

平成23年5月20日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790974

研究課題名(和文)

シナプス形成分子のエピジェネティックな調節に基づく小児自閉症の病態解明アプローチ

研究課題名(英文)

The epigenetic mechanism of synaptic molecules in autism

研究代表者

平澤 孝枝 (HIRASAWA TAKAE)

山梨大学・大学院医学工学研究部・助教

研究者番号：10402083

研究成果の概要(和文)：

小児自閉症疾患の一つであるレット症候群の神経症状がシナプス形成の異常であり、それに関わる遺伝子の調節異常であると想定してレット症候群責任蛋白 MeCP2 とシナプス形成分子である MALS-1 遺伝子の発現調節機構の解明を行った。MeCP2 ノックアウトマウスの大脳皮質における MALS-1 蛋白の発現は野生型に比して減少していた。更に Neuro2A 細胞における siRNA-MeCP2 を用いたノックダウン実験においても発現の減少が認められた。MeCP2 は DNA のメチル化に寄与する遺伝子であるが MALS-1 はこれまでの報告と違い MeCP2 蛋白によって発現を促進されるという事が示唆された。したがって、レット症候群における自閉症症状に MALS-1 の発現低下によるシナプス形成異常が密接に関連していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Rett syndrome, one of the childhood autism, is identified MeCP2 as responsible protein. We assumed the dysregulation of genes involved in synapse formation of symptom in this syndrome. We identified MALS-1 gene is a new gene regulated by MeCP2. In the cerebral cortex of MeCP2-KO mice, MALS-1 protein expression was decreased compared to wild type. Neuro2A, a neuroblastoma cells, the siRNA-MeCP2 also showed the decrease of expression of MALS-1 mRNA. MeCP2 is a DNA methylation of genes that contribute to MALS-1, unlike previous reports it was suggested that MeCP2 is enhanced by this protein expression. Therefore, the symptom of autism in Rett syndrome is suggested that the MALS-1 related to the abnormal expression of synapse formation by a decline.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：脳、エピジェネティクス、自閉症

1. 研究開始当初の背景

レット症候群の原因は、DNA 結合蛋白質である MeCP2 蛋白 (methyl CpG binding protein 2) の異常であることが判明し、*MeCP2* 遺伝子変異による DNA のメチル化による遺伝子の調節の異常が明らかになった。レット患者では、本来転写抑制されるべき遺伝子が MeCP2 蛋白の変異により制御されずに過剰発現していることが推察され、これまでに MeCP2 蛋白の標的遺伝子の探索多数行なわれており、神経栄養因子の *BDNF* や GABA 合成酵素の 1 つである GAD の発現誘導に関与する *DLX5* が同定されたが、依然としてその大半は不明のままである。一方自閉症疾患を始めとした発達障害がシナプス形成の異常と関連がある事は脆弱性 X 症候群やダウン症を始めとした患者の死後脳等から報告されており、シナプスを形成する樹状突起の先端部分 (スパイン) の形態異常が密接に関係している事が分かっている。しかしながら、これらの疾患とスパインの形態異常や機能異常に関わる遺伝子は未だはっきりしていない。

2. 研究の目的

本症の病態は脳内の神経に関わる遺伝子の発現調節の異常であることが示唆されている。しかしながら、レット症候群の神経症状は乳児期にははっきりせず幼児期になって顕著になることから、脳の発生異常ではなく脳の機能維持の障害が想定されてきたが、その詳細は明らかでなかった。一方で近年、シナプス形成に関わる種々の遺伝子の変異が自閉症の原因であることが判明してきた。こ

のような中、我々は、最近、MeCP2 蛋白質が結合するメチル化遺伝子の探索を行い、シナプス形成に関連する遺伝子である *MALS-1* (Mammalian homologues *lin7A*; 以下 *MALS-1*) が見出され、MeCP2 蛋白がその調節に関わっていることを見出した。これらの知見をふまえ、本研究の目的は、神経培養細胞やノックアウトマウスを材料に MeCP2 蛋白低下状態における *MALS-1* の発現異常とシナプス機能の異常を明らかにする事とする。

3. 研究の方法

神経細胞における *MALS-1* 遺伝子と MeCP2 蛋白の関連性: 神経細胞での *MALS-1* 蛋白発現パターンや MeCP2 蛋白による発現調節を明らかにする。具体的には *MALS-1* 蛋白はシナプス形成におけるシナプスの成熟期に関与することが予想されるので、

- (1) *MALS-1* と他のシナプス形成に関わる分子のシナプス形成期の発現変化
 - (2) MeCP2 蛋白欠乏状態下での *MALS-1*、他のシナプス関連分子の発現変化
- を明らかにする。

<実験方法>

①胎生 15 日齢マウスの大脳皮質より初代神経分散培養細胞 (以下神経細胞) を作製し、免疫染色法にて、*MALS-1* 蛋白とシナプス関連分子である

PSD-95, *VGLUT1*, *NR2A*, *NR2B*, *GLuR1* 等の発現分布を経時的に観察する。

②siRNA を導入し MeCP2 遺伝子をノックダウンした神経細胞、及び MeCP2 ノックアウトマウスより作製した神経細胞を用いて *MALS-1* 蛋白の発現、及びシナプス形成について免疫染色法やウェスタンブロッティング法で発現量を定量する。

4. 研究成果

- (1) *MALS-1* の発現パターンの解析・・・*MALS-1* はマウス大脳皮質において生後の発達と共

に発現量が増加する事が mRNA レベル、蛋白レベルで確認された。特にシナプスの発達が行なわれる生後 2 週齢以降に急激に発現量が増加する事が分かった。またその発現パターンはシナプス末端に発現している事が確認され他のシナプス関連蛋白である PSD-95 等と共存が示唆される結果となった。この事から *lin7a* はシナプス形成に重要な役割を持つ分子の一つで前シナプス、後シナプスの両方に存在する事が示唆された。

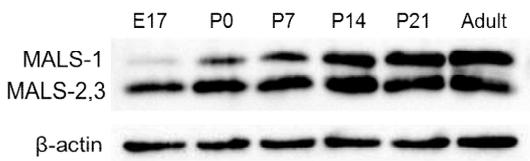


図 1 マウス大脳皮質における MALS-1 蛋白の発現変化

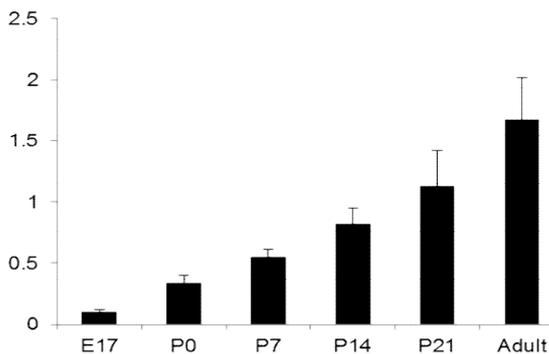


図 2 マウス大脳皮質における MALS-1 蛋白の相対発現量変化

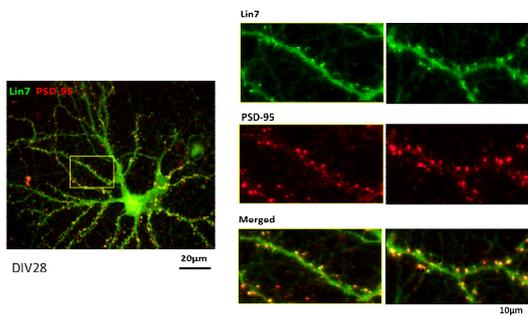


図 3 マウス大脳皮質培養神経細胞における MALS 蛋白の発現

(2) MeCP2 蛋白欠乏状態下での MALS-1 蛋白発現・・・MeCP2 ノックアウトマウスの大脳皮質の発現をウェスタンブロッティング法にて生後 60 日齢のマウスにおいては野生型と変異型の差は有意差を持った。MALS-1 は既存の遺伝子の報告とは違い MeCP2 の発現量低下に伴い標的遺伝子の発現が低下するという結果になった。

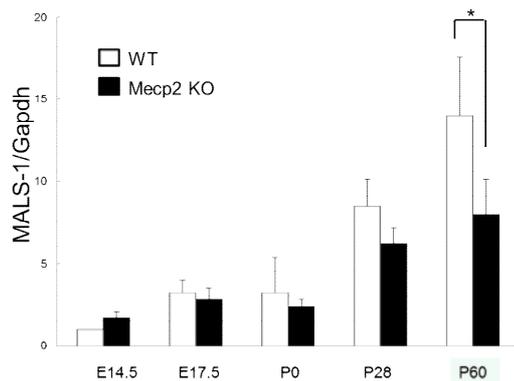


図 4 MeCP2 ノックアウトマウス大脳皮質における MALS-1 蛋白の発現変化

(3) 神経芽細胞腫である Neuro2a 細胞に siRNA-MeCP2 を導入し、*MALS-1* 遺伝子の発現を確認した所、大きな発現の変動は確認されなかった。しかし、導入時期を細胞分化前後で変化させると *MALS-1* 遺伝子の発現量が減少する実験結果が得られた。ノックアウトマウスとの結果と合わせて MALS-1 は MeCP2 によってこれまで報告されている遺伝子の様に発現を抑制するというより発現増加に関与している事が示唆された。また MeCP2 の発現調節時期が重要であると考えられた。

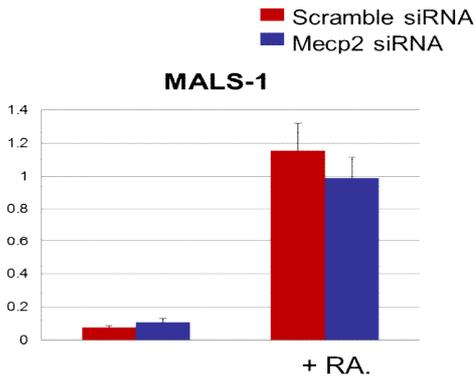


図5 Neuro2a 細胞における siRNA-Mecp2 による MALS-1 遺伝子の発現量の変化

(4) その他の標的分子の探索・・・MALS-1 以外のシナプス形成関連分子の探索を行ない新たな標的遺伝子としてカドヘリン関連蛋白質の一つである PCDH7 及び PCDHB1 を候補分子として同定した。

MeCP2-KO マウス及びレット患者の遺伝子の発現量を解析した。その結果、KO マウス脳では 2 遺伝子の発現量、蛋白量の有意な増加、またレット患者の脳では PCDHB1 の有意な増加が認められた。また siRNA 導入による発現量変化についても 2 遺伝子の発現量の増加が認められた。この結果から PCDH7, PCDHB1 の遺伝子は MeCP2 のメチル化制御を受けている事が示唆された。

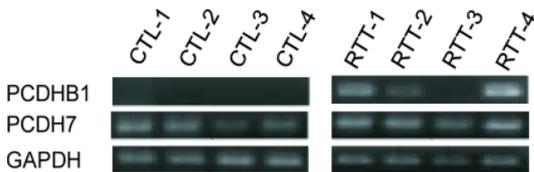


図6 ヒトレット患者におけるプロトカドヘリン遺伝子の発現量

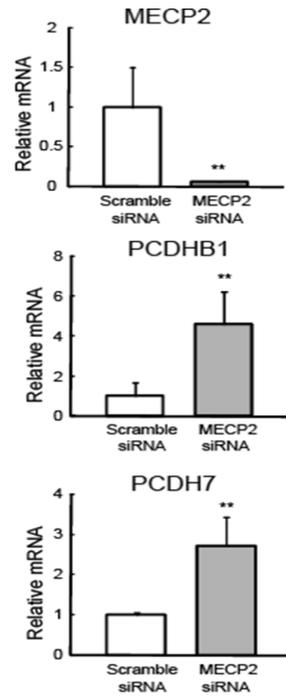
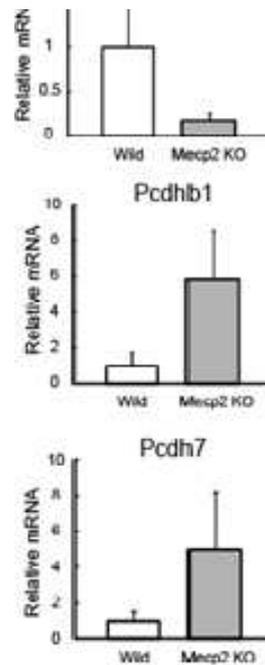


図7 siRNA-MeCP2 によるプロトカドヘリン遺伝子群の発現変化



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①Uchino S#, Hirasawa T#, Tabata H#, Gonda

Y, Waga C, Ondo Y, Nakajima K, Kohsaka S.
(# Equal contribution): Inhibition of
NMDA receptor activity resulted in
aberrant neuronal migration caused by
delayed morphological development in the
mouse neocortex. *Neuroscience* (査読あり)
169(2):609-618, 2010

②Kubota T, Miyake K, Hirasawa T, Nagai K,
Koide T.: Novel etiological and
therapeutic strategies for neurodiseases:
epigenetic understanding of
gene-environment interactions.

J Pharmacol Sci (査読なし) 113:3-8, 2010

③Wati H, Kawarabayashi T, Matsubara E,
Kasai A, Hirasawa T, Kubota T, Hagiwar
a Y, Shogi M, Maeda S. Transthyretin A
accelerates Vascular Abeta Deposition in
a Mouse Model of Alzheimer's disease.
Brain Pathol 19(1)48-57, 2009

[学会発表] (計5件)

(1)Endo A, Hirasawa T, Miyake K, Kubota T.
Corticosterone facilitates the glutamate
receptor-dependent synchronized calcium
oscillation in hippocampal neurons. 第33
回日本神経科学学会 9.3 2010 神戸

(2)平澤孝枝、遠藤彰、三宅邦夫、久保田健
夫 ストレスによって惹起される脳内の遺
伝学的・非遺伝学的発現変化 第82回日本
遺伝学会 9.20 2010 北海道

(3)三宅邦夫・平澤孝枝・五月女雅樹・遠藤
和志・久保田健夫・平敬宏・横井左奈・井
本逸勢・稲澤譲治 レット症候群責任蛋白質
MeCP2の新規標的遺伝子の探索
日本分子生物学会 12.8 2010 神戸

(4)久保田健夫、平澤孝枝 精神発達障害疾
患とエピジェネティクス 第52回日本神経
化学学会 6.22 2009 群馬

(5)平澤孝枝 三宅邦夫、久保田健夫 レッ

ト症候群責任蛋白質 MeCP2 の標的分子の神経
機能第4回メチレーションと小児神経学研
究会 8.23 2009 東京

[図書] (計1件)

(1)Miyake K, Hirasawa T, Koide T, *Kubota T.
Epigenetics in autism and other
neurodevelopmental diseases. *Molecular
Mechanism of Neurodegenerative diseases*
(Ahmad S. 編)、Landes
Bioscience/Springer(印刷中).

[その他]

ホームページ等

<http://www.epigenetmed.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

平澤 孝枝 (HIRASAWA TAKAE)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助
教
研究者番号: 10402083

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし