

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15895

研究課題名(和文) 知的障害責任分子Rac3の脳発達における生理機能と分子病態機構の解明

研究課題名(英文) Physiological functions and pathogenic mechanisms of Rac3, an intellectual disability-associated G protein, in cerebral development

研究代表者

西川 将司 (Nishikawa, Masashi)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：00871758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経発達障害に関与する12種のヒトRAC3変異体を解析した。生化学的解析により、当変異体群は活性型であることがわかった。in vivo解析では、マウス子宮内胎児脳電気穿孔法により各種変異体を発現させた神経細胞が、皮質形成時に移動障害を引き起こすことを明らかにした。さらに、RAC3エフェクターの一つであるPAK1シグナルを遮断することにより異常表現型の一部回復が観られた。このことから、RAC3-PAK1シグナルの制御破綻が、RAC3遺伝子異常による神経発達障害の発症機序の一つであることを明らかにした。本研究結果は、RAC3異常症の病態メカニズムを理解する上で重要な知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1)RAC3異常症が、大脳皮質形成時の神経細胞移動障害を背景とする病態であること、2)病因シグナルの一つとしてRAC3-PAK1を特定したこと、3)PAK1抑制は、RAC3変異体による異常表現型を回復できる可能性を示したこと、が本研究の成果である。すなわちRAC3関連神経疾患において、PAK1は創薬ターゲットであり、PAK1阻害剤は創薬シーズになる可能性を示すことができた。本研究結果はRAC3異常による知的障害発症機序を正確に理解する上で重要な知見であると共に、創薬シーズを発見できたことは大きな臨床的意義がある。

研究成果の概要(英文)：RAC3 variants are associated with neurodevelopmental disorders (NDD) and brain anomalies. To elucidate the pathophysiological mechanisms of RAC3-related NDD, we examined the effects of pathogenic variants on the development of mouse cerebral cortex. In vitro analysis revealed that all tested RAC3 variants were active, with varying affinities for downstream effectors. We then focused on the 4 variants affecting the Switch II region, common to other Rho family GTPases. Each RAC3 variant expressed using in utero electroporation caused defects in cortical neuron morphology and migration. Dominant negative PAK1 rescued the defects, suggesting that impaired RAC3-PAK1 signaling is a pathophysiological mechanism underlying RAC3-related NDD. Our results indicate that the RAC3 variants result in morphological and functional defects in cortical neurons during brain development, eventually leading to the clinical features of the NDD.

研究分野：神経化学、小児神経

キーワード：知的障害 神経発達 子宮内胎児脳電気穿孔法 Gタンパク質 Rhoファミリー Rac3 PAK1 アクチン 細胞骨格

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

2019年に皮質形成異常症を伴う知的障害（ID）患者から、ヒト RAC3 ミスセンス変異（p.P29L, p.P34R, p.A59G, p.Q61L, p.E62K）が同定された。したがって、RAC3 は神経発達（神経細胞の移動・分化）に必須の役割を果たすことが確実視される。RAC3 は、アクチン骨格・細胞形態制御を司る Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質のうちで脳に高発現するサブタイプとして知られているが、当分子の異常が中枢神経発達・皮質形成に与える影響、および ID 発症の分子病態機構は全くわかっていなかった。そこで本研究では、*in vitro* 解析による変異体性状の解明 / *in vivo* マウス神経発達モデルを用いた変異体の神経発達障害メカニズム解明を目的として本研究を企画した。

2. 研究の目的

過去に報告されたヒト RAC3 ミスセンス変異（p.P29L, p.P34R, p.A59G, p.Q61L, p.E62K）に加えて、我々の臨床研究グループが ID 患者から同定した新規ミスセンス変異体群（p.G12R, p.F28S, p.G60D, p.E62del, p.D63N, p.Y64C, p.K116N）も解析対象とし、計 12 種類の RAC3 変異体の病態解析を実施した。変異体の分子性状（機能喪失型、構成的活性化型・不活性化型）を決定し、RAC3 異常による神経発達障害機序（細胞移動・分化の破綻？）を解析することで、病態メカニズムの核心に迫る。

3. 研究の方法

RAC3 変異体の性状解析 (*in vitro*) : RAC3 は主に、GDP 結合型（不活性化型）と GTP 結合型（活性化型）2 状態からなる。各種変異体の GDP 型→GTP 型への反応と、GTP 型→GDP 型への反応を両方比較することで、G 蛋白質活性評価（機能喪失型、構成的活性化型・不活性化型）を実施した。また、RAC3 エフェクター（PAK1、MLK2…）との結合実験も行った。さらに初代培養海馬神経細胞に各種変異体を発現させることで、神経細胞形態・分化への影響を評価した。

神経発達障害の病態解析 (*in vivo*) : 子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いてヒト RAC1 病因変異体をマウス神経細胞に発現させ、病態モデルマウスを作成した。脳スライス固定標本、および脳スライス培養法で、RAC3 変異体が神経細胞発達（移動、分化）に与える影響を観察した。

4. 研究成果

RAC3 変異体（p.G12R, p.F28S, p.P29L, p.P34R, p.A59G, p.G60D, p.Q61L, p.E62K, p.E62del, p.D63N, p.Y64C, p.K116N）の活性を生化学的に評価した結果、12 種類はすべて活性化型であることがわかった。また、初代培養マウス海馬神経細胞に RAC3 野生型、各種変異体を発現させ、神経細胞形態に与える影響を観察した結果、変異体を発現した神経細胞では、顕著な葉状仮足形成（RAC シグナル↑）と軸索様神経突起の伸長阻害が観察された。これらの結果から、知的障害に関与する RAC3 変異は活性化型変異であり、RAC3 シグナルを過剰に活性化することでアクチン細胞骨格制御機構を破綻させることが示唆された。次に細胞内シグナル解析を実施して、RAC3 変異体がどの下流エフェクターを活性化しているかを評価した。アクチン細胞骨格制御系エフェクターとして知られている PAK1, MLK2, IRSp53, N-WASP, ROCK, RTKN と RAC3 変異体との結合

アッセイを実施したところ、それぞれの変異体は活性型であるにも関わらず、種々の標的蛋白質との結合プロファイルは変異体ごとに異なっていることがわかった。この結果は、各種変異体が、それぞれ異なる細胞内シグナルを活性化している可能性を示唆していた。

マウス *in vivo* 解析では、酵素活性・エフェクター結合に重要で G 蛋白質間で保存された Switch II 領域内の変異 (p.Q61L, p.E62del, p.D63N, p.Y64C) で実施した。各種変異体を胎生期 14 日 (E14) の神経幹細胞に導入して ID 患者の病態を模倣したモデルマウスを作成し、脳スライス培養ライブイメージングにより、大脳皮質神経細胞の移動・運動様式への影響を評価した。その結果、変異体を発現した神経細胞は、脳室下帯/中間帯→皮質板への移動できず、細胞極性が消失した状態で中間帯付近に凝集してしまうことがわかった。0 日齢 (P0) 脳スライス標本での観察でも変異体を発現した神経細胞では移動障害が起こり、皮質層構造を形成することができないことを確認した。また、脳梁軸索の伸長障害が起こっていることも P0/P7 脳スライス標本で観察した。したがって、RAC3 変異による RAC3 シグナルの過剰活性化は、神経細胞の形態制御を破綻させることで、移動障害・分化障害 (軸索伸長障害) を引き起こすことがわかり、患者でみられる皮質形成異常症の原因の一つであると考えられた。一方、移動障害が起こり凝集した神経細胞では PAK1 の過剰活性化がみられたので、PAK1 シグナルを遮断すれば異常表現型を回復できるのではないかと考えた。そこで、PAK1 の dominant-negative 変異体を RAC3 変異体が発現した神経細胞に共発現させた結果、RAC3 変異体 (p.E62del, p.D63N, p.Y64C) による神経細胞移動障害・軸索形成不全を回復させることに成功した。しかしながら、RAC3 変異体 (p.Q61L) には影響を与えなかった。以上の結果から、RAC3 →PAK1 シグナルの制御破綻が、RAC3 遺伝子異常による神経発達障害の発症機序の一つであることを明らかにした (図)。本研究結果は、RAC3 異常症の病態メカニズムを理解する上で重要な知見となる。

本研究内容は、Variant-specific changes in RAC3 function disrupt corticogenesis in neurodevelopmental phenotypes, *Brain* 145(9) 3308-3327 (2022)、Gain-of-function p.F28S variant in RAC3 disrupts neuronal differentiation, migration and axonogenesis during cortical development, leading to neurodevelopmental disorder. *Journal of medical genetics* 60(3) 223-232 (2023) で発表した。

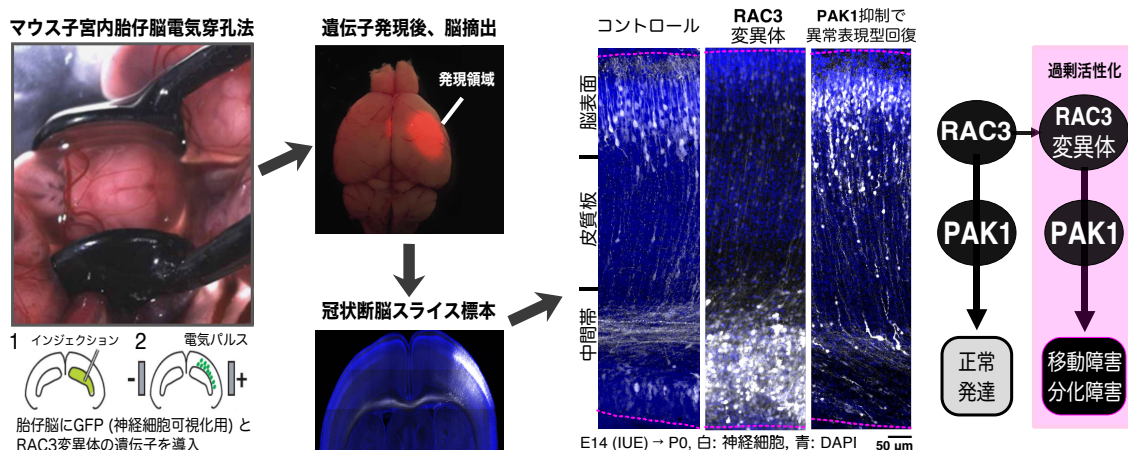


図. 知的障害責任分子 RAC3 の神経発達障害メカニズムの解明

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 2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 Scala Marcello, Nishikawa Masashi, Nagata Koh-ichi, Striano Pasquale	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathophysiological Mechanisms in Neurodevelopmental Disorders Caused by Rac GTPases Dysregulation: What 's behind Neuro-RACopathies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3395 ~ 3395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123395	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 Nishikawa Masashi, Scala Marcello, Umair Muhammad, Ito Hidenori, Waqas Ahmed, Striano Pasquale, Zara Federico, Costain Gregory, Capra Valeria, Nagata Koh-ichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Gain-of-function p.F28S variant in <i>RAC3</i> disrupts neuronal differentiation, migration and axonogenesis during cortical development, leading to neurodevelopmental disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Medical Genetics	6. 最初と最後の頁 223 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jmedgenet-2022-108483	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川将司
2. 発表標題 知的障害責任分子RAC3の脳発達における生理機能と分子病態機構の解明
3. 学会等名 名古屋大学脳とこころの研究センター 第6回 拡大ワークショップ（招待講演）
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 Pathophysiological significance of RAC3 variants in neurodevelopmental disorders
3. 学会等名 第64回 日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川将司, 伊東秀記, 野田万理子, 浜田奈々子, 田畑秀典, 永田浩
2. 発表標題 発達障害責任遺伝子Rac3の神経組織における発現解析
3. 学会等名 第53回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永田浩一, 西川将司
2. 発表標題 知的障害責任分子RAC3の脳発達における生理機能と分子病態機構の解明
3. 学会等名 第53回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
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 知的障害責任分子RAC3の脳発達における生理機能と分子病態機構の解明
3. 学会等名 第43回神経組織培養研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川将司
2. 発表標題 知的障害責任分子群RACファミリーの脳発達における生理機能と分子病態機構の解明
3. 学会等名 第20回 東海小児遺伝カンファレンス 2022年2月19日
4. 発表年 2022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 知的障害責任分子RAC3による神経発達障害の病態メカニズム
3. 学会等名 第86回日本生化学会中部支部例会
4. 発表年 2022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 Variant-specific changes in RAC3 function disrupt corticogenesis in neurodevelopmental phenotypes
3. 学会等名 第 4 回 CIBoG リトリート(第 15 回 NAGOYA グローバルリトリート)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永田浩一, 西川将司, 伊東秀記, 田畑秀典
2. 発表標題 低分子量G蛋白質RAC3の病的バリエーションによる発達障害の病態形成機構
3. 学会等名 第65回日本小児神経学会学術集会
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
---------	---------