

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03629

研究課題名(和文)細胞周期制御遺伝子群の異常に基づく発達障害の病態メカニズム解析

研究課題名(英文) Pathophysiological mechanisms of neurodevelopmental disorders caused by abnormalities of cell cycle-regulatory genes

研究代表者

永田 浩一 (Nagata, Koh-ichi)

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・部長

研究者番号：50252143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性小頭症(MCPH)は、細胞周期制御遺伝子(CCRG)の異常を原因とする遺伝性疾患で知的障害(ID)を必発する。大脳発生時に神経細胞の増殖障害や細胞死が誘導されることで発症すると考えられる。MCPHは脳構造自体には顕著な異常がないことが多く、神経細胞の不足によりシナプス形成不全が起きることがIDの原因と考えられる。一方、神経細胞の“数の不足”に加えて、発達期大脳皮質における神経細胞の移動・局在異常もIDの病態に関与する可能性もある。

本研究では、CCRGであるCEP152の病的パリアントの包括的解析を行い、病態形成メカニズムの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに神経細胞増殖障害によって発症するとされてきた遺伝性小頭症の病態形成メカニズムに新たな視点を見出した点に学術的意義がある。すなわち、中心体蛋白質CEP152の遺伝子異常が、神経細胞の増殖障害(中心体固有の機能障害)のみでなく、分化後の神経細胞のシナプス機能にも障害を引き起こすことを見出した。この成果は、CEP152に従来想定されていなかった新規機能があることを示している。中心体生物学とシナプスネットワーク形成の相互連関を明らかにして点でも本研究の意義は大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Centrosomal protein 152 (CEP152) regulates the centriole duplication/shape and cell polarity during the cell cycle. CEP152 gene abnormalities are responsible for autosomal recessive primary microcephaly 9 (MCPH9). We here identified two novel de novo compound heterozygous CEP152 variants, c.314G>A/p.(Trp105\*) and c.2689A>T/p.(Lys897\*), in a patient. While the p.Trp105\* variant underwent protein degradation, the p.Lys897\* variant was abnormally distributed in cytoplasm of neuronal cells. We then developed a mouse model harboring the variants equivalent to the human condition. The mice displayed abnormal centrosome maturation and increased apoptosis in cortical neurons. Electrophysiological analyses revealed abnormal synaptic properties in cortical neurons in the mice. The CEP152 variants may be associated not only with defects in neural proliferation, but also with impaired synaptic function. This study should highlight a connection between centrosomal biology and synaptic network.

研究分野：小児発達障害

キーワード：CEP152 遺伝性小頭症 モデルマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝性小頭症は、細胞周期制御蛋白質の異常を原因とする遺伝性疾患で知的障害 (ID) を必発する。大脳発生時に細胞周期の障害が生じ、神経細胞の増殖障害や細胞死が誘導されることで小頭症になると考えられる。遺伝性小頭症になっても脳構造自体には顕著な異常がないことが多く、神経細胞の不足によりシナプスのネットワーク形成不全が起きることが ID の原因と考えられる。一方、遺伝性小頭症患者では脳回の複雑性が失われる場合も多く、神経細胞の“数の不足”に加えて、発達期大脳皮質における神経細胞の移動・局在異常も ID の病態に関与する可能性もある。しかし、細胞周期制御蛋白質が神経細胞 (増殖を終えて分化が完了している) で果たす機能や、その遺伝子異常が引き起こす発達障害 (小頭症を含む) の病態メカニズムは国内外で殆ど研究されていなかった。

### 2. 研究の目的

小頭症を伴わない発達障害患者の存在を勘案すれば、細胞周期制御蛋白質群は、神経細胞の増殖以外にも高次脳機能を制御する可能性が高い。そこで本研究では、細胞周期制御遺伝子異常が大脳皮質発生 (神経細胞の移動・形態、軸索・樹上突起形成、シナプス形態・機能、細胞周期、細胞死) に及ぼす影響を解析することで、1) 細胞周期制御蛋白質の機能異常による病態メカニズムの解明、2) 細胞周期制御蛋白質の新規生理機能の解明、3) 異常表現型の改善を指標とする治療法開発の基盤固め、を目指した。ちょうどその頃、当中央病院では小頭症患者の全エクソーム解析により、*CEP152* の新規複合ヘテロミスセンス変異 (c.314G>A/p.W105\* と c.2689A>T/p.K897\* ; 新規の機能喪失型変異) を見出した。*CEP152* は遺伝性小頭症の原因遺伝子であり、細胞分裂に先立って起こる中心体複製に必須の役割を担う。*CEP152* の中心体複製機構については知見が集積しているが、遺伝子異常が引き起こす小頭症の病態形成メカニズムは不明な点が多い。そこで、*CEP152* の機能障害に基づく遺伝性小頭症の病態メカニズム解析を行うこととした。*CEP152* 以外にも、細胞周期制御蛋白質である *CEP120*, *SPICE*, *STIL* を研究対象とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 子宮内胎仔脳電気穿孔 (エレクトロポレーション) 法を用いた解析

マウス胎仔脳に *CEP152*, *CEP120*, *SPICE*, *STIL* の RNAi / 発現ベクターを導入し、疾患における遺伝子異常を模倣する。そして、その結果として起こる神経細胞の増殖・移動・形態の変化、および細胞・蛋白質レベルでの性状変化を解析する。

— 固定切片観察 胎生 14 日のマウス脳に RNAi ベクターや変異体を導入する。導入後、遺伝子異常の模倣の結果として起こる神経細胞の移動・形態の経時的変化を、共焦点レーザー顕微鏡で解析する。最初に行ったこの実験で、表現型に変化が見られたのは *CEP152* だけだったので、以後の実験は *CEP152* を主要な解析対象として行った。

— 細胞増殖と細胞死の検討 発現抑制や小頭症患者から同定された患者由来疾患変異体の過剰発現を行い、脳室帯の幹細胞における細胞増殖への影響を検証する。また、cleaved-Caspase-3 発現によるアポトーシスも解析する。

— *CEP152* 遺伝子変異が自身と *PLK4* 局在に及ぼす影響の検討

小頭症患者から同定された患者由来疾患変異体を作成し、神経幹細胞での細胞内局在と結合分子である *PLK4* の局在に及ぼす影響を検討する。

## ( 2 ) iGONAD 法を用いた CEP152 変異マウスの作成

iGONAD 法 ( improved-Genome editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery ) は妊娠マウスの卵管内に Crisper Cas9 ・ ガイド RNA を注入、電気穿孔法により受精卵に導入し、遺伝子改変動物を作出する手法である。この技術を用いて患者の c.314G>A/p.W105\* と c.2689A>T/p.K897\* を模倣したモデルマウス ( CEP152m マウス ) を作成し、脳室帯の幹細胞における神経幹細胞の増殖や神経細胞への影響を検証する。その際、Caspase-3 発現や TUNEL 法でアポトーシスも解析する。また CEP152 の増殖制御以外の新規機能を想定し、神経細胞の形態解析、電気生理学的解析を行う。

### 4 . 研究成果

CEP152 発現を抑制する RNAi ベクターを 2 つ選定し、子宮内胎仔脳電気穿孔法によりマウスの神経幹細胞に導入し、そこから誕生する神経細胞の移動を観察したところ、CEP152 の発現抑制により神経細胞移動が著しく障害された。一方で患者由来疾患変異体は移動障害を引き起こさなかった ( 図 1 ) 。発現抑制による移動障害は生後 6 日目も解消されず、最終配置に影響を及ぼした。また発現抑制した神経細胞では cleaved-Caspase-3 発現が見られ、アポトーシスが亢進していた。さらに疾患変異体を神経幹細胞に導入し、幹細胞での細胞内局在と PLK4 ( CEP152 と相互作用することが知られる蛋白質リン酸化酵素。PLK4 それ自身も発達障害の責任遺伝子である ) の局在を観察したところ、野生型 CEP152 と PLK4 を導入すると、両者共に中心体に局在が観察された。一方、疾患変異体は細胞質全体に拡散して局在し、PLK4 も同様の局在が観察された ( 図 2 ) 。

次に iGONAD 法を用いて患者の変異を模倣したマウスを作成し、神経幹細胞の増殖や神経細胞への影響を検討した。変異マウスは出生時に既に体が小さく、それに応じて脳も小さかった。小脳の脳回が浅いこと以外に目立った脳の形成異常はなく、これらは小頭症患者の典型的な所見と類似していた ( 図 3 ) 。組織学的解析により、変異マウスでは有糸分裂期の中心体の数が野生型と比較して有意に減少していた。また分裂細胞が多く見られる精巣や、発達期の小脳ではアポトーシスが亢進していた。

変異体を導入した細胞では PLK4 の中心体への集積が殆ど見られなかったことから、PLK4 の局在異常が中心体複製を障害し、ひいては細胞分裂異常を引き起こしていることが示唆された。また変異マウスの解析では分裂細胞の中心体数の減少、アポトーシスの更新が観察されたことから、PLK4 の局在異常を起因とする中心体複製障害、細胞分裂異常が小頭症の原因となっている可能性が示唆された。また現在までに進めている電気生理学的解析の基礎的データから、CEP152 が増殖制御以外の新規機能を持つ可能性が示された。実際、私共は、CEP152 が興奮性神経細胞の樹状突起スパインに局在し、シナプス機能に関与する可能性を示している。今後 RNA-seq などを行い、CEP152 の新たな機能を明らかにしていきたい。

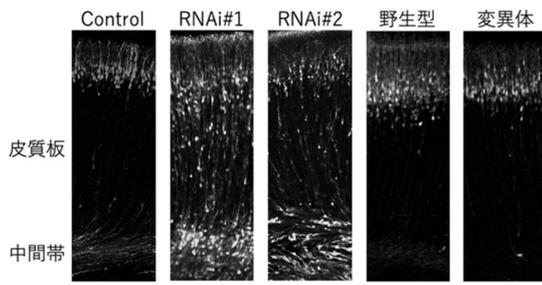


図1. 発現抑制、変異体発現が神経細胞移動に及ぼす影響

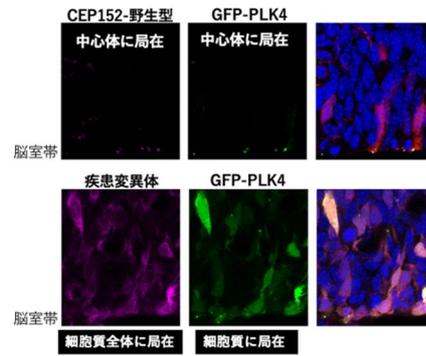


図2. CEP152とPLK4の細胞内局在

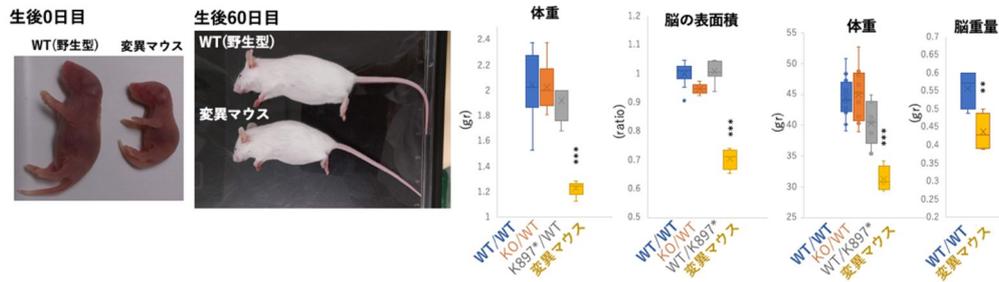


図3. iGONAD法を用いて作成したCEP152変異マウス

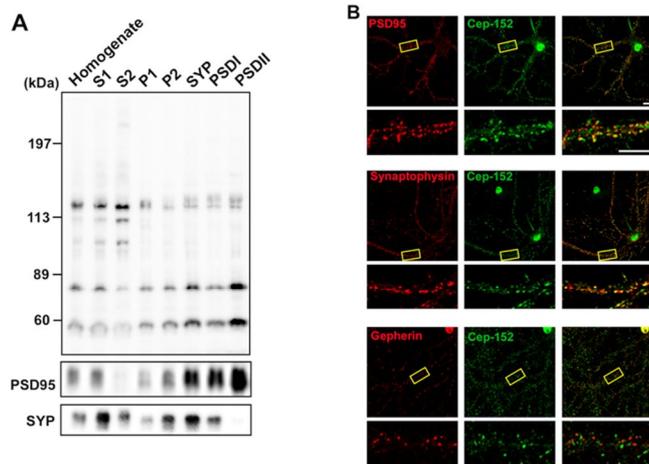


図4. CEP152のシナプス局在. (A) 生化学的実験による後シナプス分画 (PSD) への局在. (B) 海馬神経細胞における興奮性シナプスマーカーとの共局在. 抑制性シナプスマーカー(Gepherin)とは共局在しない.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Nishikawa Masashi、Ito Hidenori、Noda Mariko、Hamada Nanako、Tabata Hidenori、Nagata Koh-ichi	4. 巻 44
2. 論文標題 Expression Analyses of Rac3, a Rho Family Small GTPase, during Mouse Brain Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 49 ~ 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000521168	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 -
1. 著者名 Noda Mariko、Ito Hidenori、Nagata Koh-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Physiological significance of WDR45, a responsible gene for -propeller protein associated neurodegeneration (BPAN), in brain development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02123-3	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 -
1. 著者名 Ito Hidenori、Morishita Rika、Noda Mariko、Ishiguro Tomoki、Nishikawa Masashi、Nagata Koh-ichi	4. 巻 297
2. 論文標題 The synaptic scaffolding protein CNKSR2 interacts with CYTH2 to mediate hippocampal granule cell development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101427 ~ 101427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101427	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 -
1. 著者名 Hamada Nanako、Iwamoto Ikuko、Nishikawa Masashi、Nagata Koh-ichi	4. 巻 43
2. 論文標題 Expression Analyses of Mediator Complex Subunit 13-Like: A Responsible Gene for Neurodevelopmental Disorders during Mouse Brain Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 43 ~ 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000515188	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 -

1. 著者名 Nishikawa Masashi、Ito Hidenori、Noda Mariko、Hamada Nanako、Tabata Hidenori、Nagata Koh-ichi	4. 巻 54
2. 論文標題 Expression analyses of PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, during mouse brain development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 146 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-020-00275-1	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 -

1. 著者名 Hamada Nanako、Iwamoto Ikuko、Kawamura Noriko、Nagata Koh ichi	4. 巻 157
2. 論文標題 Heterotrimeric G protein, Gi1, is involved in the regulation of proliferation, neuronal migration, and dendrite morphology during cortical development in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 1167 ~ 1181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15205	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 -

1. 著者名 Noda Mariko、Iwamoto Ikuko、Tabata Hidenori、Yamagata Takanori、Ito Hidenori、Nagata Koh-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of Per3, a circadian clock gene, in embryonic development of mouse cerebral cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5874-5874
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42390-9	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 -

1. 著者名 Ibaraki Kyoko、Hamada Nanako、Iwamoto Ikuko、Ito Hidenori、Kawamura Noriko、Morishita Rika、Tabata Hidenori、Nagata Koh-ichi	4. 巻 41
2. 論文標題 Expression Analyses of POGZ, A Responsible Gene for Neurodevelopmental Disorders, during Mouse Brain Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Neuroscience	6. 最初と最後の頁 139 ~ 148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000502128	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 -

1. 著者名 Komabayashi-Suzuki Mariko, Yamanishi Emiko, Watanabe Chisato, Okamura Megumi, Tabata Hidenori, Iwai Ryota, Ajioka Itsuki, Matsushita Jun, Kidoya Hiroyasu, Takakura Nobuyuki, Okamoto Tadashi, Kinoshita Kazuo, Ichihashi Masamitsu, Nagata Koh-ichi, Ema Masatsugu, Mizutani Ken-ichi	4. 巻 29
2. 論文標題 Spatiotemporally Dependent Vascularization Is Differently Utilized among Neural Progenitor Subtypes during Neocortical Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1113 ~ 1129.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.09.048	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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 浜田奈々子、西條琢磨、西川将司、上原朋子、武内俊樹、小崎健次郎、水野誠司、永田浩一
2. 発表標題 小頭症/Seckel症候群の原因遺伝子CEP152の新規遺伝子変異同定と病態形成メカニズムの解明
3. 学会等名 第44回日本小児遺伝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浜田奈々子、永田浩一
2. 発表標題 発達障害責任遺伝子MED13Lの神経発達における役割と遺伝子変異がもたらす病態機能解析
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浜田奈々子、永田浩一
2. 発表標題 Essential role of MED13L, a responsible gene for autism spectrum disorders, in brain development
3. 学会等名 第54回日本神経化学学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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