

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：83902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22888

研究課題名（和文）小頭症責任分子PLEKHG2が脳皮質・海馬形成に果たす役割と病態形成機構の解析

研究課題名（英文）Pathophysiological analyses of PLEKHG2, a responsible gene for neurodevelopmental disorders, during corticogenesis

研究代表者

西川 将司（Nishikawa, Masashi）

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・リサーチレジデント

研究者番号：00871758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、PLEKHG2の変異（c.610C > T/p.Arg204Trp）が、小頭症を伴う知的障害を引き起こす病態機構を解析した。具体的には、生化学的分析により、当変異は機能喪失型であることを明らかにすると共に、マウス子宮内胎仔脳電気穿孔法により神経細胞内のPLEKHG2を発現抑制（病態を模倣）したことで、PLEKHG2-Rac/Cdc42-PAK1シグナルが神経細胞の軸索・樹状突起・スパイン形成過程に重要であり、変異によるシグナル不全が神経細胞の分化障害を引き起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、PLEKHG2変異（c.610C > T/p.Arg204Trp）による小頭症・知的障害の病態メカニズムは、PLEKHG2のシグナル不全による神経細胞の分化障害に起因することが強く示唆された。さらに、PLEKHG2のエフェクター分子群（Rac, Cdc42, PAK1）に介入することによって、神経細胞の分化障害を改善することにも成功した。本結果は、PLEKHG2変異による小頭症・知的障害発症機構の解明と、それに対する治療法・薬開発戦略の重要な知見となる。

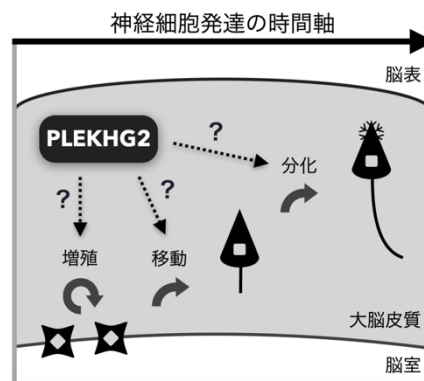
研究成果の概要（英文）：Homozygosity of the p.Arg204Trp variation in PLEKHG2 (PLEK2) is responsible for microcephaly with intellectual disability. However, the role of PLEK2 during neurodevelopment remains unknown. In this study, we analyzed PLEK2 function during cortical development in vivo. The variant in PLEK2 (PLEK2-RW) showed decreased guanine nucleotide-exchange activity for Rac and Cdc42. Acute knockdown of PLEK2 using in utero electroporation-mediated gene transfer delayed dendritic arbor formation at postnatal day 7 (P7), perhaps because of impaired Rac/Cdc42 and PAK1 signaling pathways. Axon pathfinding was also impaired in PLEK2-deficient neurons. At P14, knockdown of PLEK2 was observed to cause defects in dendritic spine formation. Collectively, these results strongly suggest that PLEK2 has essential roles in the maturation of axon, dendrites, and spines. Moreover, impairment of PLEK2 function is most likely to cause defects in neuronal functions that lead to neurodevelopmental disorders.

研究分野：神経発達

キーワード：神経発達 発達障害 細胞骨格 シグナル伝達 Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

小頭症・知的障害責任分子 PLEKHG2 は、脳構造形成・発達に必須の役割を果たすことが確実視されるが、中枢神経発達過程における生理機能は全く不明であり、その遺伝子変異 (c.610C>T/p.Arg204Trp) の病態機構は未解明だった。申請者は過去に、PLEKHG2 が Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質である Rac/Cdc42 (細胞形態の制御因子) のグアニンヌクレオチド交換因子であることを論文報告してきた。すなわち PLEKHG2 は、Rac/Cdc42 シグナル制御を介して、神経細胞の形態変化を伴う発達、増殖・移動 (皮質層構造形成)・分化 (軸索・樹状突起・シナプスネットワーク構築)、の何れかで必須の役割を担い、その破綻が発達障害を引き起こすことが予想された (右図)。



2. 研究の目的

神経発達における PLEKHG2 の生理機能 (増殖・移動・分化の制御) と、その破綻による発達障害の病態メカニズムの解明を目的として本研究を企画した。具体的には、発達期のマウス神経細胞・脳組織を用いて、マウス *Plek2* (*Plek2*) の発現解析・特異的機能の追求、および、ヒト PLEKHG2 変異に相当するマウス *Plek2* p.Arg200Trp (*Plek2*-RW) の変異体性状解析・発達障害の病態メカニズム解析を行なった。

3. 研究の方法

1) マウス神経細胞、脳組織における *Plek2* の発現解析: 自作した抗 *Plek2* 抗体を用いて、各発達段階 (胎生 13.5~生後 30 日) の脳サンプル、生化学的に分画したシナプス画分サンプル等でイムノブロット解析を行なった。また、初代培養海馬神経細胞 (培養 3~14 日)、各発達段階 (胎生 14~生後 30 日) の脳パラフィン切片の免疫染色を行い、発現プロファイルを解析した。

2) *Plek2* の生理機能解析、および、*Plek2*-RW の病態解析: 培養細胞系を用いて *Plek2* のシグナル解析、および、*Plek2*-RW の性状解析 (Gain-of-Function、Loss-of-Function、Dominant negative の決定) を行なった。一方、神経発達における *Plek2* の生理機能/病態解析では、マウス子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いて胎生 14.5 日で内在性 *Plek2* 発現抑制、もしくは *Plek2* 発現抑制下で *Plek2*-RW 変異体発現を行ない、胎生 16, 生後 0, 7, 14 日目で脳スライス標本を作成し、神経細胞の増殖・移動・分化 (軸索伸長、樹状突起発達、スパイン形成) への影響を形態学的に解析した。また、*Plek2* が神経細胞の形態制御に自律的 (cell autonomous) に果たす役割を、内在性 *Plek2* 発現抑制による初代培養皮質神経細胞の軸索・樹状突起の発達への影響を観察することで解析した。さらに、当異常表現型を改善する治療法候補を探索するため、*Plek2*→Rac/Cdc42 シグナル経路のエフェクター解析、および、該当エフェクターによる神経発達障害 (形態異常) のレスキュー実験を行なった。

4. 研究成果

1) マウス *Plek2* の発現解析 (引用 1)

抗 *Plek2* 抗体を作成し、マウス中枢神経組織における発現プロファイルを解析した。その結果、成獣マウスの大脳皮質・海馬で *Plek2* が発現すること、胎生期から成獣マウスの脳組織で *Plek2*

の発現が発達依存的に変化することが判明した。また、成獣脳組織を生化学的に分画して得たシナプス小胞画分とシナプス後膜画分に、Plek2も濃縮されていることが判明した。次に、発生過程のPlek2の局在を免疫組織染色法により検討した結果、胎生14日目の脳室帯細胞、生後7・30日目の大脳皮質2/3層、および5層、海馬歯状回・CA1野の神経細胞に強く発現していることを観察した。また、発達に伴いニューロピルの染色も認められた。次に、海馬初代培養神経細胞におけるPlek2の細胞内局在を免疫蛍光染色で検討した。培養3・7日目では、細胞質、軸索、樹状突起上に発現していた。さらに、培養14日目では、興奮性シナプス前膜マーカーSynaptophysin、後膜マーカーPSD-95、および抑制性シナプスマーカーGephyrinと部分的に共局在していた。これらの結果から、Plek2が、神経組織発達、および神経回路ネットワーク形成に関与する可能性が示された。

2) Plek2 遺伝子変異による神経発達障害の発症メカニズムの解析 (引用 2)

小頭症・知的障害の原因となるヒト PLEKHG2 変異 (c.610C>T/p.Arg204Trp) に相当するマウス Plekhg2 p.Arg200Trp (Plek2-RW) による神経細胞発達への影響について、形態学および生化学的性状解析と病態解析を行った。培養細胞系を用いた性状解析の結果、Plek2-RW は Rac/Cdc42→PAK1 シグナル不全を引き起こす Loss-of-Function 型変異であることがわかった。次に、マウス子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いて神経細胞内の Plek2 をノックダウンし (病態模倣)、神経細胞発達への影響を検討した。その結果、神経細胞の増殖・移動には影響を与えなかったが、生後7日時点において顕著な樹状突起の形成不全を示した (図1)。さらに生後14日時点において、樹状突起のスパン密度が低下することを観察した。また、Plek2 ノックダウンによる樹状突起形成不全は、Plek2 の下流エフェクター (Rac3, Cdc42, PAK1) を発現させることによって改善されることも示した (図2)。一方、Plek2 ノックダウンは生後7日目時点の脳梁軸索投射を障害し、初代培養皮質神経細胞 (培養2日目) においても同様に軸索伸長障害がみられたことから、Plek2 が神経細胞の形態制御に自律的に関与していることを示した。以上の結果から、神経細胞の樹状突起・軸索形成過程において、PLEKHG2→Rac/Cdc42→PAK1 シグナルが重要であり、そのシグナル不全による制御破綻が神経細胞の発達障害を引き起こすことが示唆された。本結果は、PLEKHG2 変異による小頭症・知的障害の発症機構を解明する上で重要な知見となる。

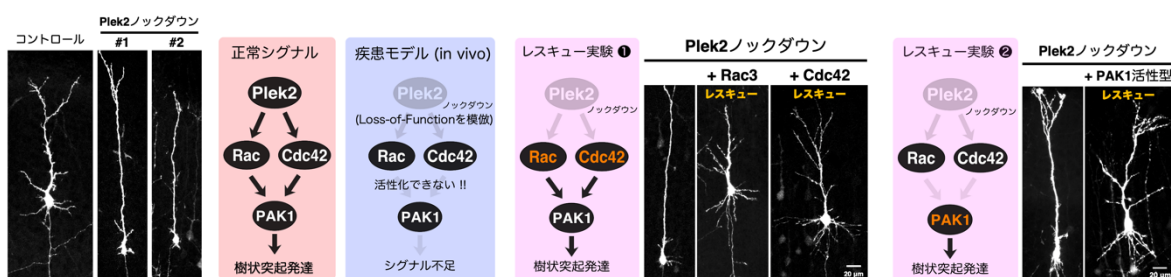


図1 Plek2 発現抑制による樹状突起発達への影響 (in vivo)

図2 樹状突起発達における Plek2 シグナルの検討、異常表現型のレスキュー実験

<引用文献>

- 1) Masashi Nishikawa, Hidenori Ito, Mariko Noda, Nanako Hamada, Hidenori Tabata, Koh-ichi Nagata, Expression analyses of PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, during mouse brain development, Medical Molecular Morphology (54, 146-155, 2021)
- 2) Masashi Nishikawa, Hidenori Ito, Hidenori Tabata, Hiroshi Ueda, Koh-ichi Nagata, Impaired Function of PLEKHG2, a Rho-Guanine Nucleotide-Exchange Factor, Disrupts Corticogenesis in Neurodevelopmental Phenotypes, Cells (11, 696-696, 2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 -
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 -
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、Nishikawa Masashi、Nagata Koh-ichi	4. 巻 -
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 1~10
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、Tabata Hidenori、Ueda Hiroshi、Nagata Koh-ichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Impaired Function of PLEKHG2, a Rho-Guanine Nucleotide-Exchange Factor, Disrupts Corticogenesis in Neurodevelopmental Phenotypes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 696~696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11040696	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 永田 浩一、西川 将司、伊東 秀記、野田万理子、浜田奈々子、田畑 秀典
2. 発表標題 発達障害責任遺伝子PLEKHG2の神経組織における発現解析
3. 学会等名 日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井藤 拓哉、後藤 未沙紀、中野 駿、西川 将司、山川 央、長瀬 隆弘、上田 浩
2. 発表標題 アダプタータンパク質NCK2によるSH3ドメインを介したRho活性化因子PLEKHG1の活性制御
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川 将司、伊東 秀記、田畑 秀典、永田 浩一
2. 発表標題 Rho活性化因子PLEKHG2の機能欠損は神経発達を障害する
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022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
---------	---------