

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05363

研究課題名(和文) 時計遺伝子群の変異を原因とする自閉性障害の分子病態メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of autism caused by gene abnormalities of the clock genes

研究代表者

永田 浩一 (Nagata, Koh-ichi)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・分子病態研究部・部長

研究者番号：50252143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：自閉性障害(ASD)の病態には大脳皮質発達障害、特にシナプスの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。そこで本研究では、時計遺伝子(TIMELESS, NR1D1, PER3)がコードする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、大脳皮質発達(シナプス回路構築)障害”の観点からASDの病態解析をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、概日リズム障害(時計遺伝子の機能障害)の観点からASDの大脳皮質形成障害・シナプス病態に迫り、新しい病態形成メカニズムの発見を目指した。この着想の発端は、ASD患者の遺伝子解析で、時計遺伝子TIMELESS, NR1D1 and PER3に新規ミスセンス変異を発見したことにある。これらの変異が大脳皮質形成とシナプス動態に与える影響をin vivo/in vitroで包括的に解析した結果、ASDの新たな病態メカニズムの存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional and structural defects in neuronal synapses are thought to underlie the pathophysiology of autism spectrum disorders (ASD). While more than 50 % of ASD patients suffer from sleep disturbance, relationship between circadian rhythm and ASD etiology is largely unknown. In this study, we focused on 3 circadian clock genes, TIMELESS, NR1D1 and PER3, whose gene abnormalities have been reported in ASD individuals. By the use of mouse models produced by "comprehensive in vivo/in vitro analytical battery" we constructed, we analyzed pathophysiological significance of gene abnormalities of TIMELESS, NR1D1 and PER3 in ASD.

研究分野：小児神経学

キーワード：自閉性障害 時計遺伝子 大脳皮質発生 神経細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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た。これまでにASD患者でPER1とMTNR1A/Bの変異は単発的に報告されていたが、申請者らの網羅的解析で見出された変異は全て新規のものであった。これらの結果は、睡眠障害(時計遺伝子異常による概日リズム障害)とASD病態の密接な関連性を示唆する。しかしながら、時計遺伝子群が大脳皮質形成やシナプス発達・動態に果たす役割は殆ど解析されておらず、時計遺伝子異常(概日リズム障害)とASD病態(大脳発達障害)の関連性も全く不明である。そこで本研究では「時計遺伝子変異によるASD病態形成」の全貌を解明する為のスタートとして、1)時計遺伝子群が大脳皮質形成に果たす役割、および、2)それらの変異がASDの発症・病態形成に果たす役割、を分子および個体レベルで解析する意義に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、申請者らが見出した時計遺伝子群の新規変異が、大脳皮質発生とシナプスネットワーク形成に及ぼす影響を、“発達障害関連分子の解析バッテリー”を用いて包括的に解析することを目的とした。特にNR1D1, PER3, TIMELESS,で見出された変異は、データベース解析でもASD病態との関連が強く予想されるため、解析対象とした。これらの遺伝子を発現抑制することで個々の遺伝子の生理機能を明らかにすると共に、遺伝子を発現抑制したうえで疾患関連変異体を強制発現すること(変異体レスキュー)で擬似的疾患状態を再現し、この状態で大脳皮質形成(神経細胞移動、局在、形態)やシナプス構造・機能がどのように障害されるかを“解析バッテリー”で解明することを目指した。研究期間内にこれらの遺伝子の解析を終了し、表現型を比較しつつ原著論文にまとめることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 固定切片観察(従来型形態観察)とin vivoライブイメージ

子宮内エレクトロポレーション法(マウス胎仔の脳室に遺伝子を注入し、電圧をかけて神経幹細胞に導入する方法)を用いて、胎生14日のマウス大脳に発現抑制ベクターを導入した。そして、皮質神経細胞の移動や形態の変化を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。次いで、ライブイメージを行った。神経細胞の形態異常を時間空間的にビデオ解析し、固定切片で見逃していた「動的な細胞異常」を捕捉した。

#### (2) 軸索伸長と樹状突起発達の観察

個々の時計遺伝子について、子宮内エレクトロポレーション法を用いて発現抑制や変異体の過剰発現を行って、軸索伸展に対する影響を解析した。一方、大脳皮質内を移動し終えた、あるいは移動障害によって途中で止まった神経細胞について、樹状突起の発達の状態を観察した。神経細胞の樹状突起を3D画像解析ソフトウェアで検証した。

#### (3) スパイン(シナプス)形成状態のin vitro観察

マウス初代培養神経細胞を用いて、固定細胞観察を行った。海馬神経細胞はシャーレ内で極性を獲得し、シナプスを形成する。そこで、発現抑制ベクターやASD関連変異体を培養海馬神経細胞に導入し、変異体レスキュー条件下で共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。そして、解析対象遺伝子の異常がスパイン形成・維持に果たす役割を解析した。

#### (4) 細胞増殖(細胞周期)の検討

時計遺伝子は他の遺伝子の転写・翻訳を調節している。したがって、時計遺伝子の変異は種々の蛋白質の発現異常を引き起こし、結果として細胞周期の障害を引き起こす可能性がある。

そこで本項目では、神経幹細胞における時計遺伝子の発現を *in vivo* でノックダウンあるいは変異体レスキューし、EdU (DNA 複製のマーカ―)と Ki67(細胞増殖のマーカ―)の染色性を指標にして細胞増殖のスピードを検証した。

#### 4. 研究成果

大脳皮質発達障害を病態とする自閉スペクトラム症(ASD)患者の半数以上に睡眠障害が認められている。私共は自治医大との共同研究で ASD 患者の遺伝子解析を行い、11 種類の時計遺伝子にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異があることを報告した。本研究ではそれらのうち Timeless (Tim)、NR1D1、Per3 について研究成果を得られたので、以下に概要を記す。

Timeless (Tim) は概日リズムの制御に重要なタンパク質で、細胞周期あるいは胚発生に関与すると考えられている。しかし、胎生期の脳における機能については知見が乏しい。そこで Tim に対する特異抗体を作製し、マウス胚発生過程の脳における発現と局在を解析した。抗体の作成および精製を行い、ウェスタンブロット解析を行ったところ、Tim は発生期を通じて発現が観察された。免疫染色の結果、発達期の大脳皮質では、脳室帯近傍の幹細胞に強く発現し、移動を終えた神経細胞に中等度に発現していた。細胞内局在にも特徴があり、発達期の神経細胞では核に濃縮していたが発達に伴い細胞質へと分布状態が変化した。同様な局在変化は海馬神経細胞でも観察された。海馬神経細胞においては Tim は軸索と樹状突起にも局在した。以上の結果から、脳神経系において Tim は時間空間的な制御を受けてその細胞機能を果たしていると考えられた。

NR1D1 (Nuclear receptor subfamily, group D, member 1)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。発生、発達や代謝などの遺伝子転写に関与している。核内受容体は遺伝子配列を共通して有する A-E 領域があり、遺伝子スーパーファミリーを形成している。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 は概日リズムに関与し、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いる。今回、典型的な ASD 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。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。以上の結果から、自閉症様障害に関与する NR1D1 は、大脳皮質形成過程の細胞移動において、重要な役割を持つ可能性があることを見いだした。

Per3 で見られた変異(p.R366Q)は PolyPhen-2, SIFT, Mutation Taster 解析のいずれにおいても ASD の病態形成に寄与することが期待された。Per3 の遺伝子異常による大脳皮質形成への影響を明らかにすることを目的とし、この遺伝子異常が ASD 病態を引き起こす可能性について検討した。解析に当たって 3 種類の Per3 ノックダウンベクターを作成した。これらは Per3 の発現を特異的に抑制し、類縁蛋白質 Per1, Per2 の発現を抑制しなかった。子宮内エレクトロポレーション法を用いた発現抑制により大脳皮質興奮性神経細胞の配置異常が見られた。さらに病態を模倣する目的で、発現抑制と RNAi 抵抗性 Per3 変異体(p.R366Q)の過剰発現を同時に行なったところ、神経細胞の配置は異常のままであった。一方で RNAi 抵抗性 Per3 野生型の共発現では神経細胞の配置異常はレスキューされた。またライブイメージングにより、Per3 発現が抑制された神経細胞は移動速度の低下を示すことが明らかとなり、さら

に in vitro/in vivo のいずれにおいても軸索伸長や樹状突起の伸展が阻害され、神経細胞成熟の遅延を示した。これらの結果から、Per3 の遺伝子異常が ASD の病態形成に關与する可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishizuka K, Tabata H, Ito H, Kushima I, Yoshimi A, Usami M, Watanabe K, Morikawa M, Uno Y, Okada T, Mori D, Aleksic B, Ozaki N, Nagata K	4. 巻 96
2. 論文標題 Possible involvement of a cell adhesion molecule, Migfilin, in brain development and pathogenesis of autism spectrum disorders.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Neurosci. Res.	6. 最初と最後の頁 789-802
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ibaraki K, Mizuno M, Aoki H, Niwa A, Iwamoto I, Hara A, Tabata H, Ito H, Nagata K	4. 巻 51
2. 論文標題 Biochemical and morphological characterization of a guanine nucleotide exchange factor ARHGEF9 in mouse tissues.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Histochem. Cytochem.	6. 最初と最後の頁 119-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.18009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito H, Morishita R, Mizuno M, Kawamura N, Tabata H, Nagata K	4. 巻 40
2. 論文標題 Biochemical and morphological characterization of a neurodevelopmental disorder related mono-ADP-ribosylhydrolase, MacroD2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 278-287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000492271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hamada N, Ogaya S, Nakashima M, Nishijo T, Sugawara Y, Iwamoto I, Ito H, Maki Y, Shirai K, Baba S, Maruyama K, Saito H, Kato M, Matsumoto N, Momiyama T, Nagata K	4. 巻 141
2. 論文標題 De novo PHACTR1 mutations in West Syndrome and their pathophysiological effects.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 3098-3114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awy246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada N, Negishi Y, Mizuno M, Miya F, Hattori A, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Tabata H, Saitoh S, Nagata K	4. 巻 140
2. 論文標題 Role of a heterotrimeric G-protein, Gi2, in the corticogenesis: Possible involvement in periventricular nodular heterotopia and intellectual disability.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J. Neurochem.	6. 最初と最後の頁 82-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.13878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo F.E, Tabata H, Yamagata T, Nagata K	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of a circadian-relevant gene, NR1D1, in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorders.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 43945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inaguma Y, Ito H, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H, Nagata K	4. 巻 49
2. 論文標題 Morphological characterization of Class III phosphoinositide 3-kinase during mouse brain development.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Med. Mol. Morphol.	6. 最初と最後の頁 28-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-015-0116-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuan Q, Yang F, Xiao Y, Tan S, Husain N, Ren M, Hu Z, Martinowich K, Ng J S, Kim P J, Han W, Nagata K, Weinberger DR, H. Je S	4. 巻 80
2. 論文標題 Regulation of BDNF exocytosis and GABAergic interneuron synapse by the schizophrenia susceptibility gene dysbindin-1.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biol. Psychiatry	6. 最初と最後の頁 312-322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopsych.2015.08.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo F E, Kojima K, Nagata K, Iwamoto S, Yamagata T	4. 巻 38
2. 論文標題 Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Brain & Dev.	6. 最初と最後の頁 91-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo F.E, Tabata H, Yamagata T, Nagata K	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of a circadian-relevant gene, NR1D1, in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorders.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 43945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inaguma Y, Matsumoto A, Noda M, Tabata H, Maeda A, Goto M, Usui D, Jimbo F.E, Kikkawa K, Ohtsuki M, Momoi YM, Osaka H, Yamagata T, Nagata K	4. 巻 139
2. 論文標題 Role of Class III phosphoinositide 3-kinase in the brain development: possible involvement in specific learning disorders.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J. Neurochem.	6. 最初と最後の頁 245-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.13832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nagata K
2. 発表標題 Comprehensive analyses of causative genes for ASD with in utero electroporation technique.
3. 学会等名 International Symposium on Autism 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nagata K
2. 発表標題 Comprehensive analyses of RBF1, a causative gene for neurodevelopmental and psychiatric diseases, in the brain development.
3. 学会等名 The 14th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Nagata K
2. 発表標題 Comprehensive analyses of causative genes for ASD with in utero electroporation technique.
3. 学会等名 International Symposium on Autism 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田畑 秀典 (Tabata Hidenori)		
研究協力者	伊東 秀記 (Itoh Hidenori)		
研究協力者	水野 誠 (Mizuno Makoto)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	山形 崇倫  (Yamagata Takanori)		