

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500323

研究課題名 RNAi を利用した Fly/mouse 二段階スクリーニングによる自閉症遺伝子の探索

研究課題名 Two steps screening of autistic genes by using Fly/mouse as model animals.

研究代表者 小泉 恵太 (Koizumi, Keita)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授

研究者番号：70377406

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒト自閉症・発達障害に関わる遺伝子の同定を最終的な目的とし、ショウジョウバエ、マウスモデルを利用した二段階の遺伝子スクリーニング／機能解析を行った。すなわち約 8800 のショウジョウバエ遺伝子のスクリーニングからスタートし、マウスでの二次スクリーニング／機能解析から 7 つの遺伝子に絞り込み解析を進めた。このうち *RoboIII/IV* 遺伝子については、ヒト自閉症者サンプルを用いた臨床研究から、自閉症との関連性を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：The final goal of this study is to identify new genes that are associated with autism/developmental disorders. For this purpose, we screened around 8800 genes in *Drosophila* as the first step and the second step studies in mice picked up 7 candidate genes, possibly, related to human developmental disorders. Our clinical study finally succeeded to figure out ones of these genes, *RoboIII/IV* are associated with autism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経発生遺伝学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳発達障害、遺伝子スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

自閉症・精神遅滞などのヒト発達障害は、治療はおろか、原因の特定、診断すら困難な精神障害である。近年のヒト集団遺伝学の発

達は、発達障害の主たる原因が遺伝的要因であることを明らかにしている。しかし、未だに同定されていない原因遺伝子も多数存在すると考えられ、また機能的に見た各遺伝子

間の関連性は明らかにされておらず、何が自閉症の原因であるかは未解明である。研究代表者はモデル動物を用いた効率的な遺伝子機能解析方の確立が重要であると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者らは金沢大学 21 世紀 COE「発達・学習・記憶と障害の革新脳科学の創成」(平成 16 年度～20 年度)において、ショウジョウバエを用いたゲノムワイド RNAi スクリーニングを進めた (PNAS 104: 5626-31、2007)。これらの遺伝子の中にはヒト発達障害原因遺伝子のホモログも多数存在し、このことから研究代表者は、ショウジョウバエ遺伝子スクリーニングを出発点とした、ヒト発達障害遺伝子の同定が可能であると考えた。そこで、本研究では、ハエスクリーニングから同定された遺伝子をヒト集団遺伝学の文献情報などを元に絞り込み、マウス神経細胞初代培養系を用いた解析等から二次スクリーニングを行い、自閉症原因遺伝子候補を絞る。さらに、金沢大学、浜松医科大学の臨床研究グループとの共同研究から、自閉症患者での対象遺伝子異常を追求する。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ遺伝子の RNAi ゲノムワイドスクリーニング

上述の金沢大学 COE プロジェクトの中で進められているショウジョウバエスクリーニングを更に推進し、ハエ神経発生に関与する遺伝子の同定を進める。更に同定された遺伝子についてトランスジェニック系統を作り、その免疫組織染色や行動解析から、遺伝子機能を明らかにする。

(2) マウス神経培養細胞系での対象遺伝子の分子機能解析

マウス胚 cortex 細胞の初代培養系を用いた解析を行い、神経の初期分化に対象遺伝子がどのような影響をもたらすかを調べる。既知の発達障害原因遺伝子での解析と比較し、機能的な因果関係について追究する。

(3) 自閉症患者サンプルを用いたヒト臨床研究

金沢大学子どもこころの発達研究センター・棟居 (連携研究者) グループ、浜松医大精神科・森則夫教授グループとの共同研究から、ヒト自閉症患者での対象遺伝子の臨床研究を行う。対象遺伝子のゲノム解析、血液サンプルを用いた mRNA 発現解析から、自閉症との関連性を調べる。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエのゲノムワイド RNAi スクリーニング

研究分担書の東田と共同で RNAi ゲノムワイドスクリーニングを行い、新たに約 1500 の遺伝子をスクリーニングした (従来の分を含め、ショウジョウバエ全遺伝子の 65%にあたる約 8800 遺伝子をスクリーニング)。この結果、スクリーニング全体として神経発生に重要と考えられる約 200 遺伝子を同定することが出来た。これらの遺伝子について対応するヒトホモログを同定し、発達障害との関連性があると思われる複数の遺伝子を絞り込んだ。このうち、少なくとも 9 つの遺伝子については発達障害の原因遺伝子として既に報告がなされていることが明らかとなった。スクリーニングを行っていない残りの遺伝子については、ヒトとホモロジーを持つ遺伝子が少なくなったことや、ORF を持たないケースが増えたことなどから、遺伝子スクリーニングは、この時点で完了とした。

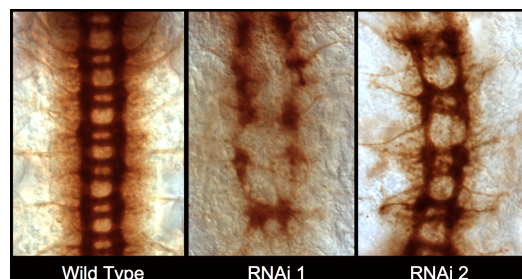


図 1. ATRX 遺伝子の RNAi によって生じる神経発生異常。ATRX のヒトホモログは発達障害の原因遺伝子である。

(2) マウス脳初代培養細胞を用いた RNAi

解析

このスクリーニングデータをヒト発達障害遺伝子同定に結びつける為の次のステップとして、マウス脳初代培養細胞を用いた RNAi 実験を試みた。すなわち、同定されたヒトホモログのうち、神経細胞の初期分化や幹細胞の増殖に関与すると考えられる遺伝子を用いて RNAi 実験を行い、神経前駆細胞の分化、neurite 伸長に対する影響を調べた。また、RT-PCR 等を利用して、脳組織ごとの発現、発生過程での発現を明らかにした。このような解析とヒト自閉症、発達障害研究の文献情報から、*Robo*、*Ect2*、*Hit* (未解析新規遺伝子) などの遺伝子を発達障害と関連性の高い遺伝子として、絞り込んだ (*Ect2*、*Hit* に関してはマウス研究の段階で論文報告を行った-発表論文の項を参照)。

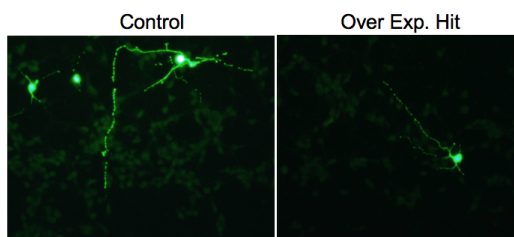


図 2. Hit 遺伝子の強制発現による neurite 伸長抑制

(3) ヒトゲノム解析と血液サンプルを用いた mRNA 発現

スクリーニングされた遺伝子のうち *Robo* は、ショウジョウバエ研究からセロトニントランスポーター (自閉症の原因遺伝子) との関連性が指摘されていることなどから、自閉症者サンプル (252trio) を用いて、そのホモログである *Robo* 遺伝子ファミリー (*Robo I* ~ *IV*) の解析を行った。この結果、*Robo III/IV* 遺伝子の SNP が、自閉症との間に有意な相関関係があることを突き止めた (*Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2008)。*Robo* と自閉症との関連性についての報告は、これが世界で初めてである。

また、マウスモデルでの解析を進めオキシトシン分泌との関連性を明らかにした *CD38*

(2007 に *Nature* に発表) についても SNP 解析を行い、自閉症との関連性を指摘した (*Neuroscience Research*, 2010)。

Robo ファミリーのうち、*Robo I* については、学習障害 (Dyslexia) の原因遺伝子候補として注目されている (*J Hum Genet*.52:104-9, 2007)。また、ショウジョウバエ研究から、ハエ *Robo* タンパクは *Neurexin* (ヒト *Neurexin* は自閉症原因遺伝子) との分子間相互作用が報告されており (*J Neurosci*.30:5653-67, 2010)、今後、モデル動物を用いた詳細な研究が必要であるものと考えている。

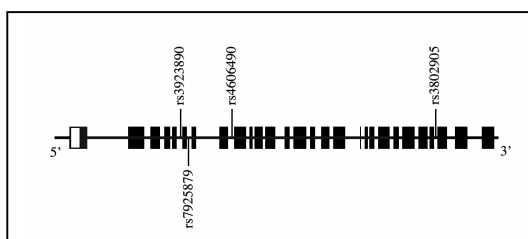


図 3. *Robo III* 遺伝子イントロン中に見られる SNP のうち自閉症と関連性のあるものを示す。

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 7 件)

- ① Munesue T,,,, Koizumi K (54 名中 10 番目),,,, Higashida H. (54 番目)
“The two genetic variants of *CD38* in subjects with autism spectrum disorder and controls.”
Neuroscience Research 67: 181-91, 2010. (査読有)
- ② Islam MS,,,, Higashida H (6 名中 5 番目), Koizumi K. (6 番目)
“Expression of a Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor, *Ect2*, in the Developing Mouse Pituitary.”
Journal of Neuroendocrinology 22: 477-82, 2010. (査読有)
- ③ Nakajima H,,,, Koizumi K (18 名中 16 番目),,,, Motoo Y.
“Induction of HITS, a newly identified family with sequence similarity 107 protein (FAM107B), in cancer cells by heat shock

stimulation.”

International Journal of Oncology 37: 583-93, 2010. (査読有)

- ④ 東田陽博、小泉恵太、吉原亨、棟居俊夫
オキシトシンとバソプレッシン-社会性認知行動と信頼の神経化学的基盤
子どもの心と脳の発達 1: 80-89, 2010.
(査読無)

- ⑤ Higashida H. (11名中1番目),,,Munesue T.
(6番目),,, Salmina AB.
“Oxytocin signal and social behaviour: comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and CD38 gene knockout mice.”

J Neuroendocrinol. 22: 373-9, 2010. (査読有)

- ⑥ 東田陽博、堀家慎一、小泉恵太、吉原亨
「自閉症分子マーカー探索——自閉症の遺伝子・分子生物・実験動物学的研究」
医学のあゆみ 231: 1072-78, 2009. (査読無)

- ⑦ Anitha A.,Koizumi K.(24名中20番目),Higashida H.(21番目),,, Mori N.
“Genetic analyses of *roundabout (ROBO)* axon guidance receptors in autism.”
Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 147B(7):1019-27, 2008. (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① Koizumi K., Nakajima H., Higashida H.
“Fly/Mouse analysis of genes that cause autism and human developmental disorders.”
第33回日本分子生物学会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ② Nakajima H.,,, Koizumi K. (8名中8番目)
“Induction of Hits, a newly identified tumor suppressor protein (FAM107B), in cancer cells by heat shock stimulation.”
第33回日本分子生物学会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ③ 吉田康真,,, 小泉恵太 (7名中5番目),,, 東田陽博 (7番目)
「マウス脳内のEct2の発現解析」
第33回日本分子生物学会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

- ④ Koizumi K., Higashida H.

“Genetic studies of human developmental disorders using Drosophila/mouse as model animals.”

第32回日本分子生物学会、2009年12月10日、パシフィコ横浜(神奈川県)

- ⑤ Saharul M. I.,小泉恵太、吉原亨、浅野雅秀、東田陽博
「PRC1複合体のマウス胚 cortex での発現解析」

第51回日本神経化学学会大会、2008年9月11日、富山国際会議場(富山県)

- ⑥ 小泉恵太, Saharul M.I. 東田陽博

「ショウジョウバエを用いた発達障害原因遺伝子の探索とマウス/ショウジョウバエをモデルとした分子機能解析」

第31回日本分子生物学会年会、2008年12月11日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

[図書] (計1件)

- ① Higashida H.,Koizumi K. (10名中6番目),,,Munesue T. (Edited by Bridges R.S.)
Neurobiology of the Parental Brain (Chapter IV-23: 361-375)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小泉 恵太 (Koizumi, Keita)
金沢大学・子どもの心と脳の発達研究センター・特任准教授
研究者番号：70377406

(2)研究分担者

東田 陽博 (Higashida, Haruhiro)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：30093066

(3)連携研究者

棟居 俊夫 (Munesue, Toshio)
金沢大学・子どもの心と脳の発達研究センター・特任教授
研究者番号：50293353