

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07466

研究課題名（和文）海馬における新規自閉症感受性遺伝子Auts2の機能解析

研究課題名（英文）The role of Auts2 in the dentate gyrus development

研究代表者

富士 早紀（Fuji, Saki）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・流動研究員

研究者番号：70779454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円

研究成果の概要（和文）：自閉症感受性遺伝子AUTS2は多くの精神疾患と関連性が示された分子である。これまでの知見で、Auts2は神経細胞発生に重要であると示唆されていた。Auts2ノックアウトマウスでは歯状回の領域が顕著に縮小しており、Auts2は海馬歯状回の発生に不可欠であると考え解析を行った。発生期海馬歯状回におけるAuts2はNeuroDやProx1と共局在を示し、Auts2発現細胞は分化した顆粒細胞であることが示唆された。しかしノックアウトマウスでは分化した顆粒細胞のみならず、より未分化な細胞も減少していた。また子宮内電気穿孔法による解析では、Auts2が顆粒細胞の分化に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) is a gene associated with a broad range of psychiatric illnesses. Auts2 is expressed at multiple brain regions. Although some previous reports suggest that AUTS2 plays the crucial roles for the neurocognitive functions, the physiological function of AUTS2 in brain development, however, remains to be elucidated. In this study, we investigated the role of AUTS2 in the Dentate gyrus (DG) development using the Auts2 knockout mice. We found that the size of DG in the Auts2 mutant mice was drastically reduced in both the developing and mature brains. Immunohistochemistry shows that AUTS2 is expressed in the granule neurons. In the mutant mice, the number of granule neurons were decreased, and unexpectedly, neural stem cells were also significantly reduced. Based on these results and the analysis using in utero electroporation method, we suggested the crucial roles of Auts2 for the neurogenesis of the DG development.

研究分野：神経科学

キーワード：Auts2 海馬歯状回 発生 細胞分化 自閉症

1. 研究開始当初の背景

大脳辺縁系の一部である海馬及び歯状回は学習や記憶形成に重要な脳領域のひとつであり、マウスをはじめ哺乳動物の中樞神経系の中でも最も精力的に研究されている部位である。また歯状回は成体脳においてもニューロン新生が生涯続く特徴的な脳領域の一つであり、運動や学習などの外部刺激に応答してニューロン新生が活性化される。さらに海馬・歯状回の発生異常や成体脳ニューロン新生障害は、記憶障害やうつ、統合失調症など精神疾患の発症への関与が示唆されており、新たな診断・治療法の開発など臨床面からのアプローチも精力的に行われている。近年、海馬組織の発生制御や精神疾患発症に関わる様々な遺伝子群が同定されているが、分子レベルでの制御機構の詳細については未だ不明な点が多い。

AUTS2 (*Autism susceptibility candidate 2*) は、2002 年に自閉症を発症する患者から初めて変異が見つかった自閉症感受性遺伝子であるが、知的障害や統合失調症、ADHD など、自閉症以外の様々な精神疾患との関連性についても示唆される遺伝子である (*Trends Genet* 2013)。*AUTS2* は、脳発生の早い段階から成熟期にかけて中枢神経系の広い範囲で発現し、特に大脳前頭皮質や海馬・歯状回、小脳など高次精神機能を司るとされる脳領域で強く発現しており、脳の組織構築や高次精神機能の獲得に関与する分子ではないかと推測されてきた。しかしながら、神経発生における *AUTS2* の分子機能については未だわかっていない。

2. 研究の目的

2014 年、胎生期大脳皮質において細胞質に局在する *AUTS2* が細胞骨格系タンパク制御を介して、神経細胞移動や神経突起伸長に関与するタンパクであることが明らかになった (Hori et al., *Cell Rep.* 2014)。また同時期に Gao らのグループは、神経細胞の核内 *AUTS2* がエピジェネティクス関連因子 Polycomb 群複合体 (PRC1) のサブユニットの一つとして働き、神経細胞の特性獲得に必要な遺伝子群の発現制御に関わることを見出している (*Nature* 2014)。さらに恒常型 *Auts2* KO ヘテロマウスを用いた行動解析では、自閉症様症状のひとつの指標となる社会性行動の低下が認められ、またこれに加えて認知記憶障害や不安行動の顕著な低下を示し、脳の高次精神機能形成に関わる重要な遺伝子であることが示された (Hori et al., *PLoS One.* 2015、一部未発表データ)。上記のように胎児脳における *AUTS2* の分子機能については明らかになりつつも、恒常型 *Auts2* KO マウスのホモ接合体が胎生致死であるため成体脳での *AUTS2* の生理機能については未だわかっていない。

本研究では、生後発達期の脳組織形成に関わる *AUTS2* の生理的役割を明らかにするため、海馬を含む大脳特異的に *Auts2* 遺伝子を

欠損するコンディショナル KO マウス (*Auts2* cKO) の作製を行った。野生型マウスと比較して、*Auts2* 変異マウスの大脳皮質では組織の厚みや皮質層構造などに解剖学的に大きな差は認められないものの、歯状回で顕著な縮小が認められた (図 1)。

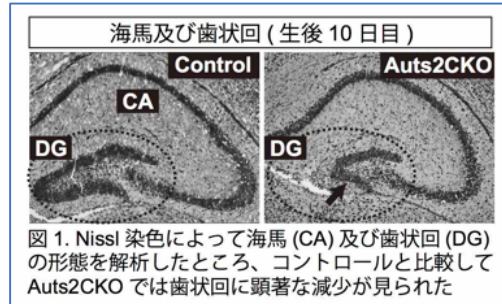


図 1. Nissl 染色によって海馬 (CA) 及び歯状回 (DG) の形態を解析したところ、コントロールと比較して *Auts2*CKO では歯状回に顕著な減少が見られた

また、この歯状回の縮小は胎生後期から生後数ヶ月を経た成熟脳にかけて一貫して観察されることから、*AUTS2* が胎生期における歯状回の発生制御に関与する可能性が十分に考えられた。

本研究では、この *Auts2* cKO マウスを用いた個体レベルでの解析を中心に、海馬歯状回の発生制御や成体脳ニューロン新生制御に関わる *AUTS2* の生理機能を明らかにし、学習記憶など脳高次機能形成や精神疾患発症の分子病態への理解を深めることを目標とした。

3. 研究の方法

発生期海馬歯状回領域での神経細胞産性能に与える影響についての解析

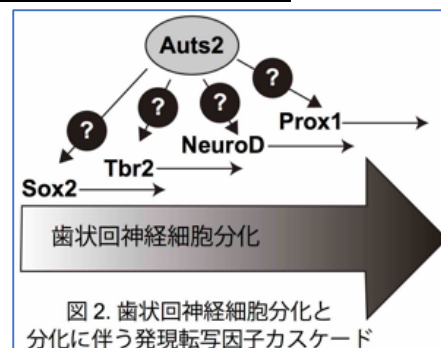


図 2. 歯状回神経細胞分化と分化に伴う発現転写因子カスケード

胎生期の海馬歯状回における *AUTS2* の詳しい発現分布についてはまだ明らかになっていないため、まず野生型マウスを用いて図 2 に挙げるような各種神経細胞特異的なマーカー抗体と *AUTS2* との多重組織免疫染色を行い、海馬歯状回で *AUTS2* を発現する神経細胞種の同定を行った。また *Auts2* cKO マウス脳についても同様に免疫染色を行い野生型マウスの免疫染色パターンと比較検討し、*Auts2* 遺伝子欠損が海馬歯状回組織の発生に与える影響を解析した。さらに、歯状回組織の形成が開始される胎生 17~18 日に標識核酸 BrdU 取込みによる細胞標識を行い、発生期における海馬歯状回顆粒神経細胞の増殖・分化能について定量解析を行った。また細胞死による分化神経細胞の減少による可能性も考え、細胞死マーカーを用いた定量的な比較解析も行った。

胎生期遺伝子導入による *Auts2* の海馬歯状回形成への影響についての解析

上述の *Auts2* cKO マウスの解析に子宮内電気穿孔法による胎仔マウス海馬への遺伝子導入法を組み合わせ、*in vivo* レベルでの *AUTS2* の分子機能解析を行った。具体的には、野生型マウス胎児の海馬領域に *Auts2* の shRNA 発現ベクターや *AUTS2* 全長発現ベクターを共導入して、*Auts2* ノックダウン及び過剰発現を試みた。

4. 研究成果

発生期海馬歯状回における *Auts2* の発現様式
まず、野生型マウスを用いて発生期海馬歯状回における *Auts2* の発現様式を、図 2 に挙げたマーカーを用いて詳細に解析した。その結果 *Auts2* は、Sox2 陽性の未分化な細胞には全く発現が見られず、Tbr2 陽性の神経前駆細胞では一部発現が見られた(図 3 矢頭)。また、NeuroD や Prox1 陽性の幼若神経細胞及び顆粒細胞マーカー陽性細胞では強い発現が見られた(図 3)。

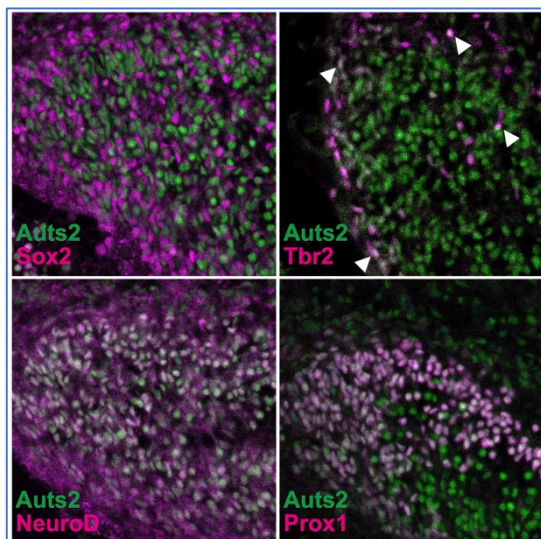
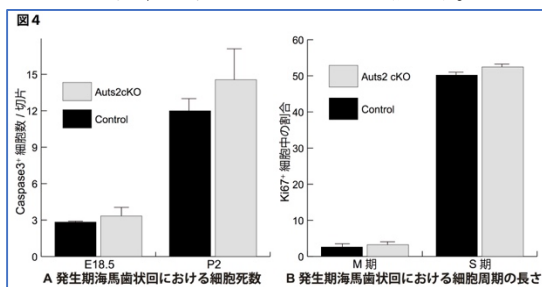


図 3 発生期海馬歯状回における *Auts2* の発現様式

この結果から、*Auts2* は主に分化した神経細胞に発現することがわかった。

Auts2 cKO マウスにおける海馬歯状回縮小の原因

次に、*Auts2* cKO マウスにおける海馬歯状回縮小の原因について、細胞死マーカーや細胞周期マーカーを用いて解析したところ、それらには変化が見られなかった(図 4)。



また、各種神経細胞特異的なマーカー抗体を用いてそれぞれの細胞数を詳細に解析した

ところ、*Auts2* を発現する分化した神経細胞のみならず、*Auts2* を発現していないような未分化な細胞も減少していることが明らかとなった(図 5)。

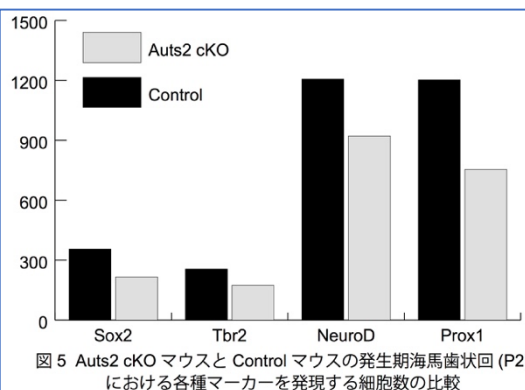


図 5 *Auts2* cKO マウスと Control マウスの発生期海馬歯状回 (P2) における各種マーカーを発現する細胞数の比較

胎生期遺伝子導入による海馬歯状回形成への影響についての解析

さらに上述の *Auts2* cKO マウスの解析に加え、子宮内電気穿孔法による胎仔マウス海馬領域への遺伝子導入を行い、*in vivo* レベルでの *AUTS2* の分子機能解析を行った。野生型マウス胎児の海馬領域に *Auts2* shRNA 発現ベクターを導入してノックダウン、または *AUTS2* 全長発現ベクターを導入して *Auts2* を過剰発現し、海馬歯状回の形成に対する影響を観察した。その結果、shRNA によって *Auts2* をノックダウンすると未分化な細胞の割合が増加し、*Auts2* を過剰発現すると分化した細胞の割合が有意に増加した(図 6)。

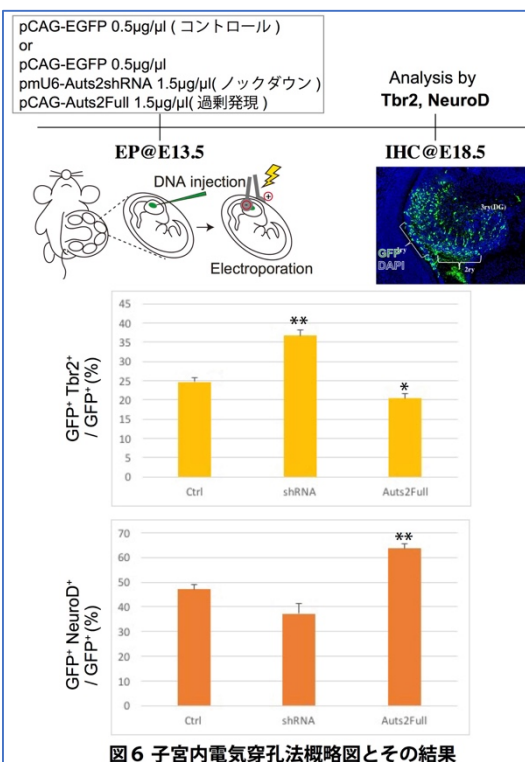


図 6 子宮内電気穿孔法概略図とその結果

以上の解析結果を総合して、*Auts2* は海馬歯状回において、顆粒細胞の新生及び分化に関与することが示唆された。

<引用文献>

Oksenberg N and Ahituv N (2013) The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. 10, p600-8.

Hori et al. (2014) Cytoskeletal regulation by AUTS2 in Neuronal migration and neuritogenesis. 9, 2166-79.

Gao et al. (2014) An AUTS2-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. 516, 349-54.

Hori et al. (2015) Heterozygous Disruption of Autism susceptibility candidate 2 Causes Impaired Emotional Control and Cognitive Memory. 10, e20145979

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)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Saki Egusa et al. (他 6 名)

「Deletion of Autis2 gene induces the impairment of dentate gyrus development」

第 10 回神経発生討論会、2017 年 3 月 10～11 日、秋保リゾートホテルクレセント

(2) Saki Egusa et al. (他 6 名)

「The role of Autis2 in the dentate gyrus development」

第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20～23 日、幕張メッセ

(3) Saki Egusa et al. (他 6 名)

「The role of Autis2 in the morphogenesis of the dentate gyrus」

第 40 回日本分子生物学会、2017 年 12 月 6 日～9 日、神戸ポートアイランド

(4) Saki Egusa et al. (他 6 名)

「The role of Autis2 in the dentate gyrus development」

第 11 回神経発生討論会、2018 年 3 月 17 日～18 日、金沢大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富士 早紀 (FUJI SAKI)

研究開発法人・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
流動研究員

研究者番号：70779454