

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2023

課題番号：17K08778

研究課題名（和文）自閉症原因遺伝子NLGN4Xの発現変化に起因する分子病態の解析

研究課題名（英文）Analysis of Molecular Pathogenesis Caused by Altered Expression of Autism-Susceptibility Gene, NLGN4X.

研究代表者

飯尾 明生（IIO, Akio）

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・客員研究員

研究者番号：80344349

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：自閉症高感受性遺伝子ニューロリギン4Xのメチル化を主体としたエピジェネティックな発現制御機構の解明と、NLGN4Xを介したホルモン分泌制御機構の解析を行った。非神経細胞ではコアプロモーター、CGIプロモーター共にCpGメチル化とMeCP2の結合により発現が抑制され、神経細胞ではCEBP が転写促進に働いていた。NLGN4X発現細胞ではNRXN1 やSyntaxin1Aとの相互作用によりAVP分泌抑制に働いていることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NLGN4Xの発現低下や機能障害により自閉症発症の要因になりうることはわかっていたがどのようなメカニズムで発現が制御されているのか（低下しているのか）は未解明であったが、本研究によりMeCP2を介したプロモーターメチル化制御やCEBP、アセチル化を介した転写活性化が神経細胞・非神経細胞で高度に制御されていることが明らかとなった。また、AVP分泌制御を介した病態変化の一端が示唆され、NLGN4Xの発現調節が自閉症発症の予防や病態改善に繋がるものと期待された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the epigenetic regulation of expression of the autism-susceptibility gene neuroligin 4X (NLGN4X), mainly through CpG methylation, and the regulation of hormone secretion through NLGN4X. In non-neuronal cells, the expression of both the core promoter and CGI promoter were repressed by CpG methylation and MeCP2 binding, while in neuronal cells, CEBP functioned to promote transcription. In NLGN4X-expressing cells, the interaction with NRXN1 and Syntaxin1A was found to work to inhibit AVP secretion.

研究分野：分子生物学

キーワード：NLGN4X 自閉症 エピジェネティクス CpGメチル化 iPSC CEBP MeCP2 AVP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 自閉症は、3歳までの小児で発症して障害が生涯にわたる精神疾患で、患者家族への負担が大きく、2014年の調査では68人に1人の割合で子供に現れるなど年々増加傾向であり、社会的に深刻な問題となっている。遺伝子要因が強く関与する脳の発達障害であるが、複数の関連遺伝子の変異の組み合わせにより危険度が増す一方で、遺伝子変異を有しないが、妊娠中のウイルス感染やストレス、薬物の服用、周産期のトラブルなど、何らかの環境要因が原因で遺伝子の発現に異常が生じた結果、発症するケースも多い。この場合、後天的にゲノムのメチル化やクロマチンの修飾、microRNAなどによる発現抑制など、エピジェネティカルな制御を受けることで遺伝子の発現異常が起こることが明らかになってきている。申請者は、自閉症原因遺伝子の一つNLGN4Xに着目し、そのモレキュラーネットワークの解明を通して、自閉症の病因・病態の解明を目指している。NLGN4Xは主に神経のシナプス後膜に発現し、シナプス前膜に発現するNeurexinと結合してシナプス形成とその維持に働く接着分子Neurologinの一種であり、自閉症患者で機能障害を有する変異や欠失が報告されている(Human Genet 1999, Nat Genet 2003, Am J Hum Genet 2004, Hum Mol Genet 2004, Mol Psychiatry 2005, J Med Genet 2006, Eur J Hum Genet 2008, Genet Test Mol Biomarkers 2009, J Neurosci 2009)。NLGN4ノックアウトマウスでは、社会性の欠如など自閉症様症状を示すことがわかっているが(Proc Natl Acad Sci USA 2008a, Behave Brain Res 2012)、マウスNLGN4はヒトNLGN4Xとは進化的にとっても異なった遺伝子であり(Proc Natl Acad Sci USA 2008b)、脳における発現部位もヒトとは異なっていることから、ヒトの自閉症の病因・病態の解明には、ヒトのNLGN4Xを調べなければならないと考えられる。

(2) 申請者は、ヒトNLGN4X特異的抗体を作成し、ヒト脳をはじめ、ヒト各組織及びヒトiPS細胞由来神経細胞における発現様式を初めて明らかにした(Mol Brain 2023)。脳では社会的行動の制御に重要な室傍核、視索上核のオキシトシン(OXT)、バソプレッシン(AVP)神経に強く発現し、その分泌制御に関わっていると考えられる。OXT/AVPはストレスセンサーであり、その遺伝子変異や多型は様々な精神疾患に関与している。また、両者のバランスは長期的な社会活動に大きく影響し、特にAVPは幼少期に強いストレスがかかるとゲノムの脱メチル化とMeCP2タンパク質の制御により永続的に高発現となり精神疾患を引き起こす(Proc Natl Acad Sci USA 2009)。過剰なAVPがアンタゴニストとしてOXTシグナルに影響を及ぼし、自閉症様症状を呈する。すなわち、AVPは多くても少なくとも自閉症の原因となりうることから、そのターンオーバーを正常に保つ事が自閉症の予防や改善に繋がることが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は、ヒト自閉症原因遺伝子ニューロリギン4X(NLGN4X)について、自閉症での遺伝子発現の変化の有無、その発現の増減を引き起こす非遺伝的背景(エピジェネティクス、環境要因)とそれによって引き起こされる分子病態を明らかにし、自閉症発症のメカニズムの解明や、発現量を指標とした新規診断法、及び発現調節を標的にした治療法の確立とQOLの改善を目的としている。具体的には(1)NLGN4X発現制御機構の解析(2)自閉症患者由来細胞を用いた発現と分子病態の解析(3)NLGN4X発現異常に起因する自閉症患者を判別する新規診断法の確立(4)発現調節活性を有する生理活性物質の探索と治療法の検討、を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) コアプロモーターを介した転写制御の解析

ゲルシフト法により結合可能性が示唆された CEBPs についてレポーターアッセイ及び ChIP アッセイによりコアプロモーターに作用しているかどうか調べた。

#### (2) 非神経細胞におけるプロモーター-CpG メチル化の解析

非神経細胞 (HeLa, HepG2) におけるコアプロモーター及び CGI プロモーターにおけるメチル化について Bisulfite-Sequence 法及び Methylation-Specific PCR (MSP) 法により解析した。

#### (3) iPSC からの神経分化における発現制御の解析

iPSC からの神経分化誘導における NLGN4X、CEBP の発現、及びプロモーターのメチル化について MSP 法により解析した。

#### (4) iPSC からの非神経分化における発現制御の解析

iPSC からの非神経細胞 (肝細胞) 分化誘導における NLGN4X、CEBP の発現、及びプロモーターのメチル化について MSP 法により解析した。

#### (5) エピゲノム編集による Gene Drive 解析

非神経細胞 (HeLa) を用いて、TSA 及び 5-AzaC による処理、CRISPR-CAS9 システムを用いた Gene Drive による転写活性化を解析した。

#### (6) NLGN4X 発現細胞における NLGN4X 相互作用分子の同定

NLGN4X 発現細胞 (TGW, Lu-165) で発現する Neurexins (NLGN4X リガンド) 及び細胞内で NLGN4X と相互作用する分子を免疫沈降法により同定した。

#### (7) NLGN4X による AVP 分泌制御の解析

NLGN4X の強制発現及び siRNA ノックダウンによる AVP 分泌量の変化を解析した。

### 4. 研究成果

(1) TGW 細胞を用いて NLGN4X コアプロモーター領域における ChIP 解析を行ったところ、CEBP、及び Sp1 が結合することがわかった。そこで各因子についてルシフェラーゼアッセイにより転写活性を調べたところ、CEBP に有意な転写促進活性が認められた。CEBP を siRNA でノックダウンすると NLGN4X Exon1A の発現が低下したことから、神経分化初期に働く NLGN4X コアプロモーターには CEBP が正に働いていると考えられた。

(2) HeLa, HepG2 各細胞におけるコアプロモーター及び CGI プロモーターのメチル化について Bisulfite-Sequence 法で調べたところ、神経細胞の TGW に比べコアプロモーターはやや弱く、CGI プロモーターは広範に渡りメチル化されていることがわかった。MSP 法によりメチル化頻度 (コア, CGI) を確認したところ HeLa では (30, 60)、HepG2 では (10, 15) と細胞種により異なることがわかった。

(3) iPSC からの神経細胞誘導過程において NLGN4X と CEBP の発現パターンを解析したところ、神経分化初期には NLGN4X Exon1A の発現が CEBP の発現とよく相関し、分化の進行と共に

発現が減少した。一方、分化後期において NLGN4X-Exon1C 及び CEBP の発現が分化進行と共に増加したが、NLGN4X-Exon1C については分化の成熟とともに発現が低下した。iPSC 神経分化誘導時の NLGN4X の発現変化はヒト脳内の発現変化とよく一致していた。また、プロモーターのメチル化はコアプロモーターについては NLGN4X-Exon1A の発現と緩く逆相関し、CGI プロモーターのメチル化には大きな変動は見られなかった。

(4) iPSC からの肝細胞誘導過程において NLGN4X と CEBP の発現パターンを解析したところ、NLGN4X-Exon1A の発現と CEBP の発現は緩やかに相関し減少していた。一方、NLGN4X-Exon1C はほとんど発現増加は見られないが、CEBP は肝細胞分化に働くため分化後期には発現が増加した。メチル化についてはコアプロモーターのメチル化増加と NLGN4X-Exon1A の発現減少が強く相関していること、CGI プロモーターメチル化は NLGN4X-Exon1C の発現同様、大きく変動しないことがわかった。

(5) HeLa 細胞を TSA 及び 5-AzaC により処理すると、NLGN4X-Exon1A のみ発現が上昇した。そこで CRISPR-CAS9 システム (p300/TET/VP160) を用いて NLGN4X のプロモーター領域全般について Gene Drive を試行したところ、NLGN4X-Exon1C の発現の増加が見られた。このことは、コアプロモーターは脱メチル化、脱アセチル化を介して働いたこと、CGI プロモーターはそれに加えて大きな転写促進活性の作用でドライブされたことを示唆している。これらの結果は将来的に NLGN4X 発現増加に基づいた治療法の確立に役立つものと考えられる。

(6) TGW、Lu-165 各細胞において Neurexin の発現を qPCR により解析したところ、NRXN-1 の発現が有意に高かった。免疫沈降により相互に結合すること、NRXN-1 -IgGFc により cAMP シグナルの上昇を確認した。一方、細胞内タンパク質との相互作用を免疫沈降により調べたところ、Syntaxin-1A, Syntaxin-5, SNAP-25, LAMP2 等が結合することが確認された。この結果、NLGN4X が分泌小胞や分泌タンパク質のターンオーバーに寄与している可能性が示唆された。

(7) Lu-165 細胞を用いて、NLGN4X の強制発現及び siRNA ノックダウンにより NLGN4X の発現量をコントロールすると、AVP の分泌量が逆相関し、NLGN4X が AVP 分泌に寄与していることが明らかとなった。NLGN4X が高塩濃度で発現上昇すること、AVP が水再吸収に作用し浸透圧を調節すること、NLGN4X 及び AVP の発現が浸透圧センサー細胞で高いことを考え合わせると、NLGN4X が AVP のターンオーバーを調節することで浸透圧調節に関与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4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takasu Soo, Watanabe Risa, Sugito Nobuhiko, Morikawa Kohei, Iio Akio, Esaka Yukihiro, Akao Yukihiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Unveiling the vitamin E profile in rice bran extracellular vesicles: evaluation of extraction and preparation methods	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 935 ~ 941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-024-00550-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Toya Akie, Fukada Masahide, Aoki Eiko, Matsuki Tohru, Ueda Masashi, Eda Shima, Hashizume Yoshio, Iio Akio, Masaki Shigeo, Nakayama Atsuo	4. 巻 16
2. 論文標題 The distribution of neuroligin4, an autism-related postsynaptic molecule, in the human brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-023-00999-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Matsuki Tohru, Iio Akio, Ueda Masashi, Tsuneura Yumi, Howell Brian W., Nakayama Atsuo	4. 巻 41
2. 論文標題 STK25 and MST3 Have Overlapping Roles to Regulate Rho GTPases during Cortical Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8887 ~ 8903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0523-21.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Masashi Ueda, Tohru Matsuki, Masahide Fukada, Shima Eda, Akie Toya, Akio Iio, Hidenori Tabata, Atsuo Nakayama	4. 巻 13
2. 論文標題 Knockdown of Son, a Mouse Homologue of the ZTTK Syndrome Gene, Causes Neuronal Migration Defects and Dendritic Spine Abnormalities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00622-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川口知子、杉戸信彦、清水雄太、飯田一規、黒田依澄、飯尾明生、手塚健一、山田陽一、赤尾幸博
2. 発表標題 米糊粉細胞由来エクソソーム様ナノ粒子は歯周炎の進行を抑制する
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木遥香、高須蒼生、飯尾明生、守川耕平、江坂幸宏
2. 発表標題 穀物類由来エクソソームのCZE挙動とCZEによる精製の検討
3. 学会等名 第43回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T.Soga, A.Iio, M.Hatakeyama, J.Aoki, K.Kishimoto, E.Sasaki, A.Takakura, M.Ito, Y.Akao, S.Habu, K.Fukasawa
2. 発表標題 Development of Quantitative and Qualitative Analytical Methods for Chorionic Gonadotropin in the Common Marmoset: Focusing on "Dual Checker", Simple and Practical Immunochromatographic Test Kit for Early Diagnosis of Pregnancy
3. 学会等名 The 4th Marmoset Bioscience Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 曽我拓馬、飯尾明生、畠山雅彦、青木仁星、赤尾幸博、岸本恵子、佐々木えりか、高倉彰、伊藤守、垣生園子、深澤一正
2. 発表標題 コモンマーモセットにおける絨毛性ゴナドトロピン (CG)の定量及び定性分析系の開発ー主としてマーモセットCG検出用イムノクロマト試薬Dual Checkerについてー
3. 学会等名 第31回サル疾病ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 曾我拓馬、畠山雅彦、飯尾明生、青木仁星、岸本恵子、佐々木えりか、高倉彰、伊藤守、垣生園子、深澤一正
2. 発表標題 コモンマーモセットにおける早期妊娠診断のためCG定量及び定性分析系の開発
3. 学会等名 第12回日本マーモセット研究会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 飯尾明生、畠山雅彦、曾我拓馬、青木仁星、深澤一正、赤尾幸博、伊藤守、高倉彰、佐々木えりか、垣生園子
2. 発表標題 マーモセット妊娠診断のための抗CG抗体の開発とELISA構築
3. 学会等名 第11回日本マーモセット研究会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松木亨、飯尾明生、上田昌史、常浦祐未、B.Howell、中山敦雄
2. 発表標題 STK25が関与する大脳皮質形成機構
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松木亨、飯尾明生、上田昌史、戸谷明恵、中山敦雄
2. 発表標題 Stk25とMST3による大脳皮質形成制御機構
3. 学会等名 NEURO2019 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松木亨、飯尾明生、上田昌史、戸谷 明恵、中山敦雄
2. 発表標題 Stk25 and MST3 act on neuronal polarization and migration in a compensation manner.
3. 学会等名 第41回日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松木亨、飯尾明生、中山敦雄
2. 発表標題 Stk25欠損マウスの発達において発達においてMST3が果たす代償的役割
3. 学会等名 日本組織培養学会第90回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松木亨、飯尾明生、上田昌史、戸谷明恵、中山敦雄
2. 発表標題 Stk25 and MST3 act on neuronal polarization, migration, and cardiovascular development
3. 学会等名 平成29年度「先端モデル動物支援」成果発表会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知県医療療育総合センター 発達障害研究所 細胞病態研究部門  
<https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/department/index.html>



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松木 亨  (Matsuki Tohru)  (90332329)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・主任研究員    (83902)	
研究分担者	上田 昌史  (Ueda Masashi)  (90791541)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・特別共同研究員    (83902)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関