

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670488

研究課題名(和文) 自閉性疾患の原因分子探索と病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Genetic and molecular analyses of causative genes for 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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は遺伝学的手法を用いて自閉性疾患の原因遺伝子の探索を遂行し、時計遺伝子の一種であるNR1D1に変異を見出した。そこで、子宮内胎仔脳遺伝子導入法を用いて、発達期のマウス大脳皮質でNR1D1を発現抑制し、固定切片を作成して観察したところ、神経細胞の移動障害が観察された。また、NR1D1の発現抑制は、脳室帯の幹細胞の細胞周期には影響を与えなかった。そこで、移動障害の実態を詳細に解析するために、NR1D1を発現抑制した脳切片の共焦点顕微鏡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。

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), 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 performed genetic analyses of ASD patients and found a single amino acid mutation in a patient. We then carried out a comprehensive analyses with in utero electroporation including cortical neuron migration, axon elongation, dendrite development and live-imaging. Consequently we found abnormal phenotypes in the above analyses.

研究分野：小児神経科学

キーワード：自閉性障害 神経細胞 大脳皮質構築

1. 研究開始当初の背景

自閉性障害(ASD)は、社会性・言語やコミュニケーション能力の発達障害、および、限定されたあるいは反復した行動・興味・活動、を主たる症状とする発達障害で、50～80%で睡眠障害を合併する。ASD病態の本質は、シナプス構造・機能障害を主体とする大脳皮質発達障害であると考えられる。実際、ASDの病因・病態関連遺伝子(400種類以上の報告がある)は、シナプス形成・維持に関する機能を有する場合が多い。一方、申請者らはASD患者の遺伝子解析を行い、11種類の時計遺伝子(TIMELESS (TIM), NR1D1, PER1-3, CLOCK, BMAL1/2, MTNR1A/B, CSNK1E)にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異を発見していた。

2. 研究の目的

自閉性障害(ASD)の病態には大脳皮質発達障害、特にシナプス構造・機能障害が重要な役割を果たす。一方、半数以上のASD患者は睡眠障害を合併することから概日リズム異常も想定される。しかし、ASDにおける概日リズム障害(時計遺伝子の異常)の実体は、大脳皮質発達・シナプス機能との関連を含めて殆ど判っていない。一方、申請者らは、ASD患者の遺伝子解析により、NR1D1を含む11種類の時計遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異を見出している。NR1D1は核内受容体の一つである。核内受容体とは、細胞内タンパク質の一種であり、リガンドが結合することで核内に移行し、DNAに直接結合して、細胞核内でのDNA転写を調節する受容体である。核内受容体は遺伝子スーパーファミリーを形成しており、発生、発達や代謝さらに体内時計(概日リズム)などに関与している。そこで本研究では、NR1D1蛋白質の機能障害に焦点を当て、“in vivo/in vitro 解析バッテリー”による包括的解析を行ない、“概日リズム(睡眠)異常と大脳皮質発達(シナプス回路構築)障害”の観点からASDの病態基盤に迫ろうと試みた。

3. 研究の方法

本研究では、独自に構築した“発達障害関連分子のin vivo/in vitro 解析バッテリー”を用いて、NR1D1の生理機能/病態機能解析を遂行する。具体的には、in vivo 実験として、大脳皮質神経細胞移動、軸索伸長、樹状突起の発達、細胞周期、の解析を行った。各項目の実験は共通の基本戦略に基づいて遂行する。すなわち、対象遺伝子のノックダウン(RNAi)とレスキュー実験を行うことで生理機能の解析を、また、発現を抑制した状態で変異遺伝子の強制発現(変異体レスキュー)を行うことで病態機能の解析を行った。

4. 研究成果

NR1D1はオーファン核内受容体に属し、ROPE配列に結合して転写を阻害する。NR1D1は発現リズムに関与し、遺伝子欠損マウスでは、恒常条件で短い活動周期を示し、光への反応が変化しており、概日行動リズムに関与することが示唆されている。本研究では、典型的な自閉症様症状を示し、重度の知的障害がある成人女性において、NR1D1に父性遺伝の変異が認められた。この女性には他にも睡眠障害、攻撃性を示し、発語はないことが認められた。そこで、大脳皮質形成過程に対するNR1D1の機能を解析する目的として、子宮内胎仔脳遺伝子導入による標的遺伝子発現のノックダウンとレスキュー実験を行った。NR1D1の発現を抑制した結果、大脳皮質形成の過程で神経細胞の移動が遅れることがわかった。これにRNAi抵抗型の野生型NR1D1を発現させると移動障害は回復したが、変異型NR1D1では回復しなかった。またNR1D1の発現抑制の結果、対側皮質への軸索伸長と樹状突起の発達も障害された。一方、NR1D1の発現抑制は細胞周期(神経幹細胞の増殖)には影響を及ぼさなかった。以上の結果から、自閉性障害に関与するNR1D1は、大脳皮質形成過程の細胞移動、神経細胞ネットワーク形成において、重要な役割を持つ可能性があることを見いだした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13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 RBF1/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遺伝子の解析. **脳と発達** 46, 125-130, 2014.

〔学会発表〕(計3件)

招待講演のみ抜粋

12. Nagata K: Comprehensive approach to understand physiological role of SIL1, a gene causing intellectual disability. 25th ISN meeting Symposium (Cairns, Australia) 2015.8.24.
13. 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)2015.9.11.(シンポジウム)
14. 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) 2014.5.29 (シンポジウム)

〔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)

愛知県心身障害者一口二一発達障害研究所・神経

制御学部・部長

研究者番号：50252143