

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：83902

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15399

研究課題名(和文) 知的障害・自閉性障害モデルにおけるシナプス機能のライブイメージング

研究課題名(英文) Live-imaging of synapses in the model system of neurodevelopmental disorders

研究代表者

永田 浩一 (Nagata, Koh-ichi)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・部長

研究者番号：50252143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：自閉性障害(ASD)や知的障害(ID)におけるシナプス障害の分子メカニズムやダイナミクスは殆ど判っていない。そこで共焦点顕微鏡を利用して初代培養海馬神経細胞におけるシナプス動態の *in vitro* ライブイメージ解析を行った。特に、シナプスの構造を、1) スパイン初期形成、2) スパインの経時的形態変化、3) スパイン密度変化、の3要素に分け、シナプス障害がIDやASDを引き起こす構造基盤のダイナミックな実体の一端をライブイメージで明らかにした。加えて、電気穿孔法を応用してマウスの海馬神経細胞へ各種ベクターを導入し、シナプスの構造・形態変化を *in vivo* でライブイメージ解析する技術開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：Functional and structural defects in Synapses are essential for the pathophysiology of autism-spectrum disorder (ASD) and intellectual disability (ID). In the present study, we performed *in vitro* live-imaging analyses of synapses in cultures mouse hippocampal neurons. Especially, we observed synaptic structure from the points of 1) spine formation, 2) temporal change of spine morphology and 3) spine density. By knockdown of ASD- or ID-related genes such as small GTPases, we clarified the possible involvement of gene abnormalities in the pathophysiology of ASD and ID. We also tried to set up the experimental system for *in vivo* analyses of spine dynamics.

研究分野：神経発達障害の分子生物学解析

キーワード：シナプス ライブイメージング 自閉性障害 知的障害 神経細胞

## 1. 研究開始当初の背景

自閉性障害(ASD)は、社会性・言語やコミュニケーション能力の発達障害、および常同性を主たる症状とする発達障害で、半数が知的障害(ID)を合併する。ASDとIDの発症の基本メカニズムは他の発達障害と共通性があり、脳高次機能に対応する神経回路(シナプス)発達の異常と考えられる。実際、ASDやIDの病因・病態関連遺伝子は既に数百も報告されているが、シナプス形成・維持に関係する機能を持つ遺伝子が多い。これらの事実も、ASDやIDが、シナプスの機能・形態的異常(神経回路形成・維持不全)を背景とする「シナプス病」である可能性を示す。しかしながら、ASDやIDにおけるシナプス障害の実体は殆ど不明であり、シナプス・ダイナミクスに関する時間空間的な解析も殆どなされていない。

私どもは、1)電気穿孔遺伝子導入法を用いてマウス胎仔脳に遺伝子やsiRNAを導入し、2)その後、大脳皮質スライスを作製し、3)そのスライスを共焦点レーザー顕微鏡下で培養しながら長時間ライブイメージ観察することで、大脳皮質形成過程を細胞レベルで詳細に解析している。この手法を用いて最近、幾つかのASD/ID病因遺伝子の機能を解析し、大脳皮質形成(神経細胞の移動・局在と形態)と神経軸索伸長の異常への関与の実態を報告した。このような成果を基礎にして、発達期の神経細胞移動・形態のライブイメージング技術を「シナプス動態の可視化」に応用して、ASDとIDの研究に新たな視座を導入しようと考えて本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

ASDやIDの病態にはシナプス構造・機能障害が重要な役割を果たす。しかし、シナプス障害の分子病態メカニズムやダイナミクスは殆ど判っていない。そこで本研究では、共焦点レーザー顕微鏡下での培養・動画撮影を応用して初代培養海馬神経細胞におけるシナプス動態の*in vitro*ライブイメージ解析を行う。特に、シナプスの構造を、1)スパイン初期形成、2)スパインの経時的形態変化、3)スパイン密度変化、の3要素に

分け、シナプス障害がIDやASDを引き起こす構造基盤のダイナミックな実体をライブイメージで明らかにする。加えて、電気穿孔法を応用してマウスの海馬神経細胞へ各種ベクターを導入し、シナプスの構造・形態変化を*in vivo*でライブイメージ解析する技術を開発し、ASDやIDでのシナプス病態の包括的形態解析を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

共焦点レーザー顕微鏡観察下で初代培養マウス海馬神経細胞のシナプス動態の*in vitro*ライブイメージ観察を遂行することにより、ASDとIDの病因・病態関連遺伝子がシナプス動態に与える影響を画像解析した。モデル遺伝子として選定したASD/ID原因遺伝子RBFOX1(スプライス制御因子をコードする)のノックダウンや変異体の発現が、シナプス形成の異常を引き起こすかどうかを、スパイン伸長・形成/退縮・密度に着目しながら*in vitro*で観察した。得られた結果を、固定標本における形態変化の表現系と比較解析した。また、電気穿孔遺伝子導入法と共焦点レーザー顕微鏡ライブイメージングを複合的に組み合わせた*in vivo*シナプス動態観察法の構築を試み、遺伝子異常がシナプス動態に及ぼす影響をマウス個体・組織レベルで時間的・空間的にライブイメージ解析した。

## 4. 研究成果

RBFOX1遺伝子の欠失や重複は、ASD、ID、てんかん等の発達障害の原因となる。しかしRBFOX1の機能不全がシナプス形成の異常を惹起するメカニズムやシナプス形成障害の実態については不明である。私共は本研究において、発達期の脳皮質シナプス形成におけるRBFOX1の機能を解析するために、共焦点顕微鏡ライブイメージングによる時間空間的解析を行った。最初に、初代培養マウス海馬神経細胞を用いて、RBFOX1発現抑制がシナプス形態に及ぼす影響を固定標本で観察するとともにライブイメージ観察した。その結果、固定切片と同様にライブイメージ観察でもRBFOX1発現抑制細胞では、成熟型スパイン

の密度が現象し、未成熟スパイン（分枝型、フィロポディア型）の密度が増加していた。しかしながら、固定切片と異なり、ライブイメージでは動的なスパインの動きを如何に定量化するかという問題が生じた。ライブイメージングでは、細胞ごと、さらには同一細胞においても樹状突起の部位ごとに「動的変化」の差が見られたため、定量方法の確立が必要となった。

さらに、子宮内胎仔脳遺伝子導入法により RBFOX1 を発現抑制した脳切片の in vivo ライブイメージングを試行した。切片中の神経細胞は非常に脆弱であるため、培地や CO2 濃度を調整して至適実験条件を設定した。RBFOX1 を発現抑制した大脳皮質神経細胞では、発達期において樹状突起の分岐が減少し、対側に伸びる軸索の伸長も抑制された。さらに、スパイン形成障害がシナプス機能障害を引き起こすことを、電気生理学手法で明らかにした。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計18件)

研究代表者 永田浩一

すべて査読あり。\*責任著者

- (1) Hamada N, Mizuno M, Tomita H, Iwamoto I, Hara A, \*Nagata K: Expression analyses of Dusp22 (Dual-specificity phosphatase22) in mouse tissues.  
*Med. Mol. Morphol.* In press
- (2) Ito H, Mizuno M, Noguchi K, Morishita R, Iwamoto I, Hara A, \*Nagata K: Expression analyses of Phactr1 (Phosphatase and actin regulator 1) during mouse brain development.  
*Neurosci. Res.* 128:50-57, 2018.
- (3) Ishizuka K, Tabata H, Ito H, Kushima I, Yoshimi A, Usami M, Watanabe K, Morikawa M, Uno Y, Okada T, Mori D, Aleksic B, Ozaki N, \*Nagata K: Possible involvement of a cell adhesion molecule, Migfilin, in brain development and pathogenesis of autism spectrum disorders.  
*J. Neurosci. Res.* 96(5):789-802, 2018.
- (4) Iwai R, Tabata H, Inoue M, Nomura K, Okamoto T, Ichihashi M, Nagata K, Mizutani K: A Prdm8 target gene Ebf3 regulates multipolar-to-bipolar transition in migrating neocortical cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 495:388-394, 2018.
- (5) Hamada N, Negishi Y, Mizuno M, Miya F, Hattori A, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Tabata H, Saitoh S, \*Nagata K: Role of a heterotrimeric G-protein, Gi2, in the corticogenesis: Possible involvement in periventricular nodular heterotopia and intellectual disability.  
*J. Neurochem.* 140: 82-95, 2017.
- (6) Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo F.E, Tabata H, Yamagata T, \*Nagata K: Role of a circadian-relevant gene, NR1D1, in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorders.  
*Sci. Rep.* 7:43945, 2017.
- (7) Inoue M, Iwai R, Tabata H, Konno D, Komabayashi-Suzuki M, Watanabe C, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Matsuzaki F, Nagata K, Mizutani K: Prdm16 is critical for progression of the multipolar phase during neural differentiation of the developing neocortex.  
*Development* 144: 385-399, 2017.
- (8) Oshikawa M, Okada K, Tabata H, Nagata K, Ajioka I: Dnmt1-dependent Chk1 pathway suppression is protective against neuron

- division. *Development* 144: 3303-3314, 2017.
- (9) Hamada N, Iwamoto I, Tabata H, \*Nagata K: MUNC18-1 gene abnormalities are involved in neurodevelopmental disorders through defective cortical architecture during brain development. *Acta Neuropathol. Comm.* 5: 92, 2017.
- (10) Hamada N, Ito H, Nishijo T, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H, Momiyama T, \*Nagata K: Essential role of the nuclear isoform of RBFOX1, a candidate gene for autism spectrum disorders, in the brain development. *Sci. Rep.* 6: 30805, 2016.
- (11) Ito H, Morishita R, \*Nagata K: Schizophrenia susceptibility gene product dysbindin-1 regulates the homeostasis of cyclin D1. *BBA-Molecular Basis of Disease* 1862:1383-1391, 2016.
- (12) Inaguma Y, Matsumoto A, Noda M, Tabata H, Maeda A, Goto M, Usui D, Jimbo F.E, Kikkawa K, Ohtsuki M, Momoi YM, Osaka H, Yamagata T, \*Nagata K: Role of Class III phosphoinositide 3-kinase in the brain development: possible involvement in specific learning disorders. *J. Neurochem.* 139: 245-255, 2016.
- (13) Inaguma Y, Ito H, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H, \*Nagata K: Morphological characterization of Class III phosphoinositide 3-kinase during mouse brain development. *Med. Mol. Morphol.* 49(1), 28-33, 2016.
- (14) Yuan Q, Yang F, Xiao Y, Tan S, Husain N, Ren M, Hu Z, Martinowich K, Ng J S, Kim PJ, Han W, Nagata K, Weinberger DR, H. Je S: Regulation of BDNF exocytosis and GABAergic interneuron synapse by the schizophrenia susceptibility gene dysbindin-1. *Biol. Psychiatry* 80: 312-322, 2016.
- (15) Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo F E, Kojima K, Nagata K, Iwamoto S, Yamagata T: Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. *Brain & Dev.* 38: 91-99, 2016.
- (16) Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H and \*Nagata K: Role of the cytoplasmic isoform of RBFOX1/A2BP1 in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *Mol. Autism* 6:56, 2015.
- (17) Lee S-A, Kim S-M, Suh B K, Sun H-Y, Park Y-U, Hong J-H, Park C, Nguyen M D, Nagata K, Yoo J-Y and Park S K: *Disrupted-in-schizophrenia 1* (DISC1) regulates dysbindin function by enhancing its stability. *J. Biol. Chem.* 290: 7087-7096, 2015.
- (18) Inaguma Y, Ito H, Hara A, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H and \*Nagata K: Morphological characterization of mammalian Timeless in the mouse brain development. *Neurosci. Res.* 92: 21-28, 2015.
- [学会発表](計5件)  
招待講演のみ抜粋
- (1) Nagata K: Comprehensive analyses of causative genes for ASD with in utero electroporation technique. International Symposium on Autism 2017, October 14, 2017, Kuala Lumpur, Malaysia.

(2) Nagata K: Comprehensive analyses of Rbfox1, a causative gene for neurodevelopmental and psychiatric diseases, in the brain development. The 14<sup>th</sup> Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry Symposium "Common molecular aspects of neurodevelopmental and psychiatric disorders." August 27-30, 2016, Kuala Lumpur, Malaysia.

(3) Nagata K: Comprehensive approach to understand pathophysiological role of SIL1, a gene causing intellectual disability. The 25<sup>th</sup> Meeting of International Society for Neurochemistry Symposium "Harnessing Human Genetics to Define the Biochemical Pathways involved in Brain Development." August 23-27, 2015, Cairns, Australia

(4) Hamada N, Ito H, Tabata H, Nagata K; Comprehensive approach with an analytical battery to understand pathophysiological role of A2BP1/Rbfox1, a "hub" gene in the ASD gene transcriptome network. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Pathways of Neurodevelopmental Disorders." March 16-20, 2015, Tahoe City, California, USA

(5) 浜田奈々子, 伊東秀記, 田畑秀典, 永田浩一: Rbfox1, an autism causal gene, plays an essential role in cortical development. 日本神経化学会大会シンポジウム (大宮)2015.9.11.

〔図書〕(計1件)

(1) Ito H, Morishita R, Tabata H, Nagata K: **Methods in Cell Biology (Septins)** (A. S. Gladfelter Ed.) Visualizing septin and cell dynamics in mammalian brain slices. Elsevier Vol.136 Chapter 17, pp.295-309, 2016.

〔総説〕(計3件)

(1) 浜田奈々子, 稲熊裕, \*永田浩一: 発達障害の背景としての大脳皮質構築異常 **生化学** 87(2): 205-208, 2015

(2) Tabata H, Nagata K: Decoding the molecular mechanisms of neuronal migration using in utero electroporation. *Med. Mol. Morphol.* 49: 63-75, 2015

(3) Ito H, Morishita R, \*Nagata K: Autism spectrum disorder-associated genes and the development of dentate granule cells. *Med. Mol. Morphol.* 50:123-129, 2017

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

(1) Nagata K: Voices; A Tribute to Alan Hall: Remembrances from Hall Lab Members. *Dev. Cell* 33:491-493, 2015.

(2) Nagata K: In Memoriam; Tribute to Alan Hall. *J. Cell Biol.* 209:475-479, 2015.

6.研究組織

研究代表者

永田浩一 (Nagata Koh-ichi)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

副所長 兼 神経制御学部長

研究者番号 : 50252143