

令和元年6月23日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15554

研究課題名（和文）神経発達障害のシナプス病態解明 -シグナル伝達経路異常の網羅的・定量的解析-

研究課題名（英文）Elucidating the synaptic pathology of neurodevelopmental disorders-Comprehensive and quantitative analysis of signaling pathway abnormalities

研究代表者

染矢 俊幸 (Someya, Toshiyuki)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50187902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：成長円錐のリン酸化プロテオミクスにより同定された神経発達に重要なリン酸化部位が存在する遺伝子のうち、統合失調症および自閉症のリスク遺伝子であるGAP43、NLGN3を選定し機能解析を行った。自閉症患者に同定されたGAP43のD23G変異をHela細胞に導入して免疫組織学的に観察した結果、D23G導入細胞は野生型導入細胞に比べて、核周囲のGAP43発現が少なかった。また、NLGN3のリン酸化部位（S745）の分布についてシナプトソームを用いたイムノブロットングと初代培養神経細胞を用いた免疫組織学的観察を行った結果、このリン酸化が軸索先端およびシナプスの両方で機能している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症や自閉症の妥当性の高いリスク遺伝子は全エクソーム解析などの網羅的な解析法によって同定された。本研究ではタンパクレベルの網羅的解析であるリン酸化プロテオミクスで同定された神経発達に重要と考えられるリン酸化部位のうち統合失調および自閉症のリスク遺伝子に存在するものを選定してそれらの機能についての知見を得ることができた。タンパクレベルの妥当性の高い知見を蓄積することにより、さらに高次レベルの知見を得るための確かな土台となる。このように各レベルで妥当性の高い土台を重ねていくことにより、それらの疾患の病態解明および治療法開発に結び付くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We selected GAP43 and NLGN3, which are risk genes for schizophrenia and autism, among genes whose phosphorylation sites are important for neurodevelopment identified by phosphoproteomics of growth cones, and performed functional analysis. The GAP43 D23G mutation identified in an autism patient was introduced into Hela cells and observed immunohistologically. The results revealed that D23G-transduced cells showed less nuclear expression of GAP43 than wild-type transfected cells. Furthermore, the distribution of the phosphorylation site (S745) of NLGN3 was subjected to immunoblotting using synaptosomes, and immunohistological observation using primary culture neurons. These findings suggest that phosphorylation may be functional at both the axonal tip and the synapse.

研究分野：発達精神医学

キーワード：統合失調症 自閉症 リン酸化プロテオミクス GAP43 NLGN3

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

1. 研究開始当初の背景

統合失調症および自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder: ASD)は、発症の経過がはっきりと異なる一方、共に遺伝的要因が発症に強く影響する神経発達障害と考えられている。また、共に一般人口における頻度は約 1%と高く、社会性の障害を伴い社会機能を大きく損なうため、不登校、ひきこもり、ニートなどの社会問題の背景因子となり、放置した場合の社会的損失は甚大である。世界的に統合失調症および ASD の原因遺伝子の網羅的探索が行われ、それぞれ 1000 近いリスク遺伝子が報告されているが、申請者もこれまでに、統合失調症(Mol Psychiatry, 2013; Schizophr Res, 2014 等) および ASD (PLOS ONE, 2015; Psychiatry Res, 2015 等)のゲノムワイド関連解析やエクソーム解析など遺伝子レベルでの網羅的解析により複数のリスク変異を報告してきた。しかし、特に分子・細胞レベルの変化を網羅的かつ定量的に解析し、比較する方法がこれまではなかったため、リスク変異による遺伝子の変化が各層レベルの変化を経て認知・行動の変化へつなげる過程はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

細胞内シグナル伝達経路のうち最も重要な機構であるタンパクリン酸化に注目した手法であるリン酸化プロテオミクスの分子レベルの網羅的データを利用し、そのリン酸化部位のうち統合失調症と ASD のリスク遺伝子上にある部位を選定した。その部位が存在するリスク遺伝子の機能解析をすることによりそれぞれの疾患に特異的な異常経路を同定し、生物学的治療法の分子ターゲットを明らかにすることが本研究の目的である。

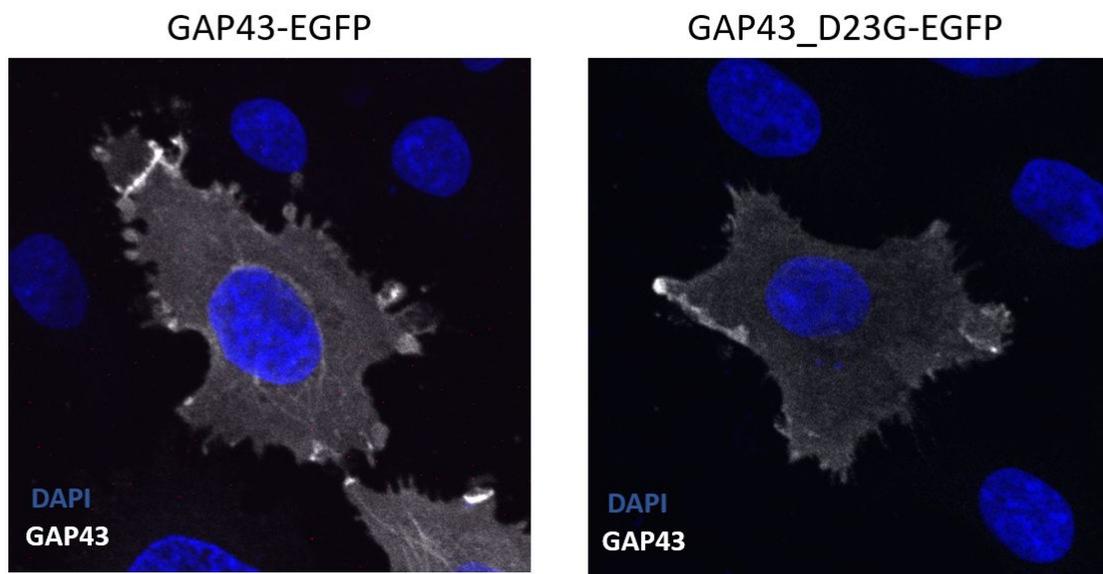
3. 研究の方法

成長円錐のリン酸化プロテオミクスにより同定された神経発達に重要なタンパクリン酸化部位のうち、統合失調症および ASD のリスク遺伝子である GAP43 遺伝子と NLGN3 遺伝子を選定して機能解析を行った。GAP43 遺伝子の機能解析：ヒト ASD 患者における GAP43 遺伝子のエクソンシーケンスにより同定され、in silico 解析により遺伝子機能に強い影響を与えていると予測された GAP43 遺伝子の Asp23Gly 変異のプラスミドベクターを作成した。そして、この変異を Hela 細胞にリポフェクション法を用いて導入し、抗 GAP43 抗体を用いて免疫組織学的に観察した。NLGN3 遺伝子の機能解析：成体マウス 4 体からそれぞれ別に全脳ホモジネートとシナプトソームを作成し、NLGN3 遺伝子のリン酸化部位の抗体 (pS745 抗体) でイムノプロットングを行った。さらにマウスの初代培養神経細胞を培養 2 日 (軸索および成長円錐を観察するため) および 21 日目 (成熟シナプスを観察するため) で固定して抗 NLGN3 抗体および pS745 抗体で免疫染色を行った。

4. 研究成果

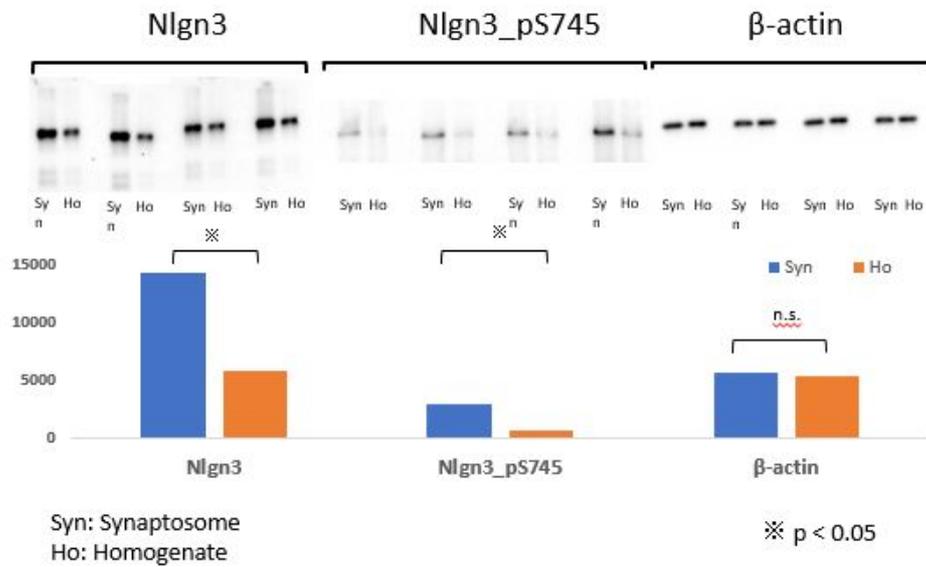
GAP43 遺伝子の機能解析：Asp23Gly 変異を Hela 細胞にリポフェクション法を用いて導入し、抗 GAP43 抗体を用いて免疫組織学的に観察した結果、Asp23Gly 導入細胞は野生型 GAP43 導入細胞に比べて GAP43 の核周囲の発現が少ないという所見を得た (図 1)。

図1. GAP43野生型強制発現Hela細胞とAsp23Gly変異導入Hela細胞の比較



成体マウス 4 体からそれぞれ別に全脳ホモジネートとシナプトソームを作成し、NLGN3 遺伝子のリン酸化部位の抗体 (pS745 抗体) でイムノプロットングを行ったところ、ホモジネートと比較してシナプトソームに強い集積が確認された (図 2)。

図2. Nlgn3リン酸化抗体によるイムノプロットティング



マウスの初代培養神経細胞を培養2日目で固定した神経細胞において、抗 NLGN3 抗体に比し pS745 抗体で軸索先端は強く染色されていた (図3)。培養21日目で固定した神経細胞は、抗 NLGN3 抗体と pS745 抗体でシナプスが同様に染まっていた。(図4)。

図3. マウス初代培養神経細胞 (培養2日目に固定)

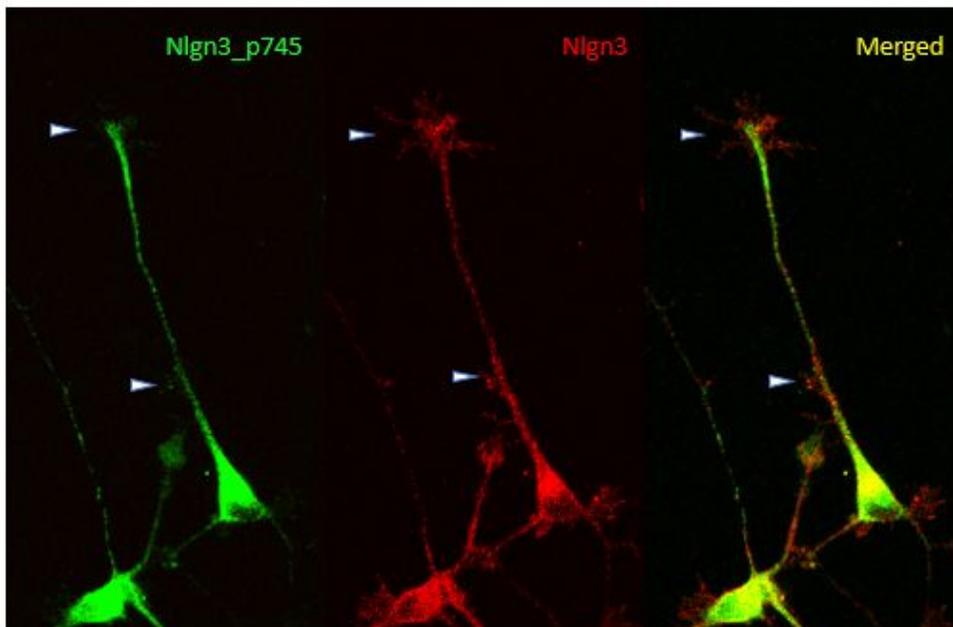
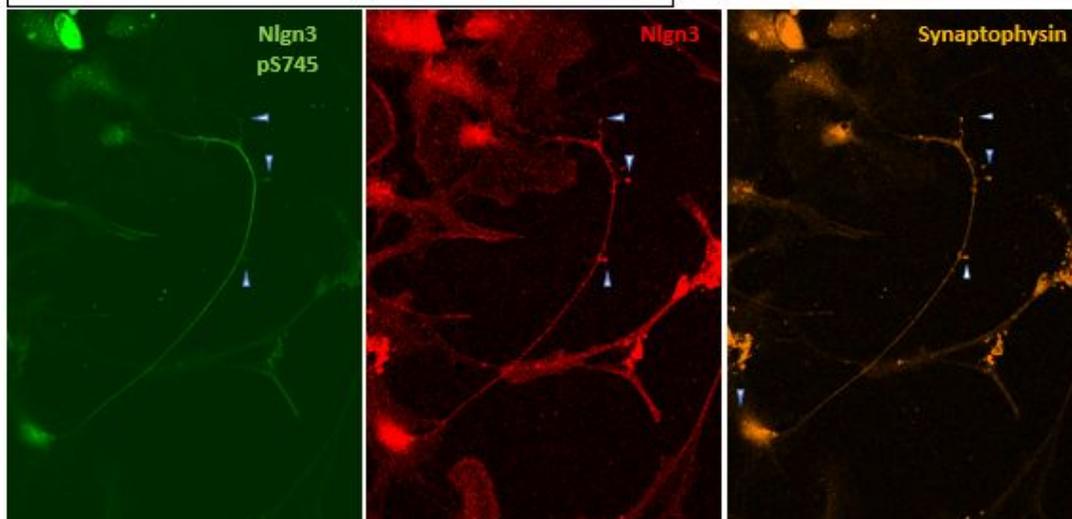


図4. マウス初代培養神経細胞 (培養21日目に固定)



以上よりこの pS745 リン酸化 NLGN3 が軸索先端およびシナプスで機能している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Yukawa T, Iwakura Y, Takei N, Saito M, Watanabe Y, Toyooka K, Igarashi M, Niizato K, Oshima K, Kunii Y, Yabe H, Matsumoto J, Wada A, Hino M, Iritani S, Niwa SI, Takeuchi R, Takahashi H, Kakita A, Someya T, Nawa H. Pathological alterations of chondroitin sulfate moiety in postmortem hippocampus of patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 2018 Dec;270:940-946.
2. Ikeda M, Takahashi A, Kamatani Y, Momozawa Y, Saito T, Kondo K, Shimasaki A, Kawase K, Sakusabe T, Iwayama Y, Toyota T, Wakuda T, Kikuchi M, Kanahara N, Yamamori H, Yasuda Y, Watanabe Y, Hoya S, Aleksic B, Kushima I, Arai H, Takaki M, Hattori K, Kunugi H, Okahisa Y, Ohnuma T, Ozaki N, Someya T, Hashimoto R, Yoshikawa T, Kubo M, Iwata N. Genome-Wide Association Study Detected Novel Susceptibility Genes for Schizophrenia and Shared Trans-Populations/Diseases Genetic Effect. *Schizophr Bull.* 2018 Oct 3. [Epub ahead of print]
3. Hoya S, Watanabe Y, Shibuya M, Someya T. Updated meta-analysis of CMYA5 rs3828611 and rs4704591 with schizophrenia in Asian populations. *Early Interv Psychiatry.* 2018 Oct;12(5):938-941.
4. Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Okada T, Uno Y, Morikawa M, Ishizuka K, Shiino T, Kimura H, Arioka Y, Yoshimi A, Takasaki Y, Yu Y, Nakamura Y, Yamamoto M, Iidaka T, Iritani S, Inada T, Ogawa N, Shishido E, Torii Y, Kawano N, Omura Y, Yoshikawa T, Uchiyama T, Yamamoto T, Ikeda M, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Someya T, Watanabe Y, Egawa J, Nunokawa A, Itokawa M, Arai M, Miyashita M, Kobori A, Suzuki M, Takahashi T, Usami M, Kodaira M, Watanabe K, Sasaki T, Kuwabara H, Tochigi M, Nishimura F, Yamasue H, Eriguchi Y, Benner S, Kojima M, Yassin W, Munesue T, Yokoyama S, Kimura R, Funabiki Y, Kosaka H, Ishitobi M, Ohmori T, Numata S, Yoshikawa T, Toyota T, Yamakawa K, Suzuki T, Inoue Y, Nakaoka K, Goto YI, Inagaki M, Hashimoto N, Kusumi I, Son S, Murai T, Ikegame T, Okada N, Kasai K, Kunimoto S, Mori D, Iwata N, Ozaki N. Comparative Analyses of Copy-Number Variation in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Reveal Etiological Overlap and Biological Insights. *Cell Rep.* 2018 Sep 11;24(11):2838-2856.
5. Zhang Y, Hishimoto A, Otsuka I, Watanabe Y, Numata S, Yamamori H, Boku S, Horai T, Someya T, Ohmori T, Hashimoto R, Sora I. Longer telomeres in elderly schizophrenia are associated with long-term hospitalization in the Japanese population. *J Psychiatr Res.* 2018 Aug;103:161-166.
6. Tajiri M, Suzuki Y, Sugai T, Tsuneyama N, Someya T. Effects of olanzapine on resting heart rate in Japanese patients with schizophrenia. *PLoS One.* 2018 Jul 17;13(7):e0199922.
7. Ono S, Sugai T, Suzuki Y, Yamazaki M, Shimoda K, Mori T, Ozeki Y, Matsuda H, Sugawara N, Yasui-Furukori N, Okamoto K, Sagae T, Someya T. High-density lipoprotein-cholesterol and antipsychotic medication in overweight inpatients with schizophrenia: post-hoc analysis of a Japanese nationwide survey. *BMC Psychiatry.* 2018 Jun 8;18(1):180.
8. Sugawara N, Maruo K, Sugai T, Suzuki Y, Ozeki Y, Shimoda K, Someya T, Yasui-Furukori N. Prevalence of underweight in patients with schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophr Res.* 2018 May;195:67-73.
9. Okazaki S, Hishimoto A, Otsuka I, Watanabe Y, Numata S, Boku S, Shimmyo N, Kinoshita M, Inoue E, Ohmori T, Someya T, Sora I. Increased serum levels and promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018 Apr 20;83:33-41.

[学会発表] (計 7 件)

1. <第 115 回日本精神神経学会 2019.6.20-22. 神戸> ○江川純, 五十嵐道弘, 染矢俊幸: 自閉症リスク遺伝子 Neuroligin3 の機能的リン酸化部位の機能解析.
2. <WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry 2018.9.9. Kobe> ○Hoya S, Igeta H, Watanabe Y, Nunokawa A, Inoue E, Shibuya M, Egawa J, Someya T: Resequencing of the SETD1A gene in Japanese patients with schizophrenia.

3. <WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry 2018.9.9. Kobe>
○Watanabe Y, Hoya S, Hishimoto A, Nunokawa A, Inoue E, Igeta H, Otsuka I, Shibuya M, Sora I, Someya T: Rare FBXO18 variations and risk of schizophrenia.
4. <WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry 2018.9.9. Kobe> ○Igeta H, Watanabe Y, Hoya S, Ikeda M, Hishimoto A, Nunokawa A, Inoue E, Sora I, Iwata N, Someya T: Whole-exome sequencing in a consanguineous multiplex family with schizophrenia and a case-control study.
5. <WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry 2018.9.9. Kobe>
○Okazaki S, Otsuka I, Watanabe Y, Numata S, Boku S, Shimmyo N, Ohmori T, Someya T, Sora I, Hishimoto A. Increased serum levels and promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor in schizophrenia. <WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry 2018.9.7. Kobe> ○Sugimoto A, Suzuki Y, Yoshinaga K, Orime N, Hayashi T, Egawa J, Ono S, Sugai T, Someya T: Relationship between prefrontal cortex activity during task execution and ADHD symptoms of adult patients, and their changes by atomoxetine.
6. <第 41 回日本神経科学大会 2018.7.26. 神戸> ○Hayashi T, Kawasaki K, Akikawa R, Hasegawa I, Egawa J, Someya T, Iijima A: Anticipating of other's behavior on the basis of understanding other's false beliefs in rhesus monkeys (*Macaca fuscata*). <13th World Congress on Healthcare & Technologies 2018.6.14. Dublin> ○Shichiri K, Nakayama E: Efficiency of Defensive Functioning Scale: Correlation to Beck's Depression Inventory.
7. <The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology 2018.7.5. Kyoto> ○Sugai T, Suzuki Y, Yamazaki M, Shimoda K, Mori T, Ozeki Y, Matsuda H, Sugawara N, Furukori N, Okamoto K, Sagae T, Someya T: Physical risks in Japanese patients with schizophrenia: From a nationwide survey.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：五十嵐 道弘

ローマ字氏名：Michihiro Igarashi

研究協力者氏名：江川 純

ローマ字氏名：Jun Egawa

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。