

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K14337

研究課題名(和文) 自閉症関連遺伝子AUTS2の機能解明と限局性皮質異形成症の形成機序

研究課題名(英文) Analysis of the AUTS2 gene and its relationship with focal cortical dysplasia

研究代表者

星野 幹雄 (Hoshino, Mikio)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・部長

研究者番号：70301273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：AUTS2は、統合失調症、自閉症スペクトラム障害、ADHD、などの様々な精神疾患に関連した遺伝子であるが、その機能は長らく不明であった。我々は、そのコードするAUTS2タンパク質が、細胞骨格系を制御し、神経細胞移動や神経突起伸長関与することを見いだしていた。本研究計画で、我々はAUTS2がシナプス形成に関与することをさらに見いだした。さらに、ノックアウトマウスの解析から、この遺伝子が記憶・学習、社会行動、などの脳高次機能に関与することを明らかにした。残念ながら、限局性皮質異形成症とこの遺伝子変異との関連を見出すことはできなかった。

研究成果の概要(英文)：AUTS2 is related to various psychiatric disorders, but its function has been elusive. We have previously found that AUTS2 activates Rac1 and simultaneously downregulates Cdc42 to reorganize actin cytoskeleton and is involved in cortical neuronal migration and neuriteogenesis. In this study, we further found that AUTS2 is also involved in synaptogenesis in the developing brain. Moreover, *Auts2*-deficient mice display behavioral abnormalities including anxiety-related emotion and memory formation. These findings suggest that AUTS2 acts as a novel regulator for Rho family GTPases contributing to brain development and give good insights into the pathology of human psychiatric disorders with AUTS2 mutations.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 発生・分化 脳神経疾患 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

自閉症、精神発達遅滞、てんかん、ADHDなどは、若年のうちからその症状が複合的に出現することが多く、それ故に、これらの疾患は、脳の発生の異常が関与していると考えられている。これまでに、これら精神疾患に関与すると考えられる遺伝子がいくつか同定されているが、治療法はもとより発症に至る分子機構もよくわかっていない。ヒト *Autism Susceptibility Candidate 2 (AUTS2)* 遺伝子は、自閉症、てんかん、精神発達遅滞などの精神症状を示す患者で、相互転座、DNA 欠失などの異常が報告され、これら精神疾患との関連が強く示唆されている。近年の大規模スタディにより、極めて多くの患者にこの遺伝子の異常が検出されているが、その分子機能も生理機能も全く不明である。薄弱な根拠から、AUTS2 蛋白質が核蛋白質として働くこと提唱されているにすぎなかった。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、AUTS2 蛋白質が細胞質において Rho ファミリー G 蛋白質 Rac1 および Cdc42 シグナル伝達系を制御し、神経細胞移動や神経突起伸長など神経系の発生に関与することを明らかにした(本研究課題申請時にはまだ未発表データ。2014 年末に、Hori et al., Cell Reports に掲載)。本研究では、培養細胞や子宮内電気穿孔法、プロテオミクス解析など多角的な解析系によって AUTS2 の細胞生物学的、神経発生生物学的機能を明らかにする。さらに、精神疾患マウスモデルとしての *Auts2* ノックアウトマウスを行動解析することで、ヒト *AUTS2* 遺伝子異常による精神疾患の病理を理解する。

なおヒト限局性皮質異形成と *AUTS2* 遺伝子の変異の関連についても調べようとしたが、ポジティブな結果が得られなかったため、本報告書ではそれについては触れない。

3. 研究の方法

(1) AUTS2 のシナプス形成への関与の解明。
これまでの *in vivo*、*in vitro* の解析から、AUTS2 は神経細胞移動と神経突起伸長の二つの分子機能を持つと示されたが、シナプス形成への関与はわかっていない。そこで、ノックアウトマウスを使って、*in vitro* および *in vivo* での表現型を解析する。

(2) ノックアウトマウス個体を用いた行動解析によるヒト疾患の病態の解明。

通常の *Auts2* ノックアウトマウスはホモ接合体で胎生致死であるため、ヘテロ接合体を用いて行動解析する。実際にヒト疾患でもヘテロ変異のために、これが良い動物モデルとなるのではないかと考えている。

4. 研究成果

(1) シナプス形成への影響。

AUTS2 のノックアウトマウス (*Emx1-Cre* を用いた終脳特異的なコンディショナルノックアウトマウス) の海馬の初代培養細胞系では、明らかなシナプス構造の増加が見られた。また、コンディショナルノックアウトマウスの脳のゴルジ染色では、脳の部位によって、シナプスの数が優位に増加する領域と、優位に減少する領域が見出された。ただし、個々のシナプスの形態については、大きな差異は見出されなかった。以上から、AUTS2 がシナプス形成またはシナプス刈り込みに関与していることが示唆された。実際に、ヒトの自閉症ではシナプス刈り込みの異常によるシナプス数の増大が、統合失調症ではシナプス形成の異常によるシナプス数の減少が報告されており、このコンディショナルノックアウトマウスがそれらヒト疾患の良い動物モデルとして使えるのではないかと考えられた。

(2) ノックアウトマウス個体を用いた行動解析によるヒト疾患の病態の解明。

ノックアウトマウスでは、オープンフィールドテストで箱の中央部へ侵入する時間の増加が認められたため、不安が低下していることが示唆された。また、高架十字迷路ではオープンアームへの侵入が優位に増加していたことから、やはり不安の低下が示唆された。しかし、スリーチャンバー試験による社会性行動には異常が認められなかった。新規物体記憶試験では記憶の低下が認められ、また恐怖条件付けテストでは音声記憶の低下が認められた。さらに、聴覚および体性感覚について、知覚過敏が認められた。プレパルスインヒビションテストでは異常が認められなかった。

以上から、一部、ヒトの自閉症や ADHD に似た表現型が見出されたため、このコンディショナルノックアウトマウスをヒト疾患の動物モデルとして使えるのではないかと考えている。

ヒトにおいては、この遺伝子が様々な壊れ方をすることによって、統合失調症から自閉症に至る様々な精神疾患を引き起こすと考えられている。実際に、我々も単純なノックアウトマウスとこの遺伝子の一部を欠損したマウスとの間では、異なる種類の行動異常を観察している。今後は、この遺伝子の壊れ方と、精神疾患の種類との関連についても、マウスを用いて解析していきたい。

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8件)

Hashimoto R, Hori K, Owa T, Miyashita S, Dewa K, Masuyama N, Sakai K, Hayase Y, Seto Y, Inoue YU, Inoue T, Ichinohe N, Kawaguchi Y, Akiyama H, Koizumi S, Hoshino M: Origins of oligodendrocytes in the cerebellum, whose development is controlled by the transcription factor, Sox9. *Mech Dev*, 140:25-40, 2016. DOI: 10.1016/j.mod.2016.02.004. 査読有

Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Yamada K, Hoshino M: Heterozygous disruption of Autism susceptibility candidate 2 causes impaired emotional control and cognitive memory. *PLoS One*, 10 (12): e0145979, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0145979. 査読有

Ruffault P-L, D'Autreaux F, Hayes JA, Nomaksteinsky M, Autran S, Fujiyama T, Hoshino M, Hagglund M, Kiehn O, Brunet J-F, Fortin G, Goridis C: The retrotrapezoid nucleus neurons expressing Atoh1 and Phox2b are essential for the respiratory response to CO₂. *eLife*, 10.7554, 2015. DOI: 10.7554/eLife.07051. 査読有

De Luca A, Parmigiani E, Tosatto G, Martire S, Hoshino M, Buffo A, Leto K, Rossi F: Exogenous Sonic Hedgehog modulates the pool of GABAergic interneurons during cerebellar development. *Cerebellum*, 14 (2): 72-85, 2015. DOI: 10.1007/s12311-014-0596-x. 査読有

Watanabe T, Kakeno M, Matsui T, Sugiyama I, Arimura N, Matsuzawa K, Shirahige A, Ishidate F, Nishioka T, Taya S, Hoshino M, Kaibuchi K: TTBK2 with EB1/3 regulates microtubule

dynamics in migrating cells through KIF2A phosphorylation. *J Cell Biol*, 210 (5): 737-751, 2015. DOI: 10.1083/jcb.201412075. 査読有

Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, Uezumi A, Mikami N, Nakamura M, Sato T, Ikawa M, Hoshino M, Tsuchida K, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S: Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell Rep*, 13 (2): 302-301, 2015. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.083. 査読有

Egusa SF, Inoue YU, Asami J, Terakawa YW, Hoshino M, Inoue T: Classic cadherin expressions balance postnatal neuronal positioning and dendrite dynamics to elaborate the specific cytoarchitecture of the mouse cortical area. *Neurosci Res*, 105:49-64, 2015. DOI: 10.1016/j.neures.2015.09.006. 査読有

Leto K, Arancillo M, Becker EB, Buffo A, Chiang C, Ding B, Dobyns WB, Dusart I, Haldivur P, Hatten ME, Hoshino M, Joyner AL, Kano M, Kilpatrick DL, Koibuchi N, Marino S, Martinez S, Millen KJ, Millner TO, Miyata T, Parmigiani E, Schilling K, Sekerková G, Sillitoe RV, Sotelo C, Uesaka N, Wefers A, Wingate RJ, Hawkes R: Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum*, in press. 査読有

〔学会発表〕(計19件)

Hoshino M, Hori K: Analysis of autism susceptibility candidate 2 gene during development. *Tohoku Forum for Creativity, Frontiers of Brain Science*, "Development and Disease" symposium. 20150824 - 20150826, Sendai, Japan

Hoshino M: Physiological and pathological analyses of an autism-related gene. EMBO Workshop on Cortical Development in Health and Disease. 20150426 - 20150429, Rehovot, Israel

星野幹雄: 各種精神疾患とAUTS2 遺伝子、そしてヒトの進化. 平成 27 年度生理学研究所研究会「シナプスの構造構築と機能発現の分子基盤」. 20150618 - 20150619, 生理学研究所(愛知県岡崎市)

星野幹雄: 各種精神疾患とAUTS2 遺伝子をめぐる最近の展開. 第6回エビリファイフォーラム. 20160301, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

Hoshino M, Nagai T, Shen W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hori K: Cytoplasmic function of AUTS2 in neural network formation. Society for Neuroscience 45th annual meeting. 20151017 - 20151021, Chicago, IL, USA
早瀬ヨネ子, 田谷真一郎, 山田真弓, 初山俊彦, 三浦義紀, 大野行弘, 伊原信夫, 芹川忠夫, 天野殖, 星野幹雄: イハラてんかんラットを用いた“てんかん”の研究. 第104回日本病理学会総会. 20150430 - 20150502, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

堀 啓, 青木瞭, 坂本亜沙美, 大輪智雄, 宮下聡, 阿部学, 山崎真弥, 崎村健司, 星野幹雄: 小脳発達における自閉症感受性遺伝子 Aut2 の機能解析. 第38回日本神経科学大会. 20150728 - 20150731, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 中村卓郎, 後飯塚僚, 貝淵弘三, 星野幹雄: Role of Meis1 in the cerebellar development. 第38回日本神経科学大会. 20150728 - 20150731, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

出羽健一, 田谷真一郎, 有村奈利子, 小泉修一, 星野幹雄: Functional analysis of a Down syndrome-associated gene. 第58回日本神経化学学会大会. 20150911 - 20150913, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

大輪智雄, 田谷真一郎, 西岡朋生, 中村卓郎, 後飯塚僚, 貝淵弘三, 星野幹雄: Role of the Meis1 in the development of cerebellum. 第58回日本神経化学学会大会. 20150911 - 20150913, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hoshino M: Roles of the autism susceptibility candidate gene Aut2 for neuronal migration and neuritogenesis in the developing brain. 第58回日本神経化学学会大会. 20150911 - 20150913, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)

田谷真一郎, 有村奈利子, 出羽健一, 早瀬ヨネ子, 柳川右千夫, 星野幹雄: ダウン症関連分子による神経細胞移動の分子機構の解明. 第38回日本分子生物学会年会. 20151201 - 20151204, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

大輪智雄, 田谷真一郎, 宮下聡, 西岡朋生, 中村卓郎, 五飯塚僚, 貝淵弘三, 星野幹雄: 小脳顆粒細胞の分裂および分化における Meis1 の調節機構. 第38回日本分子生物学会年会. 20151201 - 20151204, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

宮下聡, 瀬戸裕介, 会田将吾, 川口義弥, 星野幹雄: Prox1 regulates the development of cerebellar granule cell precursors by modulating the cell cycle kinetics. 第38回日本分子生物学会年会. 20151201 - 20151204, 神戸

ポートアイランド（兵庫県神戸市）
出羽健一，田谷真一郎，有村奈利子，星野幹雄，小泉修一：生後小脳におけるダウン症関連遺伝子の解析．第 38 回日本分子生物学会年会．20151201 - 20151204，神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
大輪智雄，田谷真一郎，西岡朋生，中村卓郎，五飯塚僚，貝淵弘三，星野幹雄：Meis1 による顆粒細胞の増殖・分化の制御機構の解明．2015 年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム．20151217 - 20151219，一橋大学（東京都）
宮下聡，瀬戸裕介，会田将吾，川口義弥，星野幹雄：Prox1 regulates the development of cerebellar granule cell precursors by modulating the cell cycle kinetics．2015 年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク冬のシンポジウム．20151217 - 20151219，一橋大学（東京都）
Yamada M, Hori K, Sakamoto A, Abe M, Yamazaki M, Sakimura K, Hoshino M: Loss of autism susceptibility candidate gene, Auts2 induces the excessive synaptic formation in mouse forebrains．第 9 回神経発生討論会・難治疾患共同研究拠点 共同開催学術集会．20160318 - 20160319，東京医科歯科大学（東京都）
Aoki R, Hori K, Owa T, Miyashita S, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Hoshino M: The role of autism susceptibility candidate gene AUTS2 in the cerebellar Purkinje development．第 9 回神経発生討論会・難治疾患共同研究拠点 共同開催学術集会．20160318 - 20160319，東京医科歯科大学（東京都）

〔その他〕

ホームページ

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/index.html

6．研究組織

(1) 研究代表者

星野幹雄（HOSHINO, Mikio）

国立精神神経医療研究センター・神経研究所・病態生化学研究部・部長

研究者番号：70301273