

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06729

研究課題名(和文) 自閉症児にみられる大脳新皮質発達異常に関与する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neocortical malformation relevant to autism spectrum disorder

研究代表者

川口 大地 (Kawaguchi, Daichi)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：70549518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症の発症早期に見られる解剖学的な異常として、大脳の前方領域が肥大化することが知られている。前方領域は言語機能や社会的行動の調節などを担う領域であり、大脳前方肥大化が自閉症発症に関与する可能性が十分に考えられるが、その関連は明らかになっていない。本研究により、大脳前方肥大と自閉症発症にFgfシグナルが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The neocortex regulates complex cognitive tasks such as sensory perception and higher cognition. Defects in cortical development are believed to cause neurological disorders including autism spectrum disorder (ASD). ASD children often have an overgrowth of the frontal cortex, but the underlying molecular mechanisms responsible for this region-specific overgrowth as well as its pathological relevance remain elusive. In this study, we found that fibroblast growth factor signaling might have a causal role in brain morphological and behavioral alterations relevant to ASD.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：脳・神経 発生・分化 自閉症 大脳新皮質 大脳領野

1. 研究開始当初の背景

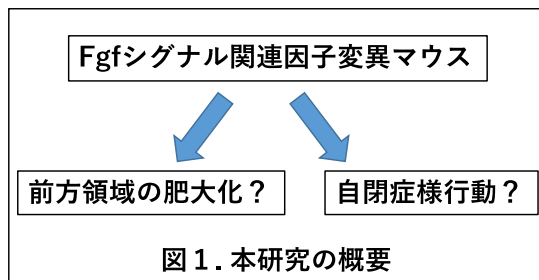
大脳皮質は知覚・記憶・言語・認知・判断といった高次知的機能を有しており、その形成異常は自閉症を含めた様々な神経疾患の原因となっていると考えられている。自閉症は、言語障害・コミュニケーション障害・限定された興味・反復行動などを主徴とする発達障害であり、発症率も子供の1~2%と高く、社会的にも大きな問題となっている。しかし、その発症の原因は殆ど分かっておらず治療法も確立していない。

これまでに、小児期の自閉症患者(自閉症発症早期)に見られる解剖学的な異常として、大脳皮質内の前方領域(前頭皮質など)が特異的に肥大することが報告されている(Courchesne et al., Neuron, 2007; Courchesne et al., JAMA, 2011)。前方領域は言語機能・認知機能・社会的行動の調節などを担う重要な領域であり自閉症発症との直接的な関与が十分に考えられるものの、肥大の原因や自閉症発症との関連については明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、自閉症の原因候補遺伝子が複数含まれる Fgf シグナルに注目し、その異常が大脳前方肥大化と自閉症発症に関与する可能性を考えた。

そこで、Fgf シグナル関連因子の変異マウスを用いて、大脳前方肥大化とそのメカニズムの解析、さらには行動解析を行うことにより、大脳前方肥大化が自閉症様行動を引き起こす機構を明らかにすることを旨として研究を行った(図1)。



3. 研究の方法

(1) Fgf シグナル関連因子変異マウスにおける大脳形成異常の解析

Fgf シグナル関連因子変異マウスの大脳形成に異常が見られるのかについて、以下の方法を用いて解析を行った。

Whole mount in situ hybridization 法
この手法を用いることで、大脳の前領域あるいは後領域を特異的にラベルできる。これにより、領域特異的な肥大の有無を検出することができる。

免疫組織染色法

この手法を用いることで、脳の各領域においてどのような種類の細胞に異常が見られるのかを明らかにすることができる。

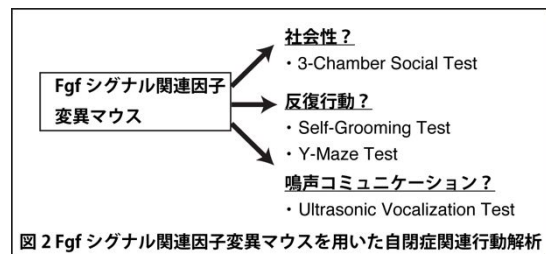
(2) Fgf シグナルが機能する発生時期を明らかにする

Fgf シグナル関連因子を発生時期依存的に欠損させることで、いかなる時期に機能する Fgf シグナルが脳肥大に必須であるのかを解析した。手法としては、異なる発生時期に Cre リコンビナーゼが発現する Cre マウスラインを用いて Fgf シグナル関連因子を欠損させた。

(3) Fgf シグナル関連因子変異マウスにおける行動解析

自閉症関連行動解析

自閉症発症との関与を調べる際に用いられる代表的な行動解析を行い、Fgf シグナル関連因子変異マウスが自閉症様行動をとるのかを検討した(図2)(Peca et al., Nature, 2011; Schmeisser et al., Nature, 2012; Gkogkas et al., Nature, 2013; Rouillet and Crawley, Curr. Top. Behav. Neurosci., 2011)。



・社会性の低下

自閉症モデルマウスにおいて社会性の低下を測定するために多く用いられている 3-Chamber Social Test を用いて社会性のレベルを測定する。

・反復行動の上昇

マウスにおける反復行動の変化は、自身の毛づくろい行動の増減(Self-Grooming Test)とY字型迷路において同じ経路を反復的に選択する度合いの増減(Y-Maze Test)を測定することにより判定する。自閉症モデルマウスはこれらの反復行動が上昇する。

・言語(鳴声)コミュニケーションの低下

マウスは超音波領域の鳴声を使ってコミュニケーションを取っていることが知られている。特に、生後10日目前後のマウスは母親マウスから引き離すと超音波領域の鳴声を使って母親マウスを呼ぶが、自閉症モデルマウスではこの鳴声の頻度が低下する。そこで、この超音波領域の鳴声の増減を測定する Ultrasonic Vocalization Test を行う。

運動機能の解析

運動機能に異常があった場合、上記の自閉症関連行動解析の結果に影響する可能性が考えられる。そこで、運動機能に異常がないかどうかを検討する。運動機能の測定には、歩行距離や歩行速度を測定することのできる Open Field Test、歩行能力を測定することのできる Rotarod Test を行う。

4. 研究成果

(1) Fgf シグナル関連因子の欠損により、大脳前方が肥大する

Fgf シグナル関連因子を欠損したマウスにおいて、Cdh8 による whole mount in situ hybridization を行った。Cdh8 は前方領域である Frontal/Motor areas をラベルできると同時に、後方領域の Primary visual area もラベルすることができるため、どちらの領域が肥大しているのかを解析することができる。その結果、Fgf シグナル関連因子の欠損により、前方領域のみが特異的に肥大することが明らかとなった。

肥大していることが明らかになった前方領域において、どのような細胞腫が増加しているのかをニューロンマーカーなどによる免疫組織染色することにより解析した。その結果、ニューロンが特異的に増加していることが明らかになった。この結果は、自閉症児に見られる表現型と類似した結果と言える。現在、どのサブタイプのニューロンが特に増加しているのかについて、各種サブタイプニューロンマーカーを用いて解析を行っている。

(2) 大脳前方領域肥大は胎生期の早い段階における Fgf シグナルの異常に起因する

Fgf シグナルが機能する発生時期を特定するため、Foxg1-IRES-Cre (胎生 8.5 日頃から大脳において Cre を発現)、Nestin-Cre (胎生 11.5 日頃から中枢神経系において Cre を発現)といった異なる Cre マウスラインを用いて Fgf シグナル関連因子の欠損を行った。その結果、大脳前方領域肥大は Foxg1-IRES-Cre マウスを用いた際にのみ観察された。この結果から、胎生早期(胎生 8.5 日目~11.5 日目頃)に機能する Fgf シグナルが大脳前方肥大に関与することが示唆された。

(3) Fgf シグナル関連因子変異マウスは自閉症様行動を示す

Fgf シグナル関連因子を欠損したマウスにおいて、上述の行動解析を行った。まず、社会性行動を解析するため、3-Chamber Social Test を行なった結果、Fgf シグナル関連因子の欠損により社会性のレベルが低下するこ

とが明らかになった。

さらに、反復行動のレベルを解析するため、Self-Grooming Test、Y-Maze Test を行なった。その結果、Fgf シグナル関連因子の欠損により反復行動が有意に増加することが明らかになった。

言語(鳴声)コミュニケーションのレベルについては現在 Ultrasonic Vocalization Test を行っている。

(4) Fgf シグナル関連因子変異マウスにおいて運動機能に大きな異常は見られない

一定時間あたりの歩行距離、歩行速度を測定するため、Open Field Test を行なった。その結果、Fgf シグナル関連因子を欠損しても有意な変化は見られないことが明らかになった。予備的な結果ではあるが、Rotarod Test についても有意な変化は見られていない。従って、Fgf シグナル関連因子変異マウスにおいて運動機能に大きな異常は見られないことが示唆された。

以上の結果から、Fgf シグナルの異常により、自閉症という疾患の発症を示す可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Daichi Kawaguchi, Dennis O'Leary, Yukiko Gotoh

A mechanism of region-specific neocortical overgrowth relevant to autism spectrum disorder

第 40 回 日本神経科学大会, 2017

Daichi Kawaguchi, Dennis O'Leary, Yukiko Gotoh

A mechanism of region-specific neocortical overgrowth relevant to autism spectrum disorder

EMBO Conference, Gene regulatory mechanisms in neural fate decisions, 2017

Daichi Kawaguchi, Dennis O'Leary, Yukiko Gotoh

A mechanism of autism-related cortical overgrowth at early postnatal stages

第 39 回 日本神経科学大会, 2016

Daichi Kawaguchi, Dennis O'Leary, Yukiko Gotoh

A mechanism of autism-related cortical overgrowth at early postnatal stages

The 10th Annual Meeting for Japanese Developmental Neuroscientists, 2017

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口 大地 (KAWAGUCHI, Daichi)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号：7 0 5 4 9 5 1 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし