

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：83902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16294

研究課題名(和文) 自閉症リスク分子DUSP22、MTNR1の病態形成機構の解明

研究課題名(英文) pathophysiology of DUSP22 and MTNR1 gene abnormalities

研究代表者

浜田 奈々子 (HAMADA, NANAOKO)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・分子病態研究部・研究員

研究者番号：70721835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症患者から同定されたMTNR1A、1B及びDUSP22遺伝子異常がASDを引き起こす分子メカニズムを解析することで、自閉症の病態形成機構の解明を目指した。DUSP22は発達期の発現についての情報が全く無かった為、抗体を作成し発現プロファイルを行なった。マウス組織において心臓、腓腸、骨格筋で高い発現が見られ、大脳、小脳でも発現していた。細胞内局在は細胞質全体に確認され部分的にアクチン細胞骨格と共局在していた。マウス大脳皮質神経細胞でDUSP22を発現抑制すると、樹状突起形成が抑制された。MTNR1A、1Bについては神経細胞移動、樹状突起形成、軸索伸長において形態学的な異常は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで全く不明であった自閉症関連遺伝子DUSP22のマウス発達期の組織ごとの発現や細胞内局在について詳細に示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We examined the role of MTNR1A, 1B and DUSP22 in brain development and the pathophysiological significance of these gene abnormalities. Information of tissue and subcellular distribution of Dusp22 is largely unknown while information on the quality of commercially available antibodies is very limited. Therefore, we here produced a rabbit polyclonal antibody specific for Dusp22 and performed expression analyses of the molecule. While western blotting analyses clarified that Dusp22 was dominantly expressed in heart and skeletal muscle. Dusp22 was diffusely distributed in the cytoplasm and partially colocalized with actin cytoskeleton. Silencing of DUSP22 prevented dendrite development in cortical pyramidal cells in vivo. Knockdown of MTNR1A and 1B did not affected cell morphology.

研究分野：大脳皮質形成

キーワード：自閉スペクトラム症

## 1. 研究開始当初の背景

DUSP22は自治医大のASD患者からハプロ不全が見出された遺伝子であり、トリオ解析により *de novo* の欠失であることが確認された。DUSP22は胎児脳に高発現する脱リン酸化酵素である。DUSP22はMAPキナーゼ (p38, JNK) シグナルの活性調節で重要な役割を果たすとされ、脳の発生にも重要な役割を担っていると考えられる。これまでにDUSP22の生化学的な解析は報告されているが、大脳皮質発生における役割を含めて神経機能は全く不明である。加えて市販抗体は少なく、各組織における分布、細胞内局在等の発現プロファイルはなされていない。また、同じく自治医大において、メラトニン受容体遺伝子MTNR1AおよびMTNR1Bのミスセンス変異(MTNR1Aのp.R54W, p.A157V、およびMTNR1Bのp.G24E, p.A325V)がASD患者より同定された(MTNR1A/Bは概日リズムを調節する)。既にASD患者での遺伝子変異の報告があり、変異によるメラトニン結合能や細胞内局在の変化が示唆されている。しかし、MTNR1A/Bが実際に脳形成に果たす役割は全く解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど報告がないDUSP22の発現について、ウサギポリクローナル抗体を作成し、マウス組織を用いて明らかにすること、またDUSP22のハプロ不全とMTNR1A/Bミスセンス変異を発生期のマウス大脳で模倣し、これらの遺伝子異常がASDを引き起こす分子メカニズムを包括的に解析することで、ASD病態形成機構の一端を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

マウスDUSP22に対するウサギポリクローナル抗体を作成し精製後、免疫沈降およびRNAiベクターを用いて作成した抗体のクオリティーを確認した。その後、マウスの各組織(大脳、海馬、小脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、小腸、膀胱、骨格筋、卵巣、精巣)での発現量や細胞内局在等の発現プロファイルを行なった。また病態解析については、DUSP22、MTNR1AおよびMTNR1BのRNAiベクター、MTNR1AおよびMTNR1Bの患者由来ミスセンス変異体を作成した。子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いて、胎生14日目のマウス胎児の大脳皮質神経幹細胞に上記RNAiベクターおよび患者由来変異体を導入し、遺伝子異常を模倣した。胎生17日目と、生後3, 7, 12, 21日目で脳スライス標本を作成し、幹細胞から誕生した神経細胞の分化、移動、配置、樹状突起形成、軸索伸長を観察することで、上記遺伝子群の大脳皮質形成における機能と遺伝子異常が引き起こす病態を評価した。

## 4. 研究成果

作成したDUSP22抗体は、免疫沈降およびRNAiベクターを用いた検証により、マウスDUSP22に反応し、同ファミリーに属するDUSP15及びDUSP23とは反応しなかったことから、特異性の高い抗体が作成できた。成獣マウス組織別のウェスタンブロッティングにおいて心臓、骨格筋で高い発現が見られ、膵臓、肝臓、大脳、小脳でもバンドが検出された。細胞内局在は細胞質全体に確認され部分的にアクチン細胞骨格と共局在していた。マウスパラフィン切片を用いた組織染色では、肺動脈血管壁、心筋、骨格筋で強い染色が確認された。また膵臓では内分泌および外分泌細胞の細胞質に局在していた。一方で、皮膚、腸では染色が確認されなかった。

また、病態解析においては、それぞれの遺伝子の神経発達における機能を解明するために、3種類のRNAiベクターを作成し、その効果を確認した。また、MTNR1A及びMTNR1Bについてはミスセンス変異体を作成した(p.R54W及びp.A325V)。そして、子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いて胎生14日目のマウス大脳皮質神経細胞でDUSP22を発現抑制したところ、神経細胞

移動、軸索伸長および神経細胞の最終配置は正常であった。一方で、樹状突起形成はコントロールと比較して発達抑制が確認された。MTNR1A、1B については神経細胞移動、樹状突起形成、軸索伸長において形態学的な異常は確認されなかった。本研究において、作成した DUSP22 抗体を用いたマウス組織での発現解析により、DUSP22 は脳、心臓、骨格筋をはじめ、多くの組織で発現が見られた。また、発現抑制により神経細胞の樹状突起発達が抑制されたことから、このことが自閉スペクトラム症の原因となっ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5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hamada N, Mizuno M, Tomita H, Iwamoto I, Hara A, Nagata K	4. 巻 418
2. 論文標題 Expression analyses of Dusp22 (Dual-specificity phosphatase 22) in mouse tissues	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Med. Mol. Morphol.	6. 最初と最後の頁 475-481
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-017-0178-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 永田浩一
2. 発表標題 遺伝子異常によって発症した自閉症・発達障害の病態メカニズム
3. 学会等名 日本医療研究開発機構 難治性疾患実用化研究事業公開シンポジウム
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 <a href="https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/index.html">https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/index.html</a> 愛知県医療療育総合センター発達障害研究所 <a href="https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/index.html">https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/index.html</a> 発達障害研究所神経制御学部の紹介 <a href="http://www.inst-hsc.jp/d-molecular/index.html">http://www.inst-hsc.jp/d-molecular/index.html</a>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------