

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461658

研究課題名(和文) 神経発達疾患関連分子による周産期における神経新生の制御機構の解析

研究課題名(英文) Functions of neurodevelopmental disorder-associated genes in the perinatal neurogenesis

研究代表者

森下 理香 (MORISHITA, RIKA)

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・研究助手

研究者番号：30393135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：私共は、新生仔マウスを用いて嗅球の神経新生における神経発達障害関連分子の機能解析を行っていた過程で、in vivoエレクトロポレーションによって、新生仔マウス海馬歯状回神経幹(前駆)細胞に、外来遺伝子を導入できることを見いだした。本研究では、エレクトロポレーションの条件(電圧や電極位置など)の最適化を行い、新規遺伝子導入法を確立した。この手法により自閉症関連分子CYFIP1の発現を抑制すると、新生仔期に産生された歯状回神経細胞の発達に異常が見られた。この結果から、私共が確立した新規遺伝子導入法は、歯状回神経細胞の発達機構を解析するために有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the course of study to clarify functions of neurodevelopmental disorder-associated genes in the neonatal neurogenesis of the olfactory bulb in mice brain, we found that the in vivo electroporation method is applicable to the analysis of neonatal development of dentate gyrus. We determined conditions of the electroporation such as the voltage and the position of the electrodes for the efficient gene transfer to neonatally born dentate granule neurons. Using this new method, we found that the knockdown of the autism-associated gene CYFIP1 caused the reduction of neonatally born dentate granule neurons. We consider that this method is a useful tool for the exploration of the mechanism of neonatal dentate gyrus development.

研究分野：神経化学

キーワード：発達障害 歯状回 エレクトロポレーション

1. 研究開始当初の背景

近年、自閉症などの知的障害のみならず、統合失調症などの精神疾患に関しても胎生期から新生児期の神経発達の異常が関与していると考えられている。これらの「神経発達障害疾患」の多くは、遺伝的関連性が指摘されており、国内外の研究グループによって患者家系の遺伝学的解析が精力的に行われてきた。その結果、知的障害の発症に関与する分子として、RhoGAP、PAK3、FMR1、OPHN-1、ARHGEF6、CYFIP1などが、また、統合失調症の発症に関与する分子として、dysbindin-1 (DTNBP1)、DISC1、NRG1、COMT、Kalirinなどが病因候補遺伝子として同定されている。しかしながら、これらの分子の解析は、そのほとんどが遺伝学的解析にとどまっており、分子機能の解明にまで至っているものは少なかった。

私共は、新生仔マウスを用いた電気穿孔法(エレクトロポレーション法)により、嗅球神経前駆細胞の発達における神経発達障害関連分子の機能解析を行っていた。その過程で、エレクトロポレーションによって、ある条件下で新生仔マウスの海馬歯状回神経幹(前駆)細胞への遺伝子導入が可能であることが分かってきた。個体レベルでの歯状回神経幹(前駆)細胞の発達の解析は、これまで遺伝子改変マウスや部位特異的なウイルスベクターの注入などが行われてきた。エレクトロポレーションによる遺伝子導入法は、これらの手法に比べて簡便でコストが安いなどの利点がある。この手法が確立できれば、個体レベルで歯状回神経細胞の発達における神経発達障害関連分子の機能解析を効率的に行うことができると考えられた。

2. 研究の目的

エレクトロポレーション法による新生仔マウス海馬歯状回神経細胞に対する遺伝子導入法は、これまで全く報告がなかった。そこで、本研究では、エレクトロポレーションを行う際の電圧条件や電極位置などを検討し、この新規遺伝子導入法の最適化を試みた。さらに、この手法を用いて、新生仔マウスの歯状回神経細胞の発達における神経発達障害関連分子の機能解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 新生仔マウス脳のエレクトロポレーション

生後0~1日目の新生仔マウスを低温処置により麻酔後、脳室内に、ガラスキャピラリーを用いて遺伝子溶液を注入した。その後、ピンセット型電極(5mm円形)でマイナス極側を背側にして、頭部を挟み電気パルス(電圧50~110V、パルス時間50msec、パルス間隔950msec)をかけた。新生仔マウスは、37°Cに加温して麻酔から回復させた後に母マウスへ返し、飼育を続けた。

(2) 組織切片の作製

4%パラホルムアルデヒド/PBSによりマウスを還流固定後、脳を取り出し、4°Cで一晩、同じ固定液に脳を浸した。PBSで脳を洗浄後、3%アガロースに包埋し、バイブレイティングミクロトームによって70µmあるいは100µmの切片を作製した。

(3) 免疫組織染色

組織切片を0.5% Triton X-100と0.1%ウシ血清アルブミンを含むPBSに浸し、室温で1時間振とうした。その後、0.05% Triton X-100と0.1%ウシ血清アルブミンを含むPBSで希釈した一次抗体を加えて、4°Cで一晩振とうした。PBSで3回洗浄後、0.05% Triton X-100、0.1%ウシ血清アルブミンおよび4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)を含むPBSで希釈した二次抗体を加えて、室温で1時間振とうした。PBSで3回洗浄後、切片を蛍光褪色防止剤で封入した。標本の観察は、蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

(4) 神経発達障害関連分子の機能解析

生後0日の新生仔マウスの脳室に、GFP発現ベクターとKalirinあるいはCYFIP1の発現を抑制するベクター(pSUPER-Kalirin、pSUPER-CYFIP1)を混合したDNA溶液を注入し、エレクトロポレーションを行った。その後21日間飼育を継続した。そして、(2)および(3)の手法により組織標本を作製し、顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) 最適な電圧条件の決定

GFP発現ベクターを新生仔マウス脳室内に注入し、最適な電圧条件を検討した。その結果、50VではGFPを発現した歯状回顆粒細胞は全く見られず、80Vおよび110VでGFP陽性細胞が多数観察された(図1)。80Vと110Vで比較すると、110VでGFP陽性細胞が多くなる傾向にあったが、両者に統計的な有意差は見られなかった。これらの実験の結果を考慮して、今後の実験は110Vで行うことにした。

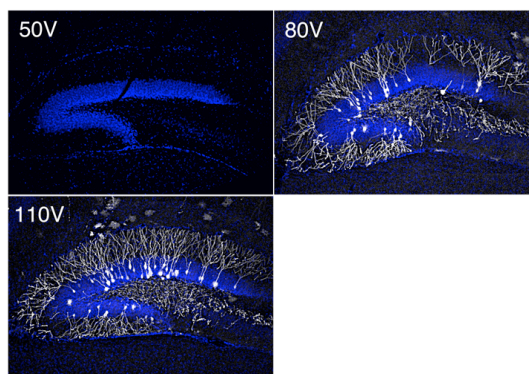


図1. 電圧による遺伝子導入効率の変化
白色: GFP, 青色: DAPI (核)

(2) 最適な電極位置の決定

まず、背腹軸に沿った電極位置の検討を行った。頭頂部から0°、45°、90°の位置に電

極を配置してエレクトロポレーションを行ったところ、0° と 45° では、同程度の数の GFP 陽性細胞が歯状回顆粒細胞層で見られた。一方、90° では、0° と 45° の場合と比較して、GFP 陽性細胞の数が有意に減少した。

次に、吻尾軸に沿った電極位置の検討を行った。マイナス電極をラムダから見て吻側へ 5mm および 10mm の場所へ電極を配置して比較を行ったところ、後者の場合に歯状回顆粒細胞層における GFP 陽性細胞の数が有意に多いことが分かった。

(3) GFP が導入された歯状回神経幹 (前駆) 細胞の発達

生後 0 日でエレクトロポレーションによって GFP を遺伝子導入した後に、歯状回神経幹 (前駆) 細胞の発達を経時的に観察した。その結果、エレクトロポレーション後 3 日目では、短い突起を出した細胞が、歯状回門から顆粒細胞層の領域で観察された (図 2)。そして、7 日から 10 日後になると、多くの細胞は顆粒細胞層内に配置され、樹状突起と見られる神経突起を伸ばし始めていた (図 2)。さらに、14 日から 21 日後にかけて、複雑に分岐した樹状突起の形成が見られた (図 2)。また、14 日後以降から樹状突起スパインの発達も見られ、28 日後には、肥厚した成熟スパインが観察された (図 3)。エレクトロポレーションを行った後、少なくとも 9 ヶ月後までは GFP を発現した細胞を確認することができた (図 3)。

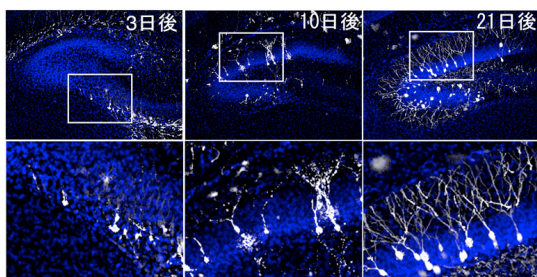


図 2. GFP を発現させた歯状回神経細胞の発達 (1)

上段の図中において、白四角で囲った部位を拡大した画像を下段に示した。白色 : GFP, 青色 : DAPI (核)

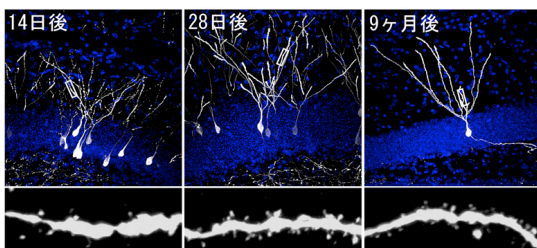


図 3. GFP を発現させた歯状回神経細胞の発達 (2)

上段の図中において、白四角で囲った部位を拡大した画像を下段に示した。白色 : GFP, 青色 : DAPI (核)

(4) 神経発達障害関連分子の機能解析

これまでの実験により確立できた新規手法を用いて、統合失調症との関連が指摘されている低分子量 G タンパク質活性化因子 Kalirin および自閉症との関連が知られている低分子量 G タンパク質のエフェクター分子である CYFIP1 の機能解析を行った。エレクトロポレーション後 21 日目に組織切片を作製し、歯状回顆粒細胞層における GFP 陽性細胞の配置を解析したところ、Kalirin をノックダウンした場合には顕著な変化は見られなかった。一方、CYFIP1 をノックダウンした場合には、歯状回顆粒細胞層における GFP 陽性細胞の数が減少する傾向が見られた。これらの結果から、私共が確立した新規遺伝子導入法は、歯状回神経細胞の発達機構の解析に有用であると考えられた。

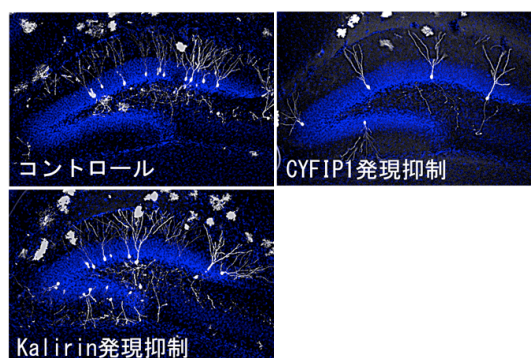


図 4. 歯状回神経細胞の発達における神経発達障害関連分子の機能。

生後 0 日のマウス歯状回神経幹 (前駆) 細胞に GFP 発現ベクターと CYFIP1 あるいは Kalirin 発現抑制ベクターを遺伝子導入後、21 日目に標本を作製した。白色 : GFP, 青色 : DAPI (核)

(5) 今後の展望

本研究では、個体レベルの新規遺伝子導入法を確立することができ、さらに、分子機能解析における有用性も示すことができた。前述のように、続々と神経発達障害関連分子が同定されてきているが、その分子機能や病態への関与については未解明な点が多い。今回確立した手法は、比較的簡便でコストも安いという利点があり、世界中の多くの研究グループで利用される可能性がある。私共の研究グループのみならず、広く利用されることで、神経発達障害の病態解明につながる研究の進展が期待される。

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 9 件)

- ① Ito H, Morishita R, Nagata K. (2016) Schizophrenia susceptibility gene product dysbindin-1 regulates the homeostasis of cyclin D1. *Biochim Biophys*

- Acta*. 1862:1383-91. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.04.016.
- ②Hamada N, Ito H, Nishijo T, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H, Momiyama T, Nagata K. (2016) Essential role of the nuclear isoform of *RBFOX1*, a candidate gene for autism spectrum disorders, in the brain development. *Sci Rep*. 6:30805. (査読有り)
DOI: 10.1038/srep30805.
- ③Ito H, Morishita R, Tabata H, Nagata K: Visualizing septin and cell dynamics in mammalian brain slices. *Methods Cell Biol*. "Septins" 136: 295-309, 2016. (査読無し)
DOI: 10.1016/bs.mcb.2016.03.016.
- ④Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H, Nagata K: Role of the cytoplasmic isoform of *RBFOX1/A2BP1* in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *Mol Autism* 6: 56, 2015. (査読有り)
DOI: 10.1186/s13229-015-0049-5.
- ⑤Ito H, Morishita R, Tabata H, Nagata K: Roles of Rho small GTPases in the tangentially migrating neurons. *Histol Histopathol* 29: 871-879, 2014. (査読無し)
DOI: 10.14670/HH-29.871.
- ⑥Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Nagata K: Establishment of an in vivo electroporation method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. *Hippocampus* 24: 1449-1457, 2014. (査読有り)
DOI: 10.1002/hipo.22325.
- ⑦Inaguma Y, Hamada N, Tabata H, Iwamoto I, Mizuno M, Nishimura YV, Ito H, Morishita R, Suzuki M, Ohno K, Kumagai T, Nagata K. (2014) *SIL1*, a causative cochaperone gene of Marinesco-Sjogren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. *EMBO Mol Med*. 6:414-429. (査読有り)
DOI: 10.1002/emmm.201303069.
- ⑧Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Mizuno M, Morishita R, Inaguma Y, Kawamoto S, Tabata H, Nagata K. (2013) Biochemical and morphological characterization of *A2BP1* in neuronal tissue. *J Neurosci Res*. 91:1303-1311. (査読有り)
DOI: 10.1002/jnr.23266.
- ⑨Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Mizuno M, Nagata K. (2013) *MAGI-1* acts as a scaffolding molecule for NGF receptor-mediated signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*. 1833:2302-2310. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.005.
- [学会発表] (計 19 件)
- ①伊東秀記, 森下理香, 永田浩一: 脳神経組織における *SEPT1* の性状解析. 日本臨床分子形態学会学術集会. 2016. 9. 24. (くまもと県民交流館, 熊本県熊本市)
- ②伊東秀記, 森下理香, 永田浩一: 新生仔期に産生された海馬歯状回神経幹 (前駆) 細胞の発達過程における低分子量 G タンパク質 Rac の機能. 日本神経化学会大会. 2016. 9. 8. (福岡国際会議場, 福岡県福岡市)
- ③Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H: Abnormal cortical neuron migration by perturbed nucleus-centrosome coupling underlies the pathophysiology of autism with abnormality in *RBFOX1/A2BP1* gene. ASCB Annual Meeting (サンディエゴ, 米国) 2015. 12. 14.
- ④伊東秀記, 森下理香, 永田浩一: 生後に産生された海馬歯状回神経幹 (前駆) 細胞の移動における低分子量 G タンパク質 Rac の機能. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 (BMB2015) (神戸国際会議場, 兵庫県神戸市) 2015. 12. 1.
- ⑤伊東秀記, 森下理香, 永田浩一: マウス海馬歯状回の生後発達における低分子量 G タンパク質 Rac の役割. 日本臨床分子形態学会学術集会 (長崎大学医学部, 長崎県長崎市) 2015. 9. 19.
- ⑥永田浩一, 森下理香, 岩本郁子, 伊東秀記: マウス海馬神経細胞におけるシナプス可視化とライブイメージ実験法の確立. 日本小児神経学会学術集会 (帝国ホテル大阪, 大阪府大阪市) 2015. 5. 29.
- ⑦Ito H, Morishita R, Iwamoto I, Nagata K: Establishment of an in vivo electroporation method into postnatal newborn neurons in the dentate gyrus. ASCB 2014 Annual Meeting (フィラデルフィア, 米国) 2014. 12. 7.
- ⑧Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H: Role of *A2BP1*, a candidate gene for ASD, in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. Neuroscience 2014 (ワシントン DC, 米国) 2014. 11. 18.
- ⑨永田浩一, 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子: 発達期におけるマウス海馬神経細胞のイメージング技術開発. 日本臨床分子形態学会学術集会 (TKP 市ヶ谷カンファレンスセンター, 東京都新宿区) 2014. 10. 17.
- ⑩伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: 生後発達期のマウス海馬歯状回における神経新生の分子機構. 日本生化学会大会 (国立京都国際会館, 京都府京都市) 2014. 10. 16.
- ⑪伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: エレクトロポレーション法による生後マウス海馬歯状回における神経新生の解析.

日本神経化学会大会（奈良県文化会館、奈良県奈良市）2014. 10. 1.

- ⑫ Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Tabata H: Possible role of A2BP1, an autism-related molecule, in developing cerebral cortex. FENS Forum 2014 (ミラノ、イタリア) 2014. 7. 8.
- ⑬ Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Mizuno M, Morishita R, Inaguma Y, Tabata H: Biochemical and morphological characterization of an autism-related molecule, A2BP1, in developing cerebral cortex. ASCB 2013 Annual Meeting (ニューオーリンズ、米国) 2013. 12. 15.
- ⑭ Nagata K, Hamada N, Ito H, Iwamoto I, Mizuno M, Morishita R, Inaguma Y, Tabata H: Biochemical and morphological characterization of A2BP1 in the neuronal tissue. Neuroscience 2013 (サンディエゴ、米国) 2013. 11. 12.
- ⑮ 伊東秀記, 森下理香, 田畑秀典, 岩本郁子, 永田浩一: 生後マウス脳における神経新生の形態学的解析. 日本臨床分子形態学会学術集会 (アクロス福岡、福岡県福岡市) 2013. 9. 12.
- ⑯ 伊東秀記, 森下理香, 田畑秀典, 岩本郁子, 永田浩一: 低分子量 G タンパク質による生後脳における神経新生の制御. 日本生化学会大会 (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市) 2013. 9. 11.
- ⑰ 永田浩一, 稲熊 裕, 浜田奈々子, 田畑秀典, 西村嘉晃, 伊東秀記, 水野 誠, 岩本郁子, 森下理香, 鈴木基正, 熊谷俊幸: マリネスコ・シェーグレン症候群における大脳皮質形成障害の分子病態機構. Neuro2013 (国立京都国際会館、京都府京都市) 2013. 6. 22.
- ⑱ 浜田奈々子, 伊東秀記, 岩本郁子, 水野誠, 森下理香, 稲熊 裕, Sachiyo Kawamoto, 田畑秀典, 永田浩一: 神経組織における A2BP1 の生化学的、形態学的な特性評価. Neuro2013 (国立京都国際会館、京都府京都市) 2013. 6. 21.
- ⑲ 伊東秀記, 森下理香, 岩本郁子, 永田浩一: 嗅球における神経新生を制御する分子機構の解析-in vivo エレクトロポレーション法への応用. Neuro2013 (国立京都国際会館、京都府京都市) 2013. 6. 21.

[その他]

ホームページ等

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所

<http://www.inst-hsc.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森下 理香 (MORISHITA RIKA)

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・研究助手

研究者番号: 30393135