

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390271

研究課題名(和文) 大脳皮質発達障害を基盤とする知的障害・自閉性障害の病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Comprehensive analyses of causative genes for intellectual disability and autism-spectrum disorders

研究代表者

永田 浩一 (Nagata, Koh-ichi)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・部長

研究者番号：50252143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において“発達障害の病因・病態分子解析バッテリー”を駆使した包括的な解析を遂行した。具体的には、マウス子宮内胎仔脳遺伝子導入法を用いて研究対象遺伝子の発現を抑制・促進し、大脳皮質発生期の神経細胞移動、軸索伸長、樹状突起網形成、細胞周期、海馬歯状回顆粒細胞の形態形成を観察すると共に、初代培養海馬神経細胞を用いたシナプス形態、生化学・分子細胞生物学的解析を加えた。上記の解析バッテリーを主軸に共同研究を効果的に運用し、知的障害・自閉性疾患の病態関連分子に関する具体的な研究成果を挙げることで臨床との連携を推進した。

研究成果の概要(英文)：While many different biological causes have been implicated in the etiologies of neurodevelopmental disorders such as autism-spectrum disorder (ASD) and intellectual disability (ID), genetic factors are considered to be the most important. Thus, it is essential to clarify the pathophysiological significance of respective disease-related genes in brain development. To address this issue, we have established a battery of in utero electroporation-based ex vivo and in vitro observations including cortical neuron migration, axon elongation, dendrite development, spine morphogenesis and live-imaging as well as cell biological and biochemical analyses.

研究分野：小児神経科学

キーワード：自閉性障害 知的障害 大脳皮質構築 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

脳の発達障害には、1) 脳形成は正常に行われるが、シナプスあるいは神経細胞内のシグナル伝達異常が背景にあるもの、2) 発生過程における脳形成(シナプス・神経回路網などの微細構造形成を含む)そのものの異常が原因となるもの、があり、知的障害(ID)や自閉性障害(ASD)の病態形成の背景となっている。これまでに ID や ASD の病因・病態関連遺伝子は多数同定されているものの、遺伝学的解析による同定にとどまるものが殆どであり、機能解明に至った分子は極めて少ない。一方、基礎研究により大脳の発達・形成に関与する分子も多数報告されており、これらの分子の異常が ID・ASD の背景になっている可能性も高い。ID・ASD の病因・病態関連遺伝子や大脳皮質発達・形成に関与する遺伝子がコードする蛋白質は、転写因子・細胞骨格制御分子・シグナル分子など極めて多彩である。したがって、胎児の脳形成と機能獲得には多彩な機能を持つ多数の蛋白質が関与し、それらの異常に基づく ID・ASD にも多様な病態メカニズムが存在すると考えられる。一方、ID の約 25% は病因不明であり、未知の病因遺伝子探索の必要性も相変わらず高い。

2. 研究の目的

本研究では、共焦点顕微鏡ライブイメージ解析・生化学・分子細胞生物学などの基礎医学的手法と臨床遺伝学的研究(遺伝子多型解析)を両輪としたアプローチを駆使して、大脳皮質形成・シナプス形成の異常を背景とする ID・ASD の病態メカニズムの実体解明を遂行する。期間内に、1) ID のモデルとしてマリネスコシェーグレン(MS)症候群に着目し、原因遺伝子 SIL1(コシャペロン)と新規原因遺伝子候補 HSPBP1、HSPA5 等のシャペロン分子群、2) 大脳発達に必須であると共に ID・ASD で遺伝子・蛋白質レベルの異常が示されている Septin ファミリー、に焦点を絞って解析する。そして、これらの分子群の遺伝子・蛋白質レベルでの異常が、大脳皮質・神経回路形成障害を引き起こす分子機構を解明する。さらに、3) ID・ASD 患者検体を用いて遺伝子多

型(変異・欠失・重複)を解析することで、上記の分子群と病態との関連性を明確化すると共に、新規病態関連分子の同定も目指す。

3. 研究の方法

本研究では、ID・ASD に共通する病態メカニズムとして「大脳皮質発達(形成)障害」に着目し、申請者が構築した共焦点顕微鏡ライブイメージング法や分子細胞生物学・生化学的手法を用いて多面的な分子病態解析を遂行する。ID に関しては MS 症候群をモデルとし、原因遺伝子 SIL1 や HSPBP1 などのシャペロンが病態形成に果たす役割を解析する。一方、ID・ASD の病態との関連性が高い Septin にも焦点を当て、上述の実験手法を用いて病態形成メカニズムを解析する。さらに臨床面からも強力なアプローチを行う。即ち、遺伝子多型解析を遂行し、シャペロンや Septin と「大脳皮質発達障害」との関連性を明確化すると共に、新規の病態関連分子の探索も行う。

4. 研究成果

本研究では、“発達障害の病因・病態分子解析バッテリー”を駆使した *in vivo* と *in vitro* の包括的な解析を遂行した。具体的には、マウス子宮内胎仔脳遺伝子導入法を用いて研究対象遺伝子の発現を抑制・促進し、大脳皮質発生期の神経細胞移動、軸索伸長、樹状突起網形成、細胞周期、海馬歯状回顆粒細胞の形態形成を *ex vivo* で観察すると共に、初代培養海馬神経細胞を用いたシナプス形態、生化学・分子細胞生物学的解析を加えた。神経細胞の局在・形態異常が観察された場合には、ライブイメージ観察で詳細に解析した。私共の強みは、この解析バッテリーを主軸に共同研究を効果的に運用し、ID・ASD の病態関連分子に関する具体的な研究成果を挙げることで臨床との連携を推進した。

SIL1 が関与するヒト遺伝子変異疾患 MS 症候群においても てんかんや精神遅滞が存在することから、子宮内胎仔脳遺伝子導入による遺伝子発現のノックダウンとそのレスキュー実験を行い、シャペロンならびにコシャペロンが大脳皮質形成過程の細胞移動において重要な役割を果たしている可能性を報告した。さらに SIL1 遺伝子と

HSPA5 遺伝子 (シャペロン) の発現の組合せについても検討し、蛋白質折りたたみ過程に果たす各々の役割についても明らかにした。これまでシャペロンあるいはコシャペロンが、大脳皮質形成過程でどのように関与するかという報告は少なく、これらの研究は脳神経発達障害における新たな視点を提起できると考えている。

RBFOX1 は、スプライス制御因子であり、神経組織の分化、発達において必須の役割を担う。実際、RBFOX1 遺伝子の欠失や重複が、ID・ASD、てんかん等の発達障害の原因となる。しかし RBFOX1 の機能不全が発達障害の病態を形成するメカニズムについては不明である。そこで、発達期の大脳皮質形成過程における RBFOX1 の機能を解析した。子宮内胎仔脳遺伝子導入法により RBFOX1 を発現抑制した脳切片のライブイメージングを行い、幹細胞から分裂した新生ニューロンが中間帯から皮質板へと移動し、皮質内を脳表面へと移動する様子を観察した。その結果、RBFOX1 の機能が阻害された大脳皮質神経細胞では、1) 中間帯から皮質板へ移行できない、2) 皮質板へ移行できた場合でも移動速度が遅れる、という表現型が観察された。時空間的な移動様式の解析から、細胞の移動機構の1つである中心体による核の引き上げの障害が推測された。実際、移動中の神経細胞の核と中心体の距離を測定したところ、RBFOX1 の発現抑制でこの距離が異常に長くなっていた。また RBFOX1 を発現抑制した大脳皮質神経細胞では、発達期において樹状突起の分岐が減少し、対側に伸びる軸索の伸長も抑制された。これらの実験結果は、ID・ASD の病態形成における RBFOX1 の意義を示すものである。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計17件)

研究代表者 永田浩一

すべて査読あり。*コレスポンディングオーサー

1. 浜田奈々子, 稲熊裕, ***永田浩一**: 発達障害の背景としての大脳皮質構築異常 **生化学** 87(2): 205-208, 2015
2. Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H and ***Nagata K.**: Role of the cytoplasmic isoform of RBFOX1/A2BP1 in

establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *Mol Autism* 6:56, 2015.

3. Lee S-A, Kim S-M, Suh B K, Sun H-Y, Park Y-U, Hong J-H, Park C, Nguyen M D, Nagata K, Yoo J-Y and Park S K: *Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1)* regulates dysbindin function by enhancing its stability. *J Biol Chem* 290: 7087-7096, 2015.
4. Inaguma Y, Ito H, Hara A, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H and ***Nagata K.**: Morphological characterization of mammalian Timeless in the mouse brain development. *Neurosci Res* 92: 21-28, 2015.
5. Mizutani Y, Iwamoto I, Kanoh H, Seishima M and ***Nagata K.** Expression of Drebrin, an actin binding protein, in basal cell carcinoma, trichoblastoma and trichoepithelioma. *Histol Histopathol* 29, 757-766, 2014
6. Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T and ***Nagata K.** *SIL1*, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med* 6: 414-429, 2014.
7. Tanabe K, Yamazaki H, Inaguma Y, Asada A, Kimura T, Takahashi J, Taoka M, Ohshima T, Furuichi T, Isobe T, **Nagata K**, Shirao T and *Hisanaga S. Phosphorylation of Drebrin by cyclin-dependent kinase 5 and its role in neuronal migration. *PLOS ONE* 9(3): e92291, 2014.
8. Matsumoto A, Mizuno M, Hamada N, Nozaki Y, Jimbo F E, Momoi Y M, **Nagata K** and *Yamagata T. LIN7A depletion disrupts cerebral cortex development, contributing to intellectual disability in 12q21-deletion syndrome. *PLOS ONE* 9(3) e92695, 2014.
9. Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, Ohshima T, Nabeshima Y, Mizutani K, **Nagata K**, Nakajima K and *Kawauchi T. Cdk5 and its substrates, Dcx and p27kip1, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development* 141, 3540-3550, 2014.
10. Ito H, Morishita R, Iwamoto I and ***Nagata K.** Establishment of an in vivo electroporation

method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus* 24:1449-1457, 2014.

11. 山形崇倫, 松本歩, 永田浩一: 自閉性障害の多様な遺伝学的病態とシナプス関連病因遺伝子の解析. *脳と発達* 46, 125-130, 2014.
12. Mizutani Y, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Kanoh H, Seishima M and *Nagata K. Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells. *Biol Chem* 394: 281-90, 2013.
13. Yamauchi M, Sudo K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Murai T, Kajita K, Ishizuka T and *Nagata K. Localization of a multi-domain adaptor proteins, p140Cap and vinexin, in the pancreatic islet of a spontaneous diabetes mellitus model, Otsuka-Long-Evans-Tokushima Fatty rats. *Med Mol Morphol* 46: 41-8, 2013.
14. Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Mizuno M, Morishita R, Inaguma Y, Kawamoto S, Tabata H and *Nagata K. Biochemical and morphological characterization of A2BP1 in the neuronal tissue. *J Neurosci Res* 91:1303-11, 2013.
15. Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Mizuno M and *Nagata K. MAGI-1 acts as a scaffolding molecule for NGF receptor-mediated signaling pathway. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833: 2302-10, 2013.
16. *Tabata H, Hachiya T, Nagata K, Sakakibara Y and Nakajima K. Screening for candidate genes involved in the Production of mouse subventricular zone proliferative cells and an estimation of their changes in evolutionary pressure during primate evolution. *Front Neuroanat* 7:24, 2013.
17. Mizuno M, Sotoyama H, Namba H, Shibuya M, Eda T, Wang R, Okubo T, Nagata K, Iwakura Y and *Nawa H. ErbB inhibitors ameliorate behavioral impairments of an animal model for schizophrenia; Implication of their dopamine-modulatory actions. *Transl Psychiatry* 3:e252, 2013.

[学会発表](計3件)

招待講演のみ抜粋

1. Nagata K: Comprehensive approach to understand physiological role of SIL1, a gene causing intellectual

disability. 25th ISN meeting Symposium (Cairns, Australia) 2015

2. 浜田奈々子, 伊東秀記, 田畑秀典, 永田浩一: Rbfox1, an autism causal gene, plays an essential role in cortical development. 日本神経化学会大会(大宮)(シンポジウム) 2015
3. 永田浩一, 浜田奈々子, 松本歩, 山形崇倫: 自閉症スペクトラム障害の病態関連遺伝子の機能解析. 第56回日本小児神経学会学術集会(浜松)(シンポジウム) 2014
4. Nagata K, Mizutani Y, Ito H, Seishima M: Possible role of SEPT1 in cancer cell spreading. American Society of Cell Biology Meeting Workshop "Septins: Membrane Organization and Cytoskeletal Dynamics from Bud Necks to Dendritic Spines"(New Orleans) 2013
5. Mizutani Y, Ito H, Seishima M, Nagata K (Gifu Univ): Possible role of a septin, SEPT1, in spreading in squamous cell carcinoma DJM-1 cells. Septin2013 Conference (Hefei, China) 2013
6. 山形崇倫, 松本歩, 永田浩一: 自閉性障害の多様な遺伝学的病態とシナプス関連病因遺伝子の解析: 第55回日本小児神経学会学術集会(大分) 2013

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

Nagata K: Voices; A Tribute to Alan Hall: Remembrances from Hall Lab Members. *Dev Cell* 33: 491-493, 2015.

Nagata K: In Memoriam; Tribute to Alan Hall. *J Cell Biol* 209:475-479, 2015.

6. 研究組織

研究代表者

永田浩一 (Nagata Koh-ichi)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・部長

研究者番号: 50252143