

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06272

研究課題名（和文）大脳皮質の構築が異常の原因となる自閉症発症の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of autism caused by abnormalities in the cerebral cortex

研究代表者

梅村 真理子（Umemura, Mariko）

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：30521489

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）：自閉症スペクトラム障害は社会性行動に障害を持つ発達障害の一つである。その原因の一つに、大脳皮質の層構造に異常があることが報告されている。本研究では、社会性行動の低下を示した ATF5欠損マウスを用いて、大脳皮質の構造の解析を行った。ATF5欠損マウスでは、胎仔期の大脳皮質の放射状グリアや中間前駆細胞の密度が減少していた。またATF5の発現を抑制した神経細胞では、細胞の形態が異常になり、神経細胞の移動が異常になっていた。このことから、大脳皮質の正常な発達にATF5が重要であることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、転写因子ATF5が大脳皮質の発達に重要であることを明らかにした。ATF5は神経細胞の形態の形成に重要であり、大脳皮質の発達に影響を与える。

また、自閉症スペクトラム障害は社会性行動に障害を持つが、根本的な治療薬は存在していないことが問題となっている。本研究で明らかになった知見により、大脳皮質の層構造形成の分子機構の理解が進むと期待される。また、大脳皮質の層構造が異常が原因となっている自閉症の治療研究にも貢献すると予想される。

研究成果の概要（英文）：Autism spectrum disorder is a developmental disorder that impairs social behavior. One of the causes of autism spectrum disorder is thought to be the abnormal layered structure of the cerebral cortex. In this study, we analyzed the structure of the cerebral cortex in ATF5-deficient mice, which showed impaired social behavior. ATF5-deficient mice had a reduced density of radial glia and intermediate progenitor cells in the cerebral cortex during embryonic stage. In addition, neurons transfected with an ATF5-shRNA expression plasmid showed abnormal cell morphology and abnormal neuronal migration. These results suggest that ATF5 is important for the development of the cerebral cortex.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 転写因子 神経細胞 胃道 マウス 行動異常

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (**ASD**) は、社会性行動に障害をもつ神経発達障害の一つである。自閉症スペクトラム障害 (**ASD**) の患者が約 **100** 人に **1** 人存在すると報告されているが、社会性行動の障害を改善する根本的な治療薬が存在しないことが問題となっている。社会性行動は、大脳皮質で制御されることが報告されている。

大脳皮質は、大脳の表層側に広がる領域で 6 層構造を形成している。大脳皮質は、脳発達期に、脳室に面した脳室帯や脳室下帯で神経前駆細胞が分裂し、分化しながら移動し、層に配置される。自閉症患者の死後脳や、自閉症様異常行動を示すマウスの解析から、大脳皮質の層構造が乱れていることが報告された。以上のことから、正常な大脳皮質層構造の構築の分子機構を明らかにすることが重要だと考えられた。

私たちは、転写因子 **ATF5** が正常な脳の発達に重要であることを明らかにした。また、**ATF5** を欠損させたマウスでは、社会性行動の低下が見られた。予備的な実験により、**ATF5** 欠損マウスでは、大脳皮質の層構造が乱れていた。このことから、**ATF5** 欠損マウスは、大脳皮質の層構造が異常であり、社会性行動が低下して自閉症様行動異常を示しているものと予想された。しかし、**ATF5** の大脳皮質での機能についてはほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、自閉症様行動の原因として考えられている大脳皮質の層構造の異常を生み出す分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、新規な自閉症様の行動異常を示すマウスであり、大脳皮質の層構造が異常になっている **ATF5** 欠損マウスを用いて、大脳皮質の形成の異常になる機構を明らかにする。これにより、自閉症様行動異常を生み出す大脳皮質の異常の分子機構が明らかになり、自閉症の治療法の開発研究へつなげることができると期待される。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質の組織解析

大脳皮質の発達期である胎仔期マウスの脳を摘出して固定し、凍結切片を作成した。放射状グリア (**Pax6**)、中間前駆細胞 (**Tbr2**)、成熟神経細胞 (**Cux1, Ctip2**)、アポトーシス (切断型カスパーゼ **3**) の各種マーカーを用いて免疫染色を行った。共焦点顕微鏡やボックス型蛍光顕微鏡を用いて、大脳皮質の層構造の解析を行った。

(2) 大脳皮質の神経細胞移動の解析

子宮内エレクトロポレーション法にて胎仔期 **14** 日齢のマウスの脳室帯の神経細胞へ **GFP** 発現ベクターと **ATF5-shRNA** 発現ベクター (もしくはそのコントロールベクター) を導入した。その後、脳を取得し、スライスカルチャーを行った。神経細胞移動は、共焦点顕微鏡にて観察し解析した。

(3) 大脳皮質における mRNA の発現解析

胎仔期の大脳皮質を取得し、RNA を抽出した。この RNA を用いて RNA シークエンス解析を行った。また、Total RNA から cDNA を合成し、real time PCR を用いて mRNA の発現量を解析した。タンパク質の発現量は、ウエスタンブロッティングにより解析した。

(4) 初代神経細胞の取得と樹状突起スパインの解析

胎仔期マウスの大脳皮質もしくは海馬を取得し、トリプシンで分散させて、初代培養細胞を取得した。その後、Lipofectamine LTX Reagent を用いてプラスミドを導入した。導入したプラスミドは、ATF5 の発現を抑制する ATF5-shRNA 発現ベクター (ATF5-sh) もしくはそのコントロールベクターと GFP 発現ベクターである。播種してから 14 ~ 21 日目において、樹状突起マーカーである MAP2 と GFP に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その後、共焦点顕微鏡を用いて、樹状突起の形態や樹状突起スパインの構造を解析した。

4. 研究成果

(1) ATF5 欠損マウスの大脳皮質の解析

大脳皮質は胎仔期に、脳室に面した部位である脳室帯・脳室下帯において、神経前駆細胞である放射状グリアが分裂し、中間前駆細胞を経て、成熟神経細胞へ分化し、移動し、配置される。放射状グリアと中間前駆細胞の密度が ATF5 欠損マウスにおいて減少していた。この減少の原因として、アポトーシスによる細胞死があると予想した。そこで、切断型カスパーゼ 3 陽性のアポトーシスを起こしている細胞を検出したところ、ATF5 欠損マウスでは野生型と比べて変化はみられなかった。

(2) ATF5 の発現を抑制した神経細胞の移動

ATF5 欠損マウスの大脳皮質の層構造が異常になる原因として、神経細胞の移動に異常があることが予想された。子宮内エレクトロポレーション法により ATF5 をノックダウンする ATF5-shRNA 発現ベクターと GFP 発現ベクターを導入して、神経細胞の移動を解析した。ATF5 の発現を抑制した神経細胞では、移動が異常になっていることが見出された。

(3) 大脳皮質における ATF5 のターゲット因子の同定

胎仔期の ATF5 の標的因子を同定し、ATF5 が関与する大脳皮質の発達の分子機構を明らかにすることを試みた。胎仔期の ATF5 の大脳皮質から Total RNA を抽出し、RNA シークエンス解析を行った。野生型マウスと比べたところ、ATF5 欠損マウスにおいて発現が増減している因子として、約 150 程度の因子が同定された。特に、ストレス応答、組織の形成や発達、エピジェネティック遺伝子発現制御に関与する因子が含まれていた。

この中で、リボヌクレアーゼファミリーに属する因子に注目した。この因子の mRNA とタンパク質の発現量を解析したところ、胎仔期の ATF5 欠損マウスにおいて減少していることが明らかになった。この因子は、RNA の切断に関与するだけでなく、エピジェネティック遺伝子発現制御に関与することが報告されている。これらのことから、ATF5 は大脳皮質においてエピジェネティックな遺伝子発現制御に関する因子の発現量を制御して、大脳皮質の発達に影響を及ぼしていることが予想された。

(4) ATF5 の発現を抑制した神経細胞の形態の解析

自閉症様行動異常を示すマウスにおいて、シナプスの形成や機能の異常が報告されている。シナプスは神経細胞同士が連絡する接合部である。樹状突起スパインは、樹状突起上に形成される棘状の構造であり、シナプスを形成する。成熟したスパインは様々な形態をとる。初代神経細胞において、ATF5 の発現を抑制する ATF5-sh を導入したところ、樹状突起スパインの形態の分布が変化していた。また、ATF5 を高発現させたところ、多くの神経細胞が死滅していることが示された。

以上のことから、ATF5 欠損マウスの大脳皮質では、神経前駆細胞の放射状グリアと中間前駆細胞の密度が減少することにより、胎仔期の大脳皮質の形成が異常になっていることが見出された。また、ATF5 の発現を抑制した神経細胞では、形態が異常になることが見出された。このことが原因となり、神経細胞移動が異常になったと予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Umemura Mariko, Kaneko Yasuyuki, Tanabe Ryoko, Takahashi Yuji	4. 巻 11
2. 論文標題 ATF5 deficiency causes abnormal cortical development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-86442-5	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 -
1. 著者名 Nakano Haruo, Kawai Shiori, Ooki Yusaku, Chiba Tomoki, Ishii Chiharu, Nozawa Takumi, Utsuki Hisako, Umemura Mariko, Takahashi Shigeru, Takahashi Yuji	4. 巻 385
2. 論文標題 Functional validation of epitope-tagged ATF5 knock-in mice generated by improved genome editing of oviductal nucleic acid delivery (i-GONAD)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 239 ~ 249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-021-03450-7	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 Nakano Haruo, Hata Ayano, Ishimura Usato, Kosugi Ryo, Miyamoto Eina, Nakamura Kota, Muramatsu Takumi, Ogasawara Moe, Yamada Motohiro, Umemura Mariko, Takahashi Shigeru, Takahashi Yuji	4. 巻 393
2. 論文標題 Activating transcription factor 5 (ATF5) controls intestinal tuft and goblet cell expansion upon succinate-induced type 2 immune responses in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 343 ~ 355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-023-03781-7	査読の有無 無
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 Ishii Chiharu, Nakano Haruo, Higashiseto Riko, Ooki Yusaku, Umemura Mariko, Takahashi Shigeru, Takahashi Yuji	4. 巻 396
2. 論文標題 Nescient helix-loop-helix 1 (Nhlh1) is a novel activating transcription factor 5 (ATF5) target gene in olfactory and vomeronasal sensory neurons in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 85 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-024-03871-0	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林永和, 梅村真理子, 金子泰之, 中野春男, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 転写因子ATF5は脳皮質発達に關与する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 星野考郁, 梅村真理子, 本郷琳太郎, 島原喜子, 中野春男, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 脳皮質発達期の神経細胞の移動と中心体機能における転写因子ATF5の役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井千陽, 中野春男, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 転写因子ATF5-Hemagglutininタグノックインマウスを用いた嗅覚器におけるATF5の機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野春男, 畑綾乃, 石村宇里, 小杉遼, 村松拓実, 小笠原萌, 宮本英奈, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 2型免疫応答によって誘導された腸刷子細胞と杯細胞の分化に及ぼすATF5欠損の影響
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島理子, 梅村真理子, 喜屋武諒, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 ATF5はマウス大脳皮質におけるインターニューロンの維持に関与している
3. 学会等名 NEURO2022 (第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井千陽, 中野春男, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二
2. 発表標題 マウス嗅覚器における転写因子ATF5の新規標的遺伝子の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 蛭川遼大, 梅村真理子, 小林永和, 中野春男, 高橋滋, 高橋勇二, 新開泰弘
2. 発表標題 大脳皮質発達過程におけるストレス応答転写因子ATF5の機能解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小出真時, 竹内茉由, 中野春男, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二, 新開泰弘
2. 発表標題 ストレス応答因子ATF5 mRNAにおける上流ORFが関与する翻訳制御と生理機能の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村航汰, 中野春男, 小杉遼, 石村宇里, 宮本英奈, 畑綾乃, 梅村真理子, 高橋滋, 高橋勇二, 新開泰弘
2. 発表標題 ストレス応答因子ATF5欠損マウス小腸の2型免疫応答で生じたパネート細胞の分化異常
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------