

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14814

研究課題名(和文) 社会隔離によってエピジェネティックに影響を受ける遺伝子群とグリア細胞の同定

研究課題名(英文) Identify the genes and glia epigenetically affected by social isolation

研究代表者

臼井 紀好(Noriyoshi, Usui)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：00784076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では幼少期の乏しい社会環境が脳の発達と社会性の獲得に悪影響を与えるメカニズムを解明することを目的とした。幼少期に社会隔離を行ったマウスでは社会性行動の低下、不安様行動の増加を示し、前頭皮質では神経細胞とミクログリアの数が減少した。遺伝子発現解析では、転写調節、ストレス応答、シナプス機能に関わる遺伝子を同定し、これらの遺伝子が自閉スペクトラム症やストレス関連の疾患に関わることを明らかにした。また、最も有意に変動した遺伝子GeneS15のノックアウトマウスでは社会性行動が低下しており、幼少期の社会環境が脳の発達と社会性の獲得に与えるメカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、幼少期の社会環境が脳の脳と行動に与える影響が明らかになった。幼少期の社会環境は環境要因であることから、子どもの生育環境を整えることによって適切な脳の発達や社会性の形成、ストレスの軽減や予防などが期待できると考える。本研究での遺伝子発現や脳組織における知見は自閉スペクトラム症のモデルマウスの知見と類似することからも、前頭皮質の神経細胞のシナプス形成やミクログリアの適切な発達が社会性に関わる神経基盤に繋がるとが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to understand the mechanism of poor social environment in childhood that adversely affects brain development and sociality acquisition. Mice that underwent social isolation during childhood showed impaired social behavior and increased anxiety-like behavior, and decreased numbers of neurons and microglia in the frontal cortex. Gene expression analysis identified genes involved in transcriptional regulation, stress response, and synaptic function, and revealed that these genes are involved in autism spectrum disorders and stress-related diseases. In addition, the most significantly altered gene S15 knockout mouse showed an impairment in social behavior, uncovering a part of the mechanism by which the social environment in childhood influences brain development and acquisition of sociality.

研究分野：分子神経発達学

キーワード：社会性 環境要因 幼少期 ストレス エピゲノム トランスクリプトーム グリア ニューロン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ライフスタイルの変化による少子化や核家族化に加え、携帯電話などの技術発展に伴い、子どもが一人で過ごす時間が増え、他者と接する機会が著しく減少しつつある。現代社会における子どもを取り巻く社会環境が、脳と社会性の発達にどのような影響を与えるのかを理解することは重要である。

この背景として、(1)ルーマニアのチャウシェスク政権下では人工中絶禁止と人口増加政策により 10 万人以上の孤児が社会との関わりが少ない劣悪環境の国営施設で育てられ、自閉症様症状、知的障害、言語障害、認知障害、多動性障害などの精神症状を示したこと(Nelson et al., 2007, *Science*; Nelson et al., 2013, *Sci Am*)、(2)ウイスコンシン大学・Harlow らは新生児サルを出生後から半年隔離飼育すると自閉症様行動を示したことを報告した(Harlow et al., 1965, *PNAS*)。また、(3)ハーバード大・Makinodan らは仔マウスを生後 21 日から 35 日齢まで隔離飼育し、前頭前皮質の髄鞘化の臨界期がこの期間に存在すること(Makinodan et al., 2012, *Science*)、(4)奈良県立医大・Yamamuro らは同モデルにて前頭前皮質 5 層の錐体細胞の興奮性が低下することを報告した(Yamamuro et al., 2017, *Cereb Cortex*)。

以上から、幼少期の乏しい社会環境が脳の発達と社会性の獲得に悪影響を与えることが示唆されたが、メカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では幼少期の乏しい社会環境が脳の発達と社会性の獲得に悪影響を与えるメカニズムを解明することを目的とする。そのため、本研究では社会隔離マウスの前頭前皮質に着目して社会隔離によってエピジェネティックに影響を受ける遺伝子群の同定、及び神経細胞・グリア細胞を同定する。

3. 研究の方法

平成 30 年度の研究計画

(1)幼少期ストレスが成体の個体行動に与える影響の解析

幼少期の乏しい社会環境を再現するため、離乳直後の生後 21 日齢から生後 50 日齢まで隔離飼育したモデルマウスを作製する。この社会隔離マウスの行動解析を行い、不安様行動、社会性行動について解析を行う。対象となるマウスとの接触回数、時間を指標とし、各群 15 個体を 3 チャンバー試験に用いる。

(2)社会隔離によって影響を受ける DNA のメチル化解析

生後 51 日齢のマウス前頭前皮質からゲノム DNA とトータル RNA の同時抽出したゲノム DNA を用い、DNA メチル化修飾を同定するため MBD シークエンスを行う。メチル化シトシンに特異的に結合する MBD2 タンパク質をリガンドとし、MBD2 抗体によりメチル化領域の DNA 断片を回収したのちシークエンスサンプル調整とシークエンスを行う。その後、得られた配列情報をゲノム情報上にマッピングを行い、ピーク解析によってメチル化修飾領域を同定し、メチル化修飾を受ける遺伝子・プロモーター・非翻訳領域を網羅的に同定する。

(3)社会隔離によって影響を受ける遺伝子の発現解析

上述の通り、マウス前頭前皮質から同時抽出を行ったトータル RNA を用い、遺伝子発現の変化を解析するため mRNA シークエンスを行う。トータル RNA から polyA ビーズにより mRNA を精製したのちシークエンスサンプル調整とシークエンスを行う。その後、得られた配列情報をゲノム情報上にマッピングを行う。遺伝子発現変動解析、遺伝子オントロジー解析を行い、社会隔離によって影響を受ける遺伝子を網羅的に同定する。

(4)社会隔離によってエピジェネティックに影響を受ける遺伝子の同定

前述の DNA メチル化解析と遺伝子発現解析により同定した遺伝子リストを比較し、重複した遺伝子を「社会隔離によってエピジェネティックに影響を受ける遺伝子」と定義する。過去の文献も参考にしつつ最終的には DNA メチル化解析と遺伝子発現解析で重複し、社会隔離マウスで有意かつ大幅に発現が減少した遺伝子を 10 個程度に絞り込み、マウス前頭前皮質での発現を定量 PCR にて確認する。

(5)社会隔離によってエピジェネティックに影響を受ける遺伝子の機能解析

行動解析後に脳を固定し、作製した凍結切片を用いて、脳組織上で同定した遺伝子の免疫組織染色を行う。神経細胞に発現する遺伝子の場合、前頭前皮質の初代神経細胞培養を行い、shRNA を用いたノックダウン実験によって細胞分化と形態を調べる。また、胎生期マウスにおける子宮内エレクトロポレーション法を用いたノックダウン実験を行い、細胞移動・分化を調べる。グリア細胞に発現する遺伝子の場合、発現するグリア細胞の初代培養を行い、shRNA を用いたノックダウン実験によって細胞分化と形態を調べる。もし同定した遺伝子のノックアウトマウスや *fllox* マウスが存在する場合、速やかに導入して社会性行動を試験し、マウスの組織解析を含む機能解析を行う。

(6)社会隔離によって影響を受けるグリア細胞の解析

行動解析後に脳を固定し、作製した凍結切片を用いて、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアの各マーカーを用いた免疫組織染色を行い、それぞれのグリア細胞の細胞数を定量する。必要に応じて突起の長さ、形態の異常についても調べる。

(7)社会隔離によって影響を受ける深層の神経細胞の解析

行動解析後に脳を固定し、作製した凍結切片を用いて、深層の神経細胞マーカーによる免疫組織染色を行い、大脳皮質の層構造に着目してそれぞれの細胞数を定量する。必要に応じて樹状突起の長さやブランチングなどの形態異常についても調べる。

以上の実験から、社会隔離によってエピジェネティックに影響を受ける遺伝子群を DNA メチル化解析と遺伝子発現解析により同定する。同様に、社会隔離によって影響を受ける神経細胞・グリア細胞を免疫組織染色により同定し、社会性におけるグリア細胞と深層の神経細胞の役割を明らかにする。

4. 研究成果

社会隔離が成体の個体行動に与える影響

社会隔離マウスは成体において不安様行動が増加し、社会性行動と社会性認知行動の低下を示したことから、幼少期の社会環境が個体行動に影響を与えることを見出した。

後述の遺伝子発現解析の結果において、シナプス関連遺伝子の発現が同定されたことから、不安様行動と社会性行動のみならず、記憶や学習においても影響が出ていることが示唆されたため、今後は記憶や学習を含む、様々な行動試験を行うことで網羅的に影響を解析する必要がある。
社会隔離によってエピジェネティックに影響を受ける遺伝子

MBD シークエンス、及び mRNA シークエンスの結果、幼少期の社会環境によってエピジェネティックに影響を受ける遺伝子群を同定することができた。MBD シークエンスでは 50 を超えるメチル化ドメインが社会隔離によって有意にメチル化されることが明らかとなったが、これらのドメインにおける近傍遺伝子はわずか数個であった。また、データベース等の検索においてもこれらの遺伝子と社会性行動との関連は見い出せなかった。

しかしながら、mRNA シークエンスでは 15 個の遺伝子が有意に変動することが明らかとなった。同定した遺伝子数が少数であったため、全ての遺伝子に対する発現を定量 PCR にて検証したところ、別個体のマウス前頭皮質において mRNA シークエンス結果の再現性が確認できた。これら同定した遺伝子群は主に遺伝子発現などの転写調節、ストレス応答、シナプス機能に関わることが遺伝子オントロジー解析により明らかとなった。また、自閉スペクトラム症、ストレス関連や睡眠障害などの疾患にも関わることが示唆された。

さらに、詳細な解析を行うため、最も有意に変動した遺伝子 *GeneS15* のノックアウトマウスを導入し、社会性行動試験を行ったところ、有意に社会性行動が低下することを見出した。社会性に関わる *GeneS15* のノックアウトマウスの組織解析を行うことで社会性行動の神経基盤が明らかになる可能性が示唆された。

社会隔離によって影響を受ける神経細胞・グリア細胞

社会隔離を行ったマウスの前頭皮質の脳切片を作製し、神経細胞、グリア細胞の各種マーカーを用いた免疫染色を行ったところ、神経細胞の減少、ミクログリア数の増加が観察された。アストロサイトとオリゴデンドロサイトについては細胞数が減少する傾向が観察されたが、統計的な有意差は確認できなかった。また、深層の神経細胞の解析ではニッスル染色を行い、大脳皮質の厚さを定量したが、有意な差は観察されなかった。

さらに、前述の遺伝子発現解析の結果において、シナプス関連遺伝子の発現が同定されたことから、現在はゴルジ染色を行い樹状突起やシナプス数の定量を行っている。同様に、神経細胞のサブタイプの同定を行うため、各種神経細胞マーカーによる免疫染色を行い、減少した神経細胞の特定を行っている。アストロサイトとオリゴデンドロサイトについても分化段階の異なるマーカーを用いて詳細な解析を行っている段階である。

以上から、幼少期の社会環境は社会性の獲得だけでなく、脳内の適切な遺伝子発現と脳の発達において重要であることを見出した。また、乏しい社会環境は疾患への脆弱性を高める可能性が示唆され、幼少期の社会環境の重要性が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Berto Stefano, Mendizabal Isabel, Usui Noriyoshi, Toriumi Kazuya, Chatterjee Paramita, Douglas Connor, Tamminga Carol A., Preuss Todd M., Yi Soojin V., Konopka Genevieve	4. 巻 116
2. 論文標題 Accelerated evolution of oligodendrocytes in the human brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 24334 ~ 24342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1907982116	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 Mendizabal Isabel, Berto Stefano, Usui Noriyoshi, Toriumi Kazuya, Chatterjee Paramita, Douglas Connor, Huh Iksoo, Jeong Hyeonsoo, Layman Thomas, Tamminga Carol A., Preuss Todd M., Konopka Genevieve, Yi Soojin V.	4. 巻 20
2. 論文標題 Cell type-specific epigenetic links to schizophrenia risk in the brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genome Biology	6. 最初と最後の頁 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13059-019-1747-7	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

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 臼井紀好
2. 発表標題 子どもの社会性コミュニケーション能力形成の分子メカニズムの解明
3. 学会等名 福井大学「ライフサイクル医学」推進学部長裁量経費成果発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井紀好
2. 発表標題 Foxp1 regulation of neonatal vocal communication via cortical development
3. 学会等名 福井大学第9回優秀論文発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井紀好
2. 発表標題 自閉症における神経基盤の解明を目指して
3. 学会等名 第7回大阪大学神経難病フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井紀好
2. 発表標題 Approaching autism from molecules
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井紀好、島田昌一
2. 発表標題 脳回路形成における自閉症原因遺伝子FOXP1の役割
3. 学会等名 第94回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井紀好
2. 発表標題 ヒトの脳進化と脳機能障害
3. 学会等名 第8回自閉症学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白井紀好、松崎秀夫、小山佳久、中村雪子、近藤誠、島田昌一
2. 発表標題 社会性の形成に関わる神経基盤の探索
3. 学会等名 第1回医学系研究科-産業科学研究所懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤 誠、小山 佳久、中村 雪子、白井 紀好、島田 昌一
2. 発表標題 5-HT3受容体を介する新たな抗うつメカニズム
3. 学会等名 第1回医学系研究科-産業科学研究所懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山佳久、小林悠輝、近藤誠、白井紀好、小林光、島田昌一
2. 発表標題 酸化ストレスや炎症が関与する疾患に対するシリコン製剤の効果
3. 学会等名 第1回医学系研究科-産業科学研究所懇話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白井紀好、松崎秀夫、小山佳久、中村雪子、近藤誠、島田昌一
2. 発表標題 社会性の形成に関わる神経基盤の探索
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤誠、小山佳久、中村雪子、臼井紀好、島田昌一
2. 発表標題 5-HT3受容体を介する新たな抗うつメカニズム
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小山佳久、小林悠輝、近藤誠、臼井紀好、小林光、島田昌一
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎の新しい治療薬の開発
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 臼井紀好、松崎秀夫、小山佳久、中村雪子、近藤誠、島田昌一
2. 発表標題 社会性の形成に関わる神経基盤の探索
3. 学会等名 NEURO2019 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井紀好
2. 発表標題 若手のための若手キャリアパス実例
3. 学会等名 第12回神経化学の若手研究者育成セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤誠、小山佳久、中村雪子、白井紀好、島田昌一
2. 発表標題 運動効果に基づく新たなうつ病治療メカニズムの解明
3. 学会等名 NEURO2019 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山佳久、小林悠輝、近藤誠、白井紀好、大畠和也、猪原秀典、小林光、島田昌一
2. 発表標題 酸化ストレスを標的とした新規治療薬の開発
3. 学会等名 第8回大阪大学神経難病フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井紀好、小山佳久、小林悠輝、中村雪子、近藤誠、小林光、島田昌一
2. 発表標題 胎児期環境応答と脳の発生・発達障害メカニズム
3. 学会等名 第20回ORIGIN神経科学研究会夏のワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小山佳久、小林悠輝、近藤誠、白井紀好、小林光、島田昌一
2. 発表標題 新規抗酸化剤を用いた潰瘍性大腸炎の新たな治療法
3. 学会等名 第20回ORIGIN神経科学研究会夏のワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Berto S、Mendizabal I、臼井紀好、鳥海和也、Chatterjee P、Douglas C、Tamminga C、Preuss T、Yi SV、Konopka G
2. 発表標題 Accelerated evolution of oligodendrocytes in human brain.
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井紀好
2. 発表標題 Decoding the brain development and neurodevelopmental disorders
3. 学会等名 Korea Brain Research Institute International Workshop 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井紀好、松崎秀夫、Konopka G、島田昌一
2. 発表標題 自閉スペクトラム症における脳の発生・発達障害メカニズム
3. 学会等名 第46回日本脳科学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平井孝治、臼井紀好、松崎秀夫
2. 発表標題 自閉スペクトラム症男児の血漿中リポ蛋白リパーゼの検討
3. 学会等名 第46回日本脳科学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井紀好
2. 発表標題 幼少期のストレスが脳とこころの発達に与える影響の遺伝学的解析
3. 学会等名 パブリックヘルス科学研究助成金2018年度研究成果報告会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井紀好、Berto S、小山佳久、中村雪子、近藤誠、Konopka G、松崎秀夫、島田昌一
2. 発表標題 幼少期社会環境による発達障害の発症メカニズム
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 戸川省吾、白井紀好、小山佳久、小林悠輝、中村雪子、近藤誠、小林光、篠田晁、島田昌一
2. 発表標題 母子感染症に対する新規治療薬の開発
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村直也、小山佳久、小林悠輝、白井紀好、近藤誠、小林光、篠田晁、島田昌一
2. 発表標題 酸化ストレスに着目した新たな治療法の開発
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 白井紀好	4. 発行年 2019年
2. 出版社 公益財団法人パブリックヘルスリサーチセンター	5. 総ページ数 3
3. 書名 ストレス科学研究34巻	

〔出願〕 計7件

産業財産権の名称 記憶障害の予防又は治療剤	発明者 島田昌一、近藤誠、 小山佳久、白井紀 好、小林光、小林悠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-210724	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 自閉スペクトラム症の予防又は治療剤	発明者 島田昌一、白井紀 好、小山佳久、近藤 誠、小林光、小林悠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-212971	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 関節炎の予防又は治療剤	発明者 島田昌一、小山佳 久、近藤誠、白井紀 好、小林光、小林悠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-212972	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 内臓不快感の予防又は治療剤	発明者 島田昌一、小山佳 久、近藤誠、白井紀 好、小林光、小林悠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-212973	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 脊髄損傷後の障害もしくは症状の予防又は治療剤	発明者 島田昌一、小山佳 久、近藤誠、白井紀 好、小林光、小林悠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-212974	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 糖尿病の予防又は治療剤	発明者 島田昌一、小山佳 久、近藤誠、白井紀 好、小林光、小林悠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-213065	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 虚血性脳血管障害の予防又は治療剤	発明者 島田昌一、小山佳 久、近藤誠、白井紀 好、小林光、小林悠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-213066	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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