

令和元年6月14日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07021

研究課題名(和文) 生後発達期大脳における自閉症感受性遺伝子Auts2の生理機能の解明

研究課題名(英文) The role of AUTS2 in synaptic formation and the cognitive brain functions

研究代表者

堀 啓 (Hori, Kei)

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 代謝研究部・室長

研究者番号：70568790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症感受性遺伝子AUTS2は自閉症や知的障害、統合失調症など、様々な精神疾患発症との関連性が示唆される遺伝子である。大脳皮質や海馬など高次機能を司る脳領域で特に発現が高く、これまでに胎児期の神経発生に関わる分子であることを明らかにしてきたが、未だAUTS2変異と精神疾患を繋ぐ解剖・生理学的病因は明らかになっていない。本研究で我々は、Auts2変異マウスが自閉症様症状や記憶学習障害を示すことを見出した。さらに、Auts2変異マウス脳の神経細胞では興奮性シナプスが過剰に形成され、神経回路内の興奮/抑制性神経伝達のバランスに不均衡が生じ、興奮性神経回路の過活動が生じていることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにAUTS2遺伝子変異と精神疾患との関連性を示唆するような臨床例はいくつも報告されてきたものの、脳発達におけるAUTS2の生理学的役割やAUTS2変異と精神疾患を繋ぐ解剖・生理学的病因は明らかになっていなかった。本研究により、AUTS2変異によって引き起こされる精神疾患病態の一つとして、シナプス形成やその機能異常に原因があることが初めて明らかとなった。今後はさらに、シナプス形成に関わるAUTS2の分子機能の詳細を明らかにし、また、AUTS2変異マウスを利用した治療薬スクリーニングなどを行うことで、自閉症などの精神疾患に対する新たな診断・治療法の開発に大きく貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：AUTS2 gene has been associated with various psychiatric disorders, such as autism and schizophrenia. Its roles for brain development, however, remains unclear. In this study, we found that the excitatory synapses were specifically increased in Auts2 mutants. In mice lacking Auts2 in the forebrain, increased dendritic spines were observed in regions such as mPFC and hippocampus. In the mutant hippocampal slices, excitatory but not inhibitory synaptic inputs were increased, suggesting that an imbalance of excitatory and inhibitory inputs occurs in auts2 mutant brain. Auts2 KO mice exhibited autistic-like social behaviors including impairments in social interaction and altered vocal communication. Together, these data suggest that AUTS2 regulates excitatory synapse number to coordinate excitatory vs. inhibitory balance in the brain, whose impairments may underlie the pathology of psychiatric disorders in individuals with AUTS2 mutations.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉症 シナプス 自閉症感受性遺伝子 神経回路 スパイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含め、高等哺乳動物が持つ脳の高度な精神機能は、胎児期より生み出された神経細胞が所定の位置へと正しく移動した後に、複雑精巧な神経突起を伸ばし、神経細胞同士が互いに適切な数のシナプスによって繋がり合い、そして機能的な神経回路網が形成されることで初めて獲得される。このように一連の脳・神経発達の制御には非常に多くの遺伝子が関わるが、一方で、これら発生プログラムを制御する遺伝子に変異が生じると正常な脳発生は破綻し、様々な精神疾患が発症する。我々が研究対象としている精神疾患の一つである自閉症は幼少期より発症し、対人関係や言語コミュニケーションなどに障害を持つ疾患の一つである。遺伝的要素が強いとされ、これまでに発症の原因として考えられる遺伝子変異が多数同定されているが、治療法はもとより未だ発症の詳細な分子メカニズムもよくわかっていない。

Autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) は一卵性双生児の自閉症患者において相互転座により当遺伝子座が欠損していることが 2002 年に初めて報告された自閉症感受性遺伝子の一つである(Sultana et al., 2002)。その後、多くの研究から *AUTS2* は自閉症のみならず、知的障害や統合失調症、ADHD、失語症、うつ、アルコール・薬物依存など、実に様々な精神疾患との関連性が示唆される遺伝子でもある(Hori and Hoshino, 2017; Oksenberg and Ahituv, 2013)。

AUTS2 は胎生期の早い時期から脳の様々な領域で発現するが、特に大脳や海馬、小脳など高次の精神機能を司るとされる脳部位で非常に高い発現を示すタンパク質である(Bedogni et al., 2010)。また、興味深いことに成熟した脳では、進化の過程で爆発的にその体積が増大し、ヒトにおいて高度な精神機能を獲得するに至った要因と推測されている「前頭前皮質 (pre-frontal cortex)」に特に高い発現を示す。これらのことから、*AUTS2* は正常な脳において高次精神機能の獲得に重要な遺伝子であると予測されてきたが、*AUTS2* がどのような分子機能を持ち、脳発達において如何なる生理的役割を担っているかは長らく不明であった。

過去に我々は、*AUTS2* が胎児期マウス大脳皮質の神経細胞内において、Rac1 や Cdc42 といった Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の上流因子として働き、アクチンを介して細胞骨格形成を制御すること、また、生み出された神経細胞が所定の位置へと移動する、いわゆる「神経細胞移動」や、神経突起伸張・枝分かれ構造などの神経細胞の「形態形成」に関わる分子であることを見出した(Hori et al., 2014)。また、*AUTS2* は神経細胞の核内にも存在し、エピジェネティック関連因子群のひとつである、PcG 複合体 (Polycomb repressive complex 1, PRC1) と相互作用し、ヒストンタンパクの翻訳後修飾を介して様々な遺伝子の発現を制御する分子であることが別の研究グループからも報告されている (Gao et al., 2014)。

しかしながら、上述のように *AUTS2* は胎生期のみならず生後の脳発達期や成熟した脳でも発現するが、その生理的役割は未だよくわかっていない。また、現在でも MRI や死後脳解析などの臨床研究はほとんどないことから、*AUTS2* 変異によって一体どのような脳病変を示すのかも一切明らかにはされていない。過去に *Auts2* 変異マウスを用いて行った我々の解剖学的な解析では、正常なマウスと比較して、*Auts2* 変異マウス脳に大きな解剖学的差異 (脳サイズ、層構造など) が認められないことから、*Auts2* 変異によって誘発される精神疾患は、脳組織の中でも極めて微細な構造変化や機能的な障害によるものであるという可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、主に生後脳発達期に活発に形成される微細構造である「シナプス」に着目し、*Auts2* 変異を持つ遺伝子改変マウスを用いて、シナプス形成や維持、恒常性に関わる *AUTS2* の生理機能についての解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 初代培養神経細胞でのシナプスの解析

野生型または *Auts2* 変異マウス由来のマウス胎児（胎生 17 日目）より摘出し培養した海馬神経細胞に NEPA21（NEPA ジーン社）を用いたエレクトロポレーション法により GFP 発現ベクターなどのプラスミドを導入し、樹状突起スパインの形態や数についての解析を行った。

(2) マウス個体を用いた樹状突起スパインの解析

生後 30～90 日目の野生型マウスおよび *Auts2* 変異マウスより摘出した全脳を Rapid Golgi staining kit（FD NeuroTechnologies 社）を用いて Golgi 染色を行った。画像解析にはライカ社の顕微鏡（DM500B, Leica）での観察下、NeuroLucida ソフト（MBF Bioscience 社）を用いて行った。

(3) 電気生理学的解析

Auts2 変異マウス脳から海馬を含む組織スライス（400 μm ）を作成し、海馬 CA1 領域の錐体神経細胞に対しホールセルパッチクランプ法による自発性のシナプス後電流（mEPSC および mIPSC）の測定を行った。

(4) マウス行動解析

野生型および *Auts2* 変異オスマウス（それぞれ 18 および 15 匹）を用いて以下に挙げる一連の行動解析バッテリーを行った：自発性活動量、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路、3-チャンパーソーシャルインタラクションテスト、新奇物体認識テスト、プレパルスインヒビションテスト

4. 研究成果

(1) AUTS2 は興奮性シナプス数を制御する

興奮性ポストシナプス部位に相当する「樹状突起スパイン」は、未熟なフィロポディア（糸状）様構造から、シナプスの成熟に伴いマッシュルーム様構造へと、その形態をダイナミックに変化させる。ヒトでは思春期から青年期にかけてまず過剰にスパインが形成され、不要なスパインが取り除かれた後に（これをスパインの刈り込みという）完成された脳では一定数のスパインが適切な神経伝達のために維持される。また、成熟後も学習や経験などの刺激に応じて形態変化や数の増減が起こり、脳機能の発達や成熟を反映していると考えられている。精神疾患患者の死後脳検体や精神疾患モデルマウスを用いた研究では、これらスパインの形態や数に異常が見られることから、シナプスそのものの機能低下に加え、スパインの新生や刈り込みの動的平衡が破綻することで、神経回路内の興奮/抑制バランスに不均衡が生じること（E/I インバランス）も病態生理学的要因の一つである、とする仮

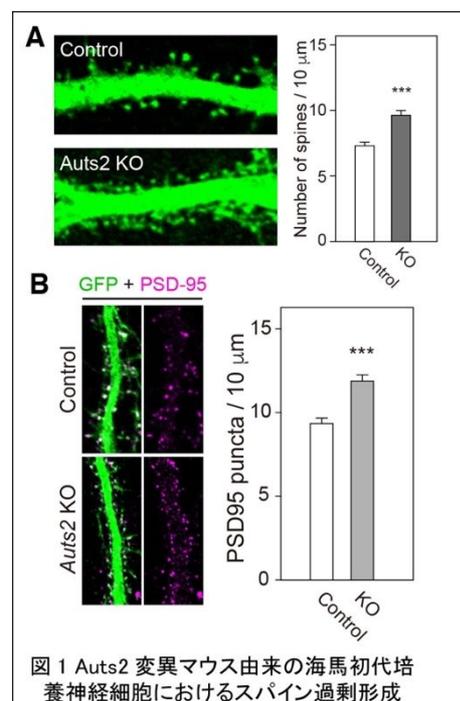


図 1 *Auts2* 変異マウス由来の海馬初代培養神経細胞におけるスパイン過剰形成

とする仮

説にも注目が集められている (Penzes et al., 2011)。

そこでまず我々は、*Auts2* 変異マウス脳から取り出した海馬神経細胞に GFP 蛍光タンパク発現させて培養し、樹状突起スパインについて観察してみたところ、正常な神経細胞に比べてその数が異常に増えていることを見出した (図 1 A)。形態学的には正常型マウス由来のスパインとの差異は見られないことから、*Auts2* 遺伝子変異はスパインの形態そのものには影響を与えないことが考えられる。また、各種シナプスマーカー抗体を用いた免疫染色によりその数を比較したところ、スパイン数の増加と一致して、興奮性シナプスの数も上昇していた (図 1 B)。一方で、抑制性シナプスの数には変化はなく、以上のことから、*Auts2* 遺伝子変異は興奮性シナプスのみに過剰形成を引き起こすことを *in vitro* 実験系で確認

した。さらにタイムラプスイメージングを用いた解析から、正常型と比較して *Auts2* 変異神経細胞では、単位時間あたりに形成されるスパイン数が増加する一方、消失するスパインの数が減少しており、スパイン数の動的平衡に異常をきたしていることも明らかとなった。これらの結果から、AUTS2 は新規のスパイン形成を抑制する一方、すでに作られたスパインの消失 (または刈り込み) にも関わる分子であることが分かった。

また、*Auts2* 変異マウス脳組織を用いて Golgi 染色法を行い、ごく少数の神経細胞を可視化して樹状突起スパインの定量的・形態学的解析を行ったところ、組織レベルにおいてもやはり *Auts2* 変異マウスの様々な脳部位の神経細胞において樹状突起スパイン数の過剰形成が認められた (図 2 A)。例えば社会性の構築に関わるとされる大脳皮質の前頭前皮質内側部 (medial prefrontal cortex, mPFC) や、記憶・学習に重要な海馬 CA1 錐体神経細胞、また、自閉症患者でスパイン形成に異常が報告される大脳皮質聴覚野の表層側神経細胞 (Tang et al., 2014) においても、過剰なスパイン形成が引き起こっていることを見出した (図 2 B)。前述の培養神経細胞でも観察されたように、樹状突起スパインの形態そのものには目立った異常はなく、*Auts2* 遺伝子変異によってスパインの数は増加するものの、一旦形成されたスパインは形態学的には成熟する方向に進むことが示唆された。

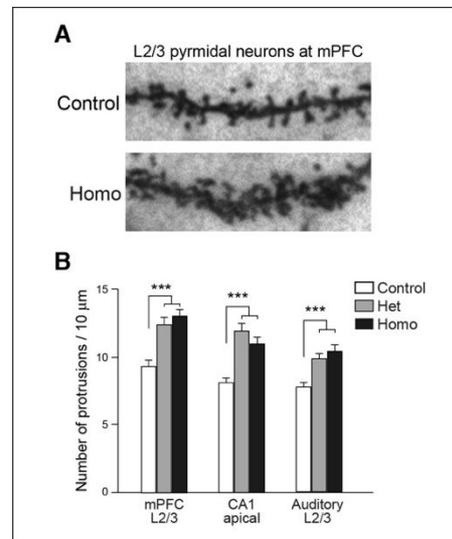


図 2 *Auts2* 変異マウス大脳神経細胞における樹状突起スパインの過剰形成

(2) *Auts2* 変異マウスでは脳の興奮性が上昇

では *Auts2* 変異によって引き起こされるスパイン数の増加が、神経情報伝達などシナプスの生理機能にどのような影響を及ぼすのだろうか？そこで我々は次に海馬領域を含む脳組織スライス培養系を用いて電気生理学的解析 (Whole cell patch-clamp 法) を行った (図 3A、

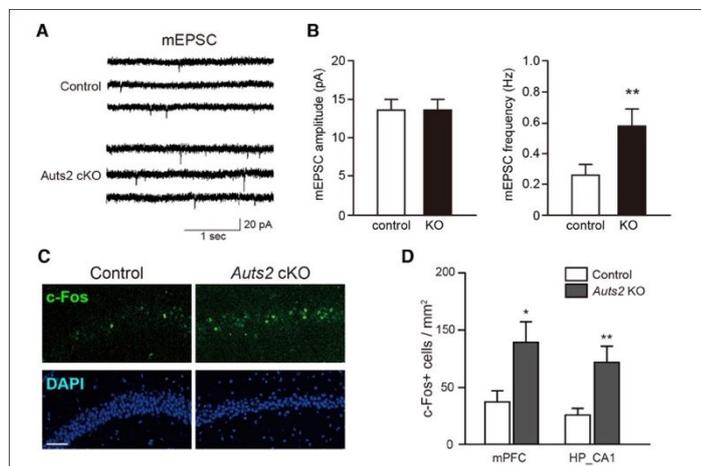


図 3 (A, B) 海馬スライス標本を用いた Whole-cell patch clamp 法による電気生理学解析 (C, D) 組織免疫染色による c-Fos 陽性細胞数の定量解析

B)。 *Auts2* 変異マウス由来の海馬神経細胞ではシナプスの自発的な応答のうち、興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の発火頻度 (frequency) が正常型と比べて上昇していることがわかった。

正常型と *Auts2* 変異型の間で興奮性シナプスの発火強度 (amplitude) に違いが見られないことから、個々の興奮性シナプスの機能には影響がなく、スパインの増加 (つまり興奮性シナプス数の増加) を反映しているものと思われる。一方、抑制性シナプス後電流 (mIPSC) は発火強度・頻度のいずれにも差異は認められなかった。以上のことから、*Auts2* 変異マウスの脳内ではスパイン数の上昇によって、神経回路内における興奮性 / 抑制性シナプスの均衡が崩れ、興奮性優位な状態に傾いていることが示唆された。これらの結果を裏付ける検証実験としてさらに我々は、神経活動の亢進によって誘導される (つまり神経細胞の興奮性が高まると発現する) 最初期遺伝子 (Immediate early genes) 核タンパクの一つである、c-Fos 抗体を用いて組織免疫染色を行ったところ、mPFC や海馬 CA1 領域で c-Fos を強く発現する神経細胞が *Auts2* 変異マウス脳で有意に増加していることを見出した (図 3C、D)。

(3) *Auts2* 変異マウスの様々な行動異常

次に我々は、*Auts2* 変異マウス脳内の様々な領域で見られる過剰なスパイン形成や神経伝達の不均衡が、マウス個体にどのような影響を及ぼすかを検証するため、様々な行動試験を行った。まず、社会性行動を観察する目的で 3-chamber ソーシャルインタラクションテストを行ったところ、*Auts2* 変異マウスは他マウスに対する興味が低下しており、自閉症患者でみられるような社会性構築に障害を持つことがわかった (図 4A)。さらに *Auts2* 変異マウスは音声コミュニケーション能力も低下していることを超音波発声解析によって明らかにした (図 4B)。マウスは我々人間の耳には聞こえない高い周波数帯の音声 (超音波) でコミュニケーションすることが知られており (Ultrasonic vocalization、USVs) 実験では巣から隔離された仔マウスが母マウスに向けて発せられる「pup isolation call」や、性成熟期のオスマウスが雌に対して発する求愛コール (courtship call) の測定が用いられる。*Auts2* 変異マウスはこれらいずれの USV もその発声回数や発声時間が正常型と比べて顕著に低下していた。また、*Auts2* 変異マウスは記憶学習能力も低下していることを、新奇物体認識テスト (novel object recognition test) や恐怖条件付け記憶テスト (fear-conditioning test) などで明らかにした。また、統合失調症患者でよく見られるプレパルス抑制 (pre-pulse inhibition) の低下も認められ、さらに音や感覚などの外部刺激に対して過敏に応答することもわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- (1) **Hori K** and Hoshino M. (2017) Neuronal migration and AUTS2 syndrome. *Brain Sci.* 7(5), 54.
- (2) Russo D, Della Ragione F, Rizzo R, Sugiyama E, Scalabri F, **Hori K** et al (2018) Glycosphingolipid metabolic reprogramming drives neural differentiation. *EMBO J.* 37(7). pii: e97674. doi: 10.15252/embj.201797674.
- (3) Ambrozkiwicz MC, Schwark M, Kishimoto-Suga M, Borisova E, **Hori K** et al (2018) Polarity acquisition in cortical neurons is driven by synergistic action of Sox9-regulated Wwp1 and Wwp2 E3 ubiquitin ligases and intronic miR-140. *Neuron.* 100(5), p1097-1115.

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 堀啓, 青木瞭, 坂本亜沙美, 大輪智雄, 宮下聡, 阿部学, 山崎真弥, 崎村健, 星野幹雄: The role of autism susceptibility gene AUTS2 in the cerebellar Purkinje development . 第 39 回日本神経科学大会 (パシフィコ横浜, 2016 年 7 月 20-22 日)

(2) 堀啓, 永井拓, Wei Shan, 山田光代, 白石玲花, 菅野康太, 坂本亜沙美, 阿部学, 崎村健司, 山田清文, 星野幹雄: 「生後発達期脳における自閉症感受性遺伝子 AUTS2 の生理機能の解析」 第 40 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド) 2017 年 12 月 6 日 (ワークショップ、口頭発表)

(3) **Kei Hori**, Taku Nagai, Wei Shan, Mitsuyo Yamada, Reika Shiraishi, Asami Sakamoto, Kouta Kanno, Manabu Abe, Kiyofumi Yamada, Kenji Sakimura and Mikio Hoshino. 「The role of AUTS2 in synaptic formation and the cognitive brain functions」 第 8 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム (新潟大学脳研究所) 2018 年 2 月 10 日～11 日 (ポスター発表)

(4) **Hori K**, Nagai T, Shan W, Yamada M, Shiraishi R, Sakamoto A, Kanno K, Abe M, Yamada K, Sakimura K and Hoshino M. 「Loss of Aut2 induces the defects of synaptic function and cognitive brain functions」 新学術領域 個性創発脳 第 1 回国際シンポジウム「Toward Understanding “INDIVISUALITY”」(京都大学芝蘭会館) 2018 年 7 月 24-25 日

(5) 「The role of AUTS2 in synaptic organization and the cognitive functions during postnatal brain development」堀啓 第 61 回日本神経化学会大会 (神戸国際会議場) 2018 年 9 月 6-8 日 (シンポジウム招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究部ホームページ

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。