

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14355

研究課題名(和文) 精神発達疾患におけるRNA制御異常の解明

研究課題名(英文) The RNA-based mechanism underlying pathophysiology in the neurodevelopmental disorders

研究代表者

飯島 崇利 (IIJIMA, Takatoshi)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授

研究者番号：90383702

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)：バルプロ酸(VPA)は胎生期での暴露により自閉症スペクトラム障害(ASD)の発症させるリスクファクターとして知られる。妊娠マウスやラットにVPAを投与すると、その仔においてコミュニケーション障害などの表現型が見られ、ASDモデルとして研究材料に用いられているが、VPA暴露が胎児の脳発達にどう影響するのか、その具体的な分子メカニズムについては未だ混沌としている。申請者らは最近、初代培養神経細胞に一過性にVPA処理を行い、その薬理効果を直接評価するアッセイ系を確立した。重要なことに、このモデルは抑制性神経細胞の活動低下など、他の自閉症モデル動物と共通した生理学的所見を示すことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorders (ASDs) are a neurodevelopmental disorders characterized by impairments in social interactions and stereotyped behaviors. Valproic acid (VPA) is frequently used to treat epilepsy and bipolar disorders, but increases the risk of the unborn child to develop an ASD during pregnancy. Therefore, VPA-exposed rodent models may allow for identification of synaptic pathophysiology underlying ASD risk. Here, we systematically probed alterations in synaptic proteins that might contribute to autism-related behavior in the offspring of in utero VPA-exposed mice. Moreover, we tested whether direct VPA exposure of cultured neurons may recapitulate the molecular alterations seen in vivo. VPA-exposed neurons in culture exhibit a significant decrease in the number of GABAergic synapses. This shift in excitatory/inhibitory balance results in increased spontaneous activity. Therefore, our study highlights a mechanism underlying the synaptic pathophysiology in this ASD model.

研究分野：神経薬理学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 バルプロ酸 抑制性神経細胞 シナプス

1. 研究開始当初の背景

転写調節から RNA プロセッシング、翻訳制御までに至る RNA レベルでの発現制御 (RNA 情報発現系) は生命情報発現の重要な仕組みである。脳・神経疾患において、その制御因子である RNA 結合タンパク質群の機能異常が報告されており、自閉症スペクトラム障害 (ASD) の一部では神経情報伝達に重要なタンパク質をコードする RNA の異常スプライシングが観察される。例えば、自閉症原因遺伝子の一つである CAPS2 では、コードする遺伝子 (*cadps2*) のスプライシング異常により自閉症様の行動異常が引き起こされることが報告されている (Sadakata et al., 2006 & 2013)。これは一部の自閉症でスプライシング異常による単一エクソンの挿入の有無が大きく病気の発症に関与しており、重篤な精神症状を引き起こす例の一つである。これまで申請者は神経系においてシナプス分化や可塑性を制御する RNA 情報発現系について重要な成果を挙げてきた (Iijima et al., PNAS, 2005; J. Neurosci., 2009; Cell, 2011; J. Cell Biol., 2014)。本研究課題では申請者のバックグラウンドを十二分に活かし、自閉症 (ASD) を対象に、RNA 情報発現系の制御異常と精神発達疾患の発症や病態との因果関係を明らかにすることを目標としてきた。

2. 研究の目的

近年 RNA スプライシングや RNA 編集などの RNA 情報発現系による生命情報の多様化の破綻が脳・神経系における複数の疾患の発症や病態に関連していることが明らかになりつつあり、キーファクターである RNA 結合タンパク質の機能異常との関係が示唆され始めた。そこで本研究課題では、

- (1) 最近自閉症の候補因子として報告されたスプライシング制御因子である RNA 結合タンパク質 SLM1 に注目し、自閉症と RNA スプライシングの異常の関連性を明らかにすること
- (2) 自閉症のリスクファクターである化合物を用いて作製した *in vitro* 自閉症モデルを確立し、これを用いて多角的アプローチにより、自閉症に関わる新たな分子メカニズムを解明すること
- (3) RNA スプライシングレベルでの特異的变化を網羅的に解析し atypical な遺伝子産物などを同定することで、自閉症の分子病態の解明や治療に向けた分子的基盤を確立することを目指した。

3. 研究の方法

自閉症と RNA 制御との関係を探るアプローチとして、最近自閉症の候補因子として挙げられているスプライシング制御因子 SLM1 とそのファミリーに注目し、エクソンアレイによる SLM1 の標的 RNA 分子の同定、及びそのノックアウトマウスを組織学的・生理学的に解析を行うことで疾患の発症や病態との

関連について調べ、新規自閉症モデルとしての可能性を検討した。

また、自閉症モデルにおける従来のトランスクリプトーム解析のほとんどは遺伝子の単純な発現変化レベルであり、単一エクソンレベルの細部の発現変化に注目しているものはない。上記の SLM1 欠損による RNA 制御異常で産生される atypical な遺伝子産物を同定に加え、ヒト自閉症の分子病態との関連について検討するため、申請者が薬理的に作成できる *in vitro* 自閉症モデルを確立し、このモデルでの分子多様性レベルでの変化を、次世代シーケンス解析とエクソンアレイによって定性的・定量的に調べた。

(方法 1) 自閉症の候補因子として挙げられる RNA 結合性分子群の機能解析

最近自閉症の候補因子としてスプライシング因子 SLM1 をコードする KHDRBS 2 遺伝子が報告された (Salyakina et al., 2012)。申請者は近年 SLM1 の神経系における詳細な発現やスプライシング制御機構を解析し、さらにこのノックアウトマウスを作成してきた (Iijima et al., JCB, 2014)。このマウスを用いて exon array や次世代シーケンスによって SLM1 の標的 RNA の網羅的同定を行うと同時に、形態レベルでの表現型スクリーニングを行った。興味深い所見として、SLM1 は精神発達疾患と特に関連のある抑制性介在ニューロンの一部のサブタイプに発現していること (Iijima et al., JCB, 2014)、また一部の自閉症患者や自閉症モデルには小脳での形態異常が見られ、小脳機能との関連が示唆されているが (Courchesne et al., N. Engl. J. Med., 1988)、研究開始当時、SLM1 のファミリーである SAM68 (*KHDRBS1*) と SLM1 (*KHDRBS2*) のダブルノックアウトマウスにおいて小脳プルキンエ細胞の形態異常を発見しており、本申請課題ではエクソンアレイと RNA-seq を用いてこの表現型を引き起こす原因について究明を行った。

(方法 2) *in vitro* 自閉症モデルの確立およびその表現型解析

まず、申請者らは自閉症リスクファクターであるバルプロ酸 (VPA) を培養大脳皮質細胞に一定期間低濃度で処理することにより *in vitro* 系の自閉症モデルとなり得るかを生化学的、形態学的、生理学アプローチにより多角的に検討した。さらに、高等動物における RNA レベルでの遺伝子情報の多様性の量的・質的变化が精神活動の恒常性に与える影響をさらに詳しく検討するため、この VPA モデルを用いて単一エクソンレベルでの mRNA 発現プロファイルやスプライシングの変化をエクソンアレイや次世代シーケンスによって解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 自閉症の候補因子として挙げられる RNA 結合性分子群の機能解析
SLM1 ノックアウトマウスにおけるスプライ

シングルレベルでの遺伝子発現変動を調べた結果、遺伝子発現強度には野生型と大きな差がみられないものの、エキソンレベルでは300個以上 ($FC > 2.0$, $p < 0.05$) の変化がみられた。このなかで、小脳プルキンエ細胞での軸索部の形態異常を引き起こす原因となる候補として Ankyrin-G のスプライシング異常を同定した。興味深い事に、Ankyrin-G の遺伝子変異は自閉症、うつ病、統合失調症の原因として知られており、現在このスプライシング異常が軸索部の形態形成や機能にどのように関わっているのかを分子レベルで解析している。

(2) *in vitro* モデルを用いた自閉症スペクトラム障害の分子病態の解明

1 *in vitro* 系自閉症モデルの確立

VPA 暴露が幼若神経細胞に与える影響を大脳皮質培養神経細胞において生化学的、形態学的且つ生理学的に調べたところ、これまで報告されているいくつかの自閉症モデル動物と同様に、興奮性と抑制性入力のバランスが崩れており、これは抑制性 GABA ニューロンのシナプス成熟が遅れていることに起因していることがわかった (Iijima et al., *Sci. Rep.*, 2016) (図表 1)。さらに、網羅的トランスクリプトーム解析により VPA 暴露で変動する分子をプロファイリングしたところ、上記に一致して抑制性神経細胞由来の遺伝子産物が複数減少傾向にあることがわかった。興味深いことに、特に caudal 側基底核 (CGE) より誕生する抑制性神経細胞由来のものがより多く、さらに成熟した VPA 自閉症マウスモデルにおいて調べたところ、この CGE 由来の抑制性ニューロンサブタイプの細胞数が大脳皮質バレル領域では 40%程度にまで減少していることを発見した。この抑制性ニューロンサブタイプの異常はごく最近から精神疾患や発達障害との関連が強く話題となっていることから、今後は外部共同

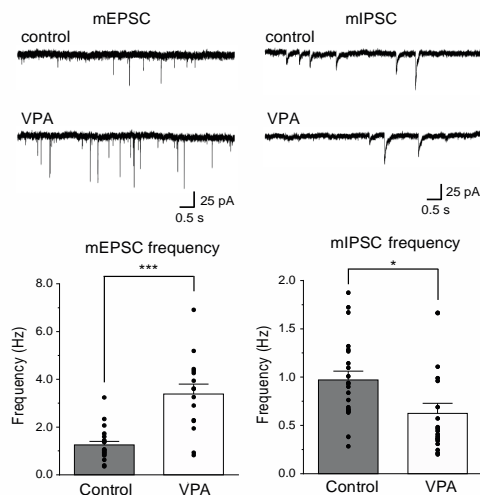


図1 ホールセルパッチクランプ法による *in vitro* VPA モデルでの mEPSCs および mIPSCs の測定。Frequency が変化していることから、VPA がシナプス前終末の数あるいは神経伝達物質放出機能に影響している可能性が示唆される。

研究などにより自閉症の病態について検討を行って行く予定である。

2 *in vitro* 自閉症モデルにおける新規分泌性因子 Ndnf/C4orf31 の同定

上記の *in vitro* 自閉症モデルでの網羅的トランスクリプトーム解析で大きな発現変動を示す分子として Ndnf (Neuron-derived neurotrophic factor) と呼ばれる分泌性因子を同定した。この分子の発現は大変興味深く、大脳皮質の層形成に重要な Cajal-retzius (CR) 細胞に選択的に発現しており、CR 細胞から分泌され大脳皮質の層形成をコントロールする Reelin とほぼ同時期に強く共発現を示すことがわかった (図表 2)。しかしながら、その機能は未解明であり、詳細な機能と自閉症との関係を探るため、昨年度より抗体作成と Crisper/CAS9 でのゲノム編集によるノックアウトマウス作成を行い、現在これらを用いて解析を行っている。

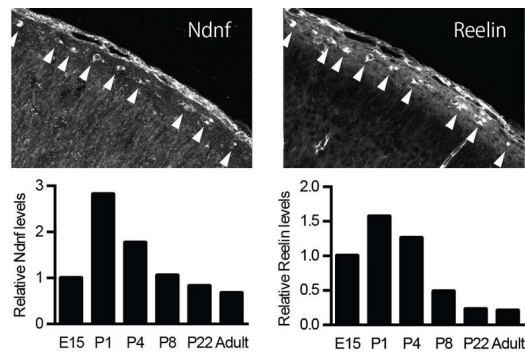


図 2

- 上) 生後 1 日目における Ndnf タンパク質の大脳皮質での発現。第 1 層の Reelin 陽性細胞と共局在する。
下) Ndnf および Reelin mRNA の大脳皮質における発達段階での発現の変化。共に出生前後に発現のピークが見られる。

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 3 件)

- 1) Yuji Sato, Satoko Suzuki, Yoko Iijima, and Takatoshi Iijima. Neuroligin-induced presynaptic differentiation through SLM2-mediated splicing modifications of Neurexin in cerebellar cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. S0006-291X(17)31868-5. (2017) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.097. (T.I. is a corresponding author) (査読有)
- 2) Yoko Iijima, Katharina Behr, Takatoshi Iijima, Barbara Biemanns, Josef Bischofberger and Peter Scheiffele. Distinct Defects in Synaptic Differentiation of Neocortical Neurons in Response to Prenatal Valproate Exposure. *Scientific Reports* 6:27400 (2016) doi: 10.1038/srep27400. (査読有)

- 3) Takatoshi Iijima, Chiharu Hidaka and Yoko Iijima. Update Article: Spatio-temporal regulations and functions of neuronal alternative RNA splicing in developing and adult brains. *Neuroscience Research*. 109:1-8 (2016) doi: 10.1016/j.neures.2016.01.010. (T.I. is a corresponding author) (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) Takatoshi Iijima. Molecular mechanism and function of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. *ConBio2017*, 兵庫 (神戸) 2017.12.06-09.
- 2) Takatoshi Iijima, Yoko Iijima, Masami Tanaka, Satoko Suzuki, Noriko Ayukawa, Peter Scheiffele. Molecular mechanism and function of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. 第 60 回日本神経化学会大会, 宮城 (仙台) 2017.09.07-09.
- 3) Yuji Sato, Satoko Suzuki, Yoko Iijima and Takatoshi Iijima. Alternative splicing of Neurexin plays a crucial role in Neuroligin-induced presynaptic differentiation on cerebellar GABAergic neurons in vitro. 第 60 回日本神経化学会大会, 宮城 (仙台) 2017.09.07-09.
- 4) Yoko Iijima, Masami Tanaka, Satoko Suzuki, Noriko Ayukawa, Peter Scheiffele and Takatoshi Iijima. Molecular mechanism of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. 第 40 回日本神経科学学会大会, 千葉 (幕張) 2017.07.20-22.
- 5) Yuji Sato, Satoko Suzuki, Yoko Iijima and Takatoshi Iijima. Alternative splicing of Neurexin plays a crucial role in Neuroligin-induced presynaptic differentiation on cerebellar GABAergic neurons in vitro. 第 40 回日本神経科学学会大会, 千葉 (幕張) 2017.07.20-22.
- 6) Chiharu Hidaka, Noriko Ayukawa, Satoko Suzuki, Yoko Hanno-Iijima, Peter Scheiffele and Takatoshi Iijima. Molecular mechanism of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. 第 39 回日本分子生物学会年会, 神奈川 (横浜) 2016.11.30-12.02
- 7) Yoko Iijima, Katharina Behr, Barbara Biemans, Josef Bischofberger, Peter Scheiffele and Takatoshi Iijima. Distinct Defects in Synaptic Differentiation of

Neocortical Neurons In Response to Prenatal Valproate Exposure. 第 39 回日本分子生物学会年会, 神奈川 (横浜) 2016.11.30-12.02

- 8) 飯島崇利 「神経系におけるスプライス多様性の破綻と精神発達疾患」第 38 回日本神経化学会 福岡県 (福岡市) 2016.9.10.
- 9) Yoko Iijima, Katharina Behr, Barbara Biemans, Josef Bischofberger, Peter Scheiffele and Takatoshi Iijima. Distinct Defects in Synaptic Differentiation of Neocortical Neurons In Response to Prenatal Valproate Exposure. 第 39 回日本神経科学大会 神奈川 (横浜) 2016.7.20-7.22
- 10) Chiharu Hidaka, Noriko Ayukawa, Satoko Suzuki, Yoko Hanno-Iijima, Peter Scheiffele and Takatoshi Iijima. Molecular mechanism of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. 第 39 回日本神経科学大会 神奈川 (横浜) 2016.7.20-7.22
- 11) 飯島崇利 「神経系 RNA 結合タンパク質による神経接着因子の時空間的な選択的スプライシング制御」日本分子生物学会・生化学会合同大会 (BMB2015) 兵庫県 (神戸市) 2015.12.01-04

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 崇利 (IIJIMA, Takatoshi)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授
研究者番号：90383702

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者

Peter Scheiffele (SCHEIFFELE, Peter)
Dept. of Zellbiologie, Biozentrum,
Universität Basel · Professor

Josef Bischofberger(SCHEIFFELE, Peter)
Dept. of Biomedicine und Physiologie,
Universität Basel · Professor