異、染色体異常という先天的な原因で生じるケースも多く、例えば、1q43-44 微小欠失症候群（注2）では、その責任遺伝子の一つとして転写抑制因子 RP58 が同定されています。また、近年、知的障害の患者の中から RP58 遺伝子自体の変異も同定されています。これらの患者では、RP58 の機能が減弱していることが想定されます。さらに、RP58 のナンセンス変異の患者が知的障害を示す症例が報告され、RP58 ハプロ不全が知的障害の原因になることが明らかとなりました。

一方、私たちは、これまでモデル動物を用いて RP58 遺伝子の脳での機能解析を行ってきました。RP58 は BTB ドメインと Zn フィンガーモチーフを持つ転写抑制因子ですが、胎仔期から大脳皮質に高発現し、大脳皮質のグルタミン酸作動性ニューロンの分化、放射状移動、成熟に必須のタンパク質であることを明らかにしています。そして、RP58 の転写抑制の標的遺伝子として、Id1-4, Ngn2, Rnd2 を同定してきました。RP58 の完全欠損マウスは、大脳皮質形成不全を示し、出生直後致死ですが、ヘテロ欠損マウスでは出生時、著明な変化がなく、これまで異常は検出できませんでした。しかし、今回、RP58 ハプロ不全のモデル動物として RP58 ヘテロ欠損マウスを詳細に解析したところ、成体で、脳梁形成不全、行動異常、シナプス異常を見出すことに成功しました。従って、RP58 は発現量が減少することで、個体の生存には問題ないものの、シナプス障害が見られ、認知機能低下を伴う行動障害が引き起こされると考えられます。

## 研究の内容

RP58 ハプロ不全は、RP58 遺伝子の欠失やミスセンス変異、ナンセンス変異のために、RP58 の機能が不十分になることが原因で、知的障害を含む神経発達症（発達障害）を生じると考えられています。本研究では、RP58 ハプロ不全がシナプス異常を示すことについて、モデルマウスを用いて実証しました。つまり、RP58 ヘテロ欠損マウスは、認知機能障害を示し、知的障害に相当する行動特性を示しました。このモデルマウスは、その他、脳梁形成不全、グルタミン酸受容体発現低下、NMDA 受容体応答不全、興奮性スパイン成熟不全を示しました。

主な研究成果は以下の4点です（図1）。

- (1) RP58 ハプロ不全のモデル動物として、RP58 ヘテロ欠損マウスを作製しました  
RP58 ヘテロ欠損マウスでは RP58 の発現が mRNA、蛋白、共に半減していました。  
クリューバーバレル染色で、脳梁の尾側の形成不全を見出しました。その他の脳の構造に著明な変化は見出せませんでした。また、大脳皮質層形成を浅層マーカ

Satb2、深層マーカ Ctip2 の染色で検証しましたが、有意な変化は見られませんでした。

(2) 上記モデルマウスの行動解析を行い、知的障害類似異常を見出しました

具体的には、自発的な活動性の亢進、不安亢進、運動学習能低下、ワーキングメモリ低下が明らかになりました。また、水迷路テストでは、空間学習能は正常でしたが、逆転学習能の低下が見出され、認知記憶能の柔軟性の低下が示唆されました。これらの結果は、知的機能の低下、適応能力の低下に相当すると考えられます。RP58 ハプロ不全患者では、軽度から重度の知的障害、運動発達遅延、注意欠陥多動性障害、自閉的行動、常同行動などを示します。本モデルマウスは、患者で見られる症状とおおむね共通と想定される行動特性を示すことから、本疾患のモデルマウスとして妥当と考えられます。

(3) 作製したモデルマウスは、グルタミン酸シグナル伝達の異常を示しました

大脳皮質のウエスタンブロット解析により、AMPA 受容体 GluA1-4 の中で GluA1 のみ半減しています。NMDA 受容体では、GluN1 及び GluN2B には変化はなく、成熟したスパインに発現する GluN2A は半減していました。一方、多くのニューロンに存在する NeuN、グルタミン酸作動性シナプス後部に存在する足場タンパク質 Homer、シナプス前部に存在する VGluT1 に変化はありませんでした。

さらに、上記の脳のシナプス機能を解析し、NMDA 受容体応答不全、シナプス長期増強の飽和度の低下を見出しました。具体的には、海馬のスライスを作製し、CA1 錐体細胞の電気生理学的解析により、AMPA 受容体を介した興奮性シナプス後電位のシナプスの入力-出力関係は正常であること、また、ペアパルス比、頻回刺激による応答増強に変化はありませんでした。このことから、シナプス前部からのグルタミン酸放出に変化はないことが示されました。パッチクランプ膜電位固定法により NMDA 受容体と AMPA 受容体応答の比率に変化はありませんが、NMDA 受容体を介するシナプス後電流量が、最も大きくなる膜電位において、低下していることを見出しました。そこで、NMDA 受容体が関与する長期増強を調べたところ、頻回刺激 1 回による長期増強には差がありませんが、頻回刺激を繰り返した場合、長期増強がより低率で飽和してしまうことを見出しました。これは、記憶学習の可塑性の容量が小さいことを示し、可塑性低下の基盤になっていることが示唆されます。

(4) 樹状突起のスパイン形態を解析したところ、成熟スパインの形態異常が見出されました (図 2)

スパインの形態を見るために一部のニューロンだけに蛍光タンパク質 GFP が発現するマウス (Thy 1-GFP マウス) を用いて解析しました。海馬の CA1 錐体細胞のスパイン密度に変化はありませんでした。スパインの長さとお頭の幅で 4 タイプにスパインを分類しても、4 タイプの比率に変化はありませんでした。しかしスパインお頭の幅の大きいタイプ (太いスパイン) 同士で比較すると、RP58 ヘテロマウスではスパインお頭の幅がより小さく、スパインの長さがより短いことが明らかとなりました。一方、スパインお頭の幅が小さいタイプ (細いスパイン) 同士の比較では差はありません。スパインお頭の幅の大きいタイプにはマッシュ

ルーム型、スタップ型という成熟型スパインと考えられているスパインが含まれていることから、成熟スパインの形態異常と考えられます。

### 社会的意義・今後の展望

RP58の発現量の不足が認知機能低下を引き起こすことが実証され、その原因として、興奮性ニューロンの興奮性シナプスのスパイン成熟不全であることが示唆されました。このことは、RP58ハプロ不全患者の認知機能障害の予防法、治療法の開発の糸口になると期待されます。しかし、RP58発現低下がどのようなメカニズムでシナプス機能不全を引き起こしているか、その機序は不明です。今後、RP58の標的遺伝子を同定することにより、その機序を解明することが希求され、その際にこのモデルマウスが有用と考えられます。

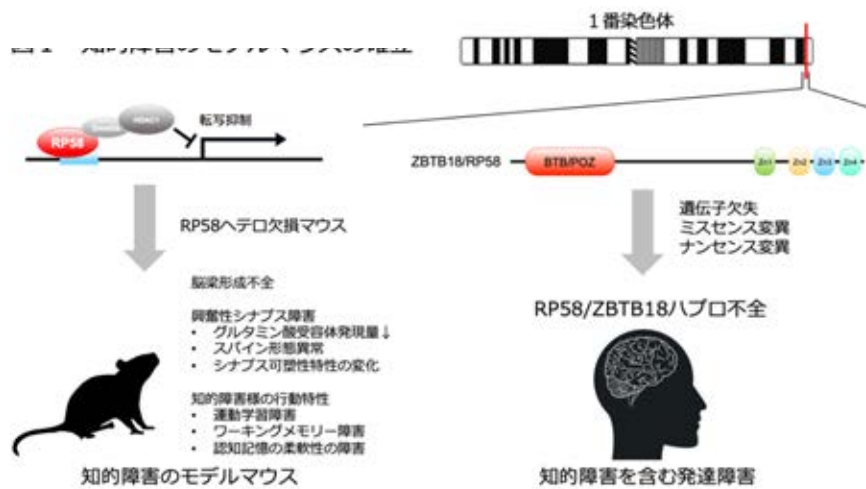


図1 知的障害のモデルマウスの確立

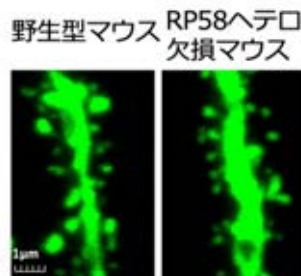


図2 スパインの形態

#### <用語解説>

(注2) 1q43-44微小欠失症候群

サブテロメア微細欠失症候群の一つである。脳梁異常、筋緊張低下、小頭症、成長障害及び多様な顔面異形を頻繁に併発する知的発達障害を特徴とする。常染色体顕性(優性)知的発達障害22(MRD22)であり、1q43-44領域のZBTB18(別名RP58, ZNF238)遺伝子、AKTセリン/スレオニンキナーゼ3(AKT3)遺伝子、ヘテロ核リボヌクレオタンパク質U(HNRNPU)遺伝子、CEP170遺伝子等のハプロ不全が原因と考えられる。

本研究は、当研究所の旧神経細胞分化プロジェクト、睡眠プロジェクト、脳代謝制御グループ、脳神経回路形成プロジェクト、体内時計プロジェクト及び国立精神神経医療研究センター、神奈川県立こども医療センター臨床研究所、日本大学歯学部との共同研究です。

**<本研究の主な助成事業>**

日本学術振興会（JSPS）科学研究費基金・基盤研究（B）「脳高次機能の発達と老化の制御に共通する分子機構の解明」（18H02537）、「脳老化を抑制する転写抑制因子RP58とそのメカニズムの解析」（22H02729）（以上、岡戸）、（19K08033, 18KK0442）, and Intramural Research Grant (3-1) for Neurological and Psychiatric Disorders provided by the National Center of Neurology and Psychiatry, Japan（以上、三輪）の支援を受けました。