

平成 29 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14963

研究課題名(和文)活動する患者由来アストロサイトを用いた自閉スペクトラム症候群の分子病態研究

研究課題名(英文)Molecular pathological analysis of ASD-related gene products in astrocytes

研究代表者

中澤 敬信(Nakazawa, Takanobu)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：00447335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが同定した自閉症と関連する以下の遺伝子について、遺伝子産物の機能や変異の表現型を明らかにした。

(1) POGZ遺伝子の自閉症との関連性が示唆されているQ1042R変異によりPOGZとDNAとの会合が50%程度まで減少することを初めて明らかにした(Matsumura et al., J. Mol. Psy. 2016)。また、POGZが神経系細胞の発達に關与する遺伝子群を制御していることを明らかにした。

(2) 複数家系の自閉症患者から変異が同定されているASD23遺伝子について、アストロサイトに高発現していること、および神経系の発達を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The molecular etiology of autism spectrum disorder (ASD) remains poorly understood. Recent studies have found that de novo mutations are likely to be linked to the risk of ASD. Particularly, genes with highly recurrent de novo possible loss-of-function mutations play key roles in ASD. Our laboratory have recently found that several genes, including POGZ and ASD23 have de novo possible ASD-associated mutations. Despite the apparent importance, these mutations have not been functionally analyzed. In this study, we analyzed the functions of these ASD-associated genes as well as the biological significance of these de novo mutations. We found that POGZ regulates neuronal development and that ASD-associated de novo mutations in the POGZ disrupt its DNA-binding activity. Regarding ASD23 gene, we found that ASD23 is highly expressed in astrocytes and regulates neuronal development. These findings provide important insights into the molecular basis of ASD.

研究分野：分子神経科学

キーワード：自閉スペクトラム症 分子病態 iPS細胞 神経細胞の発達 ニューロン アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症(以下、自閉症)は社会的相互作用やコミュニケーションの障害を主な症状とする神経発達障害であり、発症割合は100人に1人程度と近年増加傾向にある(Ronemus M., Nat. Rev. Genet., 2014)。その発症脆弱性には遺伝・環境要因の相互作用による機序等が推定されているものの、詳細は未解明である。また、一般にヒト脳へのアクセスは著しく困難であり、患者脳を対象とした分子病態研究は世界的に進んでいないこともあり、自閉症に有効な治療薬は極めて少なく、不十分な状況にある。そのため、自閉症の分子メカニズムの解明と新たな分子メカニズムに立脚した創薬が求められている。これまで遺伝性の自閉症患者の遺伝子解析が精力的に行われてきており、MeCP2 や Neuroligin 等の疾患関連遺伝子が同定されてきた。近年、自閉症患者に多くの孤発例が報告されたことから、遺伝学的なアプローチのみならず、新たなアプローチによる原因解明の必要性が指摘されている(Schaaf C., Neuron, 2011)。

遺伝性の変異は選択圧を受けて自然淘汰される一方で、健常者両親には存在せず患者に生じる突然変異(*de novo* 変異)は選択圧を受けず、孤発性自閉症の発症に大きく寄与すると考えられる。また、受精時の父親の年齢が高いことが *de novo* 変異のリスクになる可能性など、環境的要因が *de novo* 変異を生じ得ることが報告されており(Kong A., Nature, 2012 他) *de novo* 変異研究は孤発性の自閉症の原因解明に有効であると考えられている。近年、*de novo* 変異研究が盛んに行われ、自閉症患者から多くの *de novo* 変異が同定されている(Sanders S., Neuron, 2015; Krumm N., Nat. Genet., 2015 他)。

2. 研究の目的

自閉症の発症機構の多くは不明で、治療効

果も不十分であり、生物学的理解の進展が焦点の課題である。申請者らはこれまで、「独自に収集した」自閉症患者に認められる患者特異的 *de novo* 変異を疾患感受性候補遺伝子として、解析を行ってきた。その過程で、4つのアストロサイトにはほぼ特異的に発現する候補遺伝子群を見いだしている。アストロサイトは神経機能の調節に重要であるが、病態における役割はほとんど解析されていない。自閉症の分子病態の解明には、患者と同じ遺伝的背景の細胞を解析することが重要であると考え、本研究では、iPS 関連技術を用いて当該変異を持つ患者のアストロサイトを樹立・解析し、自閉症の分子病態の一端を明らかにするとともに、創薬研究や疾患治療に橋渡しすることをめざす。

3. 研究の方法

本研究では、申請者らによって「すでに同定している」患者特異的な *de novo* 変異をもつ疾患感受性候補遺伝子群の生物学的意義を“活動する”患者アストロサイトや神経細胞を用いて明らかにする。具体的には、疾患感受性候補遺伝子群の発現低下(およびその *de novo* 変異)によるアストロサイトのシナプス機能調節機能(グルタミン酸代謝、シナプス機能を調節する液性因子の放出)に異常が生じるか検討する。解析のための iPS 細胞からアストロサイトを分化させる技術基盤の改良も併せ実施し、同一患者の神経細胞(すでに技術基盤は確立済み)とアストロサイトの両者の樹立を行い、共培養し機能解析に供する。疾患感受性候補遺伝子群の詳細な機能解析はマウスの神経系細胞も用いて実施する計画である。

4. 研究成果

(1) *POGZ* 遺伝子の自閉症との関連性が示唆されている Q1042R 変異の意義を明らかにすることを目的として、野生型 *POGZ*、Q1042R 変異 *POGZ*、および他の研究グループより報告

された R1008X 変異型 POGZ の DNA 結合能を評価したところ、Q1042R 変異で DNA との会合が 50% 程度まで減少することが明らかになった (Matsumura et al., J. Mol. Psy. 2016)。POGZ 遺伝子の *de novo* 変異の表現型の報告としては初めてのものである。POGZ の機能はほとんど不明であるが、DNA の転写に関与している可能性が考えられた。Q1042R 変異により DNA に結合できなくなり、転写機構に異常をきたすことが示唆されたことから、iPS 神経細胞やアストロサイトを用いた発現解析も併せて実施し、POGZ が細胞の発達を制御する遺伝子群を制御している可能性があることを明らかにした。

(2) アストロサイトに高発現している ASD23 遺伝子 (Ser183Asn) 産物の脳における機能はほとんど不明である。*in utero* エレクトロポレーション法により、ASD23 遺伝子をマウス胎児神経系細胞に導入したところ、ASD23 遺伝子が神経細胞の発達過程に関与していることを明らかにした。さらに、同定した Ser183Asn 変異の意義を明らかにすることを目的として、*in utero* エレクトロポレーション法を用いた実験を実施したところ、野生型 ASD23 遺伝子のみならず変異型 ASD23 遺伝子の過剰発現で、ASD23 ノックダウンによる神経発達の異常が回復することが明らかになった。ASD23 遺伝子に同定した Ser183Asn 変異の表現型解析は別な系を用いることが必要であることが明らかになったため、次に、ASD23 遺伝子産物の自己リン酸化と Ser183Asn 変異との相関を解析したところ、Ser183Asn 変異 ASD23 遺伝子産物の自己リン酸化レベルは野生型のリン酸化レベルと変わらないことが示唆された。

(3) 自閉症と神経系細胞の発達との関連性を解析することを目的として、これまで研究してきた POGZ や ASD23 遺伝子のみならず、複数個の *de novo* 変異が同定されている遺伝子群 (CHD8, ARID1B, SYNGAP1, DYRK1, SCN2A1,

ANK2, ADNP, DSCAM, CHD2, KDM5B) の神経系細胞の発達過程における発現パターンを解析したところ、ほとんどの遺伝子が胎生期 E14~18 日で高発現していることが明らかになった。また、生後においても発現していることも明らかになった。

(4) iPS 細胞を用いてアストロサイト特異的転写因子群の強制発現を行い、iPS 細胞からアストロサイトへの分化系の改良を試みた。神経細胞の Ngn2 のような転写因子単独発現による分化系の構築をめざしたが、アストロサイト特異的な転写因子群の単独での過剰発現では、アストロサイトに効率良く分化させることはできなかった。培地の改良や複数個の転写因子群の発現、もしくは miRNA の強制発現が必要であることが示唆された。

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9件)

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Watanabe S, Umehara H, Shimodera S, Nakazawa T, Kikuchi M, Nakaya A, Hashimoto H, Imoto I, Hashimoto R, Ohmori T. Effect of clozapine on DNA methylation in peripheral leukocytes from patients with treatment-resistant schizophrenia. Int. J. Mol. Sci. 査読有、18、2017、632

DOI: 10.3390/ijms18030632

Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell

line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophr. Res.* 査読有、181、2017、75-82
DOI: 10.1016/j.schres.2016.10.012

Kasai A, Kakihara S, Miura H, Okada R, Hayata-Takano A, Hazama K, Niu M, Shintani N, Nakazawa T, Hashimoto H. Double in situ hybridization for microRNAs and mRNAs in brain tissues. *Frontiers Mol. Neurosci.* 査読有、9、2016、126
DOI: 10.3389/fnmol.2016.00126

Seiriki K, Kasai A, Kuwaki T, Nakazawa T, Yamaguchi S, Hashimoto H. Critical involvement of the orbitofrontal cortex in hyperlocomotion induced by NMDA receptor blockade in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有、480、2016、558-563
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.089

Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. *eNeuro* 査読有、3、2016、0110-16
DOI: 10.1523/ENEURO.0110-16.2016

Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T, Kanoh T, Ago Y, Matsuda T, Hashimoto R, Ohi K, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Kasai A, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Takuma K, Ogawa A, Baba A, Hashimoto H. Prostaglandin D₂ signaling mediated by

the CRTH2 receptor is involved in MK-801-induced cognitive dysfunction. *Behav. Brain Res.* 査読有、314、2016、77-86

DOI: 10.1016/j.bbr.2016.07.050.

Matsumura K, Nakazawa T, Nagayasu K, Gotoda-Nishimura N, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Yamamori H, Yasuda Y, Hashimoto R, Hashimoto H. *De novo* POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of POGZ. *J. Mol. Psychiatry* 査読有、4、2016、1

DOI: 10.1186/s40303-016-0016-x

Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y, Tanimura A, Hashimoto Y, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda-Yano S, Kiyama Y, Konno K, Inoue T, Yokoyama K, Inoue T, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, Hashimoto H, Watanabe M, Manabe T, Yamamoto T, Takeda M, Kano M. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *Nat. Commun.* 査読有、7、2016、10594

DOI: 10.1038/jhg.2015.141

Hashimoto R, Nakazawa T, Tsurusaki Y, Yasuda Y, Nagayasu K, Matsumura K, Kawasaki H, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Fujino H, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Takeda M, Matsumoto N, Hashimoto H. Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder. *J. Hum. Genet.* 査読有、61、2016、199-206

DOI: 10.1038/jhg.2015.141

[学会発表](計7件)

橋本 均、笠井 淳司、中澤 敬信、CNS
創薬を支援する疾患モデルの開発、日本
安全製薬理研究会 第 8 回学術年会、東京
都文京区 東京大学講堂、2017 年 2 月 11
日

Nakazawa T, Matsumura K, Nagayasu K,
Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N,
Takuma K, Yamamori H, Yasuda Y,
Hashimoto R, Hashimoto H、
ASD-associated *de novo* mutations in
POGZ impair the DNA-binding activity of
POGZ、55th Annual Meeting, ACNP、
Diplomat Resort & Spa, Hollywood,
Florida, Hollywood FL USA、2016年12月
06日

岩田 晋平、松村 憲佑、永安 一樹、
馬場 優志、笠井 淳司、早田 敦子、
新谷 紀人、田熊 一敞、中澤 敬信、
橋本 均、統合失調症関連遺伝子のマウ
ス脳における発現解析、第 130 回日本薬
理学会近畿部会、京都府京都市 京都大
学講堂、2016 年 11 月 19 日

沼田 周助、菊地 正隆、中澤 敬信、
橋本亮太、iPS 細胞を用いたクロザピン
反応性のメチル化解析、第 26 回 日本臨
床精神神経薬理学会、大分県大分市 ホ
ルトホール大分、2016 年 11 月 18 日

中澤 敬信、橋本 亮太、橋本 均、iPS
細胞関連技術を用いた統合失調症患者の
クロザピン応答性の個人間の相違の分子
機構解析、第 46 回 日本神経精神薬理学
会年会、韓国ソウル市 COEX、2016 年 7
月 2 日

藤原 幹也、菊地 正隆、永安 一樹、
中澤 敬信、山森 英長、笠井 淳司、
早田 敦子、新谷 紀人、藤本 美智子
安田 由華、石川 充、赤松 和土、岡
野 栄之、中谷 明弘、橋本 均、橋本
亮太、iPS 細胞関連技術を用いたクロザ
ピン応答性の分子基盤解析、第 89 回 日
本薬理学会年会、神奈川県横浜市 パシ
フィコ横浜、2016 年 3 月 11 日

松村 憲佑、橋本 亮太、中澤 敬信、

鶴崎 美徳、安田 由華、永安 一樹、
川島 和、山森 英長、藤本 美智子、大
井 一高、梅田 知美、福永 雅喜、藤
野 陽生、笠井 淳司、早田 敦子、新
谷 紀人、武田 雅俊、松本 直通、橋
本 均、自閉症の疾患特異的候補遺伝子
の機能的スクリーニング、第 38 回日本神
経科学会大会、兵庫県神戸市、神戸国際
会議場、2015 年 7 月 28 日

〔その他〕

ホームページ

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pharm/>

<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 敬信 (NAKAZAWA, Takanobu)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：00447335

(3) 連携研究者

橋本 均 (HASHIMOTO, Hitoshi)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30240849

橋本 亮太 (HASHIMOTO, Ryota)
大阪大学・大学院連合小児発達学研究
科・准教授
研究者番号：10370983

栗生 俊彦 (KURIU, Toshihiko)
徳島文理大学・薬学部・講師
研究者番号：10401374