

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20243

研究課題名(和文) 味覚障害の解明を目指す基礎研究

研究課題名(英文) Basic research aiming to clarify taste disorder

研究代表者

馬込 卓弥 (Magome, Takuya)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20769731

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)：我々の生活に必須である味覚が障害されると、食事摂取低下を招く危険性がある。初発症状が味覚障害で始まる精神疾患の報告が散見されているが、因果関係を示す基礎研究報告は殆どない。そこで本研究では、味覚障害と精神疾患関連遺伝子との関連性を調べることにより、本障害に寄与する発症メカニズムの解明を目指した。

まず、成体マウスにおいてKIAA2022遺伝子が舌表面・延髄孤束核にも存在することを突き止めた。また、軸索異常が本遺伝子機能低下により生じる事から、グリア細胞における機序解明を行った。その結果、KIAA2022遺伝子を本細胞内でノックダウンすると、コントロール群と比較して種々の変化が認められた。

研究成果の概要(英文)：If the taste essential to our daily lives is impaired, there is a risk of causing a decrease in meal intake. There are reports of mental disorders in which initial symptoms begin with taste disorder, but there are few basic research reports on causality. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of the onset that contributes to this disorder by investigating the relationship between taste disorder and genes related to psychiatric disorders.

First, we found that the KIAA2022 gene is also present in the tongue surface and medullary apophyllar nucleus in adult mice. In addition, as the axonal abnormality is caused by this gene function reduction, the mechanism in glial cells was elucidated. As a result, when the KIAA2022 gene was knocked down in this cell, various changes were observed as compared with the control group.

研究分野：精神疾患

キーワード：味覚障害 精神遅滞 精神疾患 発達障がい グリア細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 発達障がい、様々な社会問題の一因となることが多く解決策を施すことは急務である。その中でも特に精神遅滞を伴う発達障がいの患者では、知能指数の低下に留まらず多岐に渡る臨床症状が見られている。そこで、それぞれの症状に対する適切な治療が必要である。また、発達障がい患者によくみられる合併症に、味覚障害がある。quality of life の支柱である味覚が障害されると食事摂取低下や偏食を招き、さらには生命の危機に関わる状態に陥る可能性があるが、現時点では機序は不明である。

(2) 近年では発達障がいに対して、多くの基礎研究が展開され脆弱性因子の機能解析、さらには各疾患モデル動物による研究も、進みつつある。我々は発達障がいについて分子レベルで解明することを目的とし研究する中で、機能が未知であった X 染色体上に存在する精神遅滞関連因子 KIAA2022 の変異が神経様培養細胞において、細胞接着因子の機能を増強させるだけでなく、細胞遊走を阻害する事を世界で初めて発見、報告した(①) また、本遺伝子をノックダウンさせ機能を抑制させると神経内で突起分岐減少や軸索における異常が報告されている。(②)

(3) 我々はこれらの実験結果より、発達障がい患者の味覚障害の発症に KIAA2022 が関連している可能性が高いと考えている。また、耳鼻咽喉科を受診する味覚障害患者のなかには原因不明であったり難治性の症例も多く、新しい治療法が待たれる。もし我々の解明しようとしている味覚障害発症のメカニズムが健常人でも共通するものであれば、発達障がいのない味覚障害の原因 解明や治療の開発にも発展できる。したがって本研究において、精神遅滞関連因子 KIAA2022 遺伝子の機能を行う事で味覚障害の発症メカニズムの解明を目指したい。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は味覚障害の発症メカニズムの解明である。我々は重度の精神遅滞患者より同定された KIAA2022 がその役割の一端を担っていると考えており、味覚伝導路や神経を中心に本遺伝子の発現や機能を解析することで解明したい。

(2) 従来の味覚基礎研究の中心は味蕾などの末梢感覚組織であったため、より中枢の味覚伝導路における精神遅滞原因遺伝子の関連性は現在まで注目されておらず、この点を鑑みても有用である。さらに神経系においてもこれらの変化がどの様に相互作用しているのかにも視野を広げ多角的に研究する。

(3) 先行研究より KIAA2022 が機能不全等の異常を引き起こすと味覚低下や組織形態

異常が出現する可能性が高い。(③)(④)(⑤) そこで神経系において分子レベルで KIAA2022 をノックダウンすると種々のレベル下において発現が亢進する事も十分に考えられる。例えば、機能低下細胞においては、味覚伝導路の神経分岐異常や軸索減少が出現する可能性が高い。また、中枢の味覚伝導路が障害されることで、味蕾などの末梢の感覚組織の減少や形態変化が出現することが考えられる。味覚障害の発症メカニズムを明らかにする事により、耳鼻咽喉科の中でも原因が特定できない症例が多く、また不明な領域も多い本疾患に対して、打開策を講じたい。(図1)



(図1 本研究の目的)

3. 研究の方法

(1) 野生型の胎生期・幼若・成体マウスの味覚伝導路(舌・顔面神経・舌咽神経・孤束核など)で In situ hybridization および定量 PCR を行う事により KIAA2022 の mRNA の局在と発現量の変化を調べる。この変化を観察することで、味覚伝導路の成熟や維持における KIAA2022 の役割を推定する。

(2) CRISPR/Cas9 法により、KIAA2022 遺伝子のノックアウトマウスを作成する。ノックアウトマウスの胎生期から老齢までの味覚伝導路組織形態を観察することで、KIAA2022 遺伝子の味覚伝導路組織における発達分化および形態維持に及ぼす役割を推定する。また、各種味覚関連分子やレセプターの発現の変化も観察する。

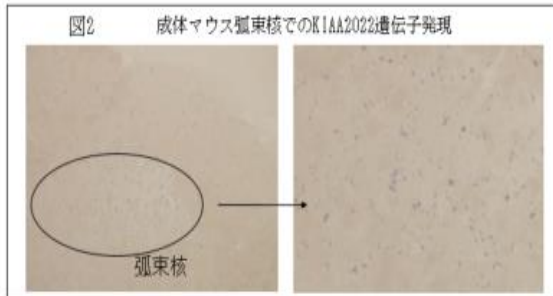
(3) KIAA2022 遺伝子ノックアウトマウスにおける味覚変化の解析を行う。野生型マウスと KIAA2022 ノックアウトマウスの味覚を比較するため、行動実験を用いた味覚検査を行う。また、味覚伝導路の神経そのものの機能解析を行うため、それぞれのマウスの末梢/中枢神経を用いた電気生理学実験を行う。

(4) 味覚障害を併発する疾患は多岐に渡る。統合失調症や精神遅滞等が列挙でき、中枢神経系の異常も報告されている。(⑥) そこで神経系の実験系に落とし込んで本因子の機能解析を行う。定量 PCR を行い mRNA レベル下での変化をはじめ、細胞免疫染色法やウェスタンブロッティング法を用いてタンパク

レベルでも解析を進捗させる。

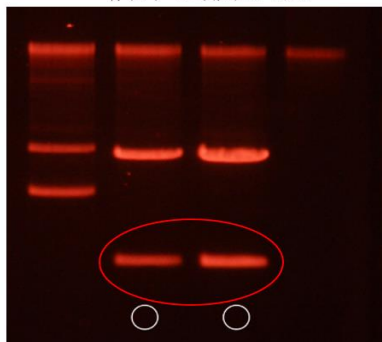
4. 研究成果

(1) 野生型の成体マウスの味覚伝導路である孤束核や舌表面において KIAA2022 の mRNA の局在や発現を In situ hybridization で確かめた。特に延髄孤束核に強く認められている。(図 2)



(2) KIAA2022 遺伝子のノックアウトマウスに関する実験に関しては期間内に、本遺伝子の局在や長腕等に起因されると推定される条件によりノックアウトマウス入手が困難であった。ただ下記に示す様に、本因子のバリエーションが存在する事が上記の実験に関連して見出された。これらが作用をする事により、精神遅滞に対して何らかの症状として表出している可能性も示唆された。(図 3)

図 3 KIAA2022 のバリエーションが存在する可能性がある



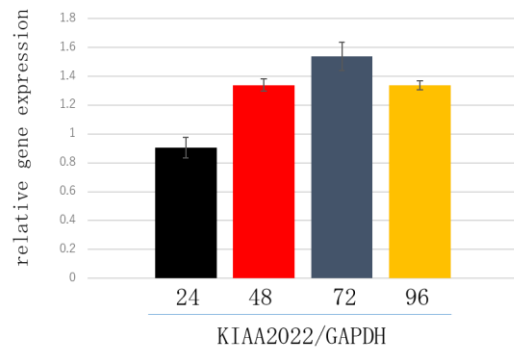
(3) KIAA2022 をノックダウンさせ機能を抑制させると神経での突起進展異常や分岐減少、そして軸索における異常が報告されている事を鑑みて神経系の中でもグリア細胞を用いて本因子の機能解析を行った。特にこれらに参与している oligodendrocyte を中心的に進捗した。また本細胞に関してはラット初代培養を用いた。

① KIAA2022 の発現解析

前駆細胞である oligodendrocyte progenitor cell より oligodendrocyte に培養後分化させた細胞において、分化後どの時間に KIAA2022 が強発現しているかを確かめるために 24h/48h/72h/96h と時間を振り経時変化後の成熟した oligodendrocyte を回収しリアルタイム PCR 法を用いて mRNA 量の変化を見た。すると、その結果本因子は 72h 後に回収した

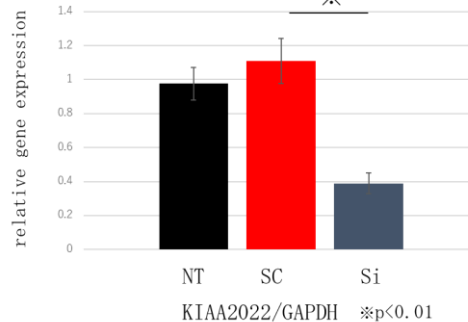
細胞内において発現が強いことが分かった。(図 4)

図 4 72h において KIAA2022 の発現が強い



次に上記の様に強発現を認めた成熟した oligodendrocyte 培養 72 時間後において KIAA2022 をノックダウン (si) し解析を進めた。共にトランスフェクションしないサンプルと si-control とで比較を行った。その結果、用いた条件下における細胞において KIAA2022 の発現が抑制されている事を確認した。(図 5)

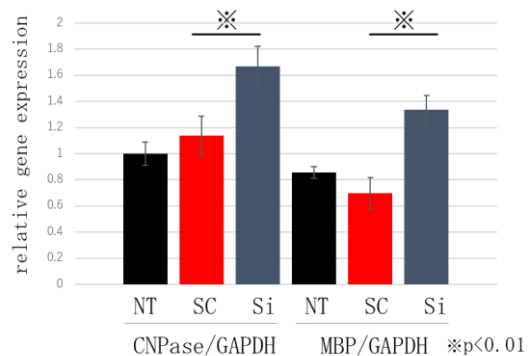
図 5 KIAA2022 発現が抑制 ※



② ミエリン関連因子の発現亢進

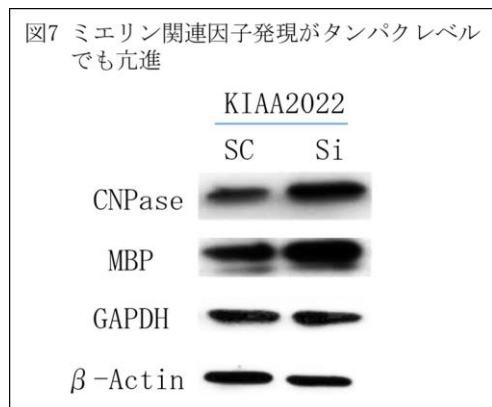
KIAA2022 の発現を抑制させるとミエリン関連因子の CNPase・MBP において mRNA レベルでトランスフェクションしないサンプルと si-control で比較すると発現が亢進される事をリアルタイム PCR 法で確認した。これら Control 群に対して相反する分化亢進が、髄鞘及び軸索に影響を及ぼし、疾患症状が出る可能性が示唆された。(図 6)

図 6 ミエリン関連因子発現が亢進 ※



③ タンパクレベルでの解析

上記の結果を受けて同様に KIAA2022 の発現を抑制させると両ミエリン関連因子の発現亢進がタンパクレベルでも認められるのかを検証するためにウェスタンブロッティング法を用いてミエリン関連因子の機能解析を行った。(図 7) その結果、KIAA2022 発現を抑制する事により、CNPase・MBP 両因子の発現が亢進する事を見出した。



④ 本研究の意義と今後の展望

この様に KIAA2022 を oligodendrocyte 内で発現抑制させると、コントロール群と比較して mRNA やタンパクレベル下においてミエリン関連因子の発現が亢進した。バリエーションの存在する可能性を踏襲しても、やはり本因子が影響を及ぼしていると考えられる。

また、マウスの味覚伝導路である孤束核や舌表面において発現を確かめ、延髄孤束核に強く認められた。

上記の結果や、本遺伝子の機能を抑制させると神経で分岐減少や軸索における異常が報告されている事を鑑みると KIAA2022 遺伝子が、本疾患に関与している可能性も高いと考える。

ただ、本研究は当初、ノックアウトマウスを用いての解析を目的としていた。その点に関して進捗が不足している。今後は是非ともこの点を打開し、多角的なベクトルから精神疾患関連遺伝子と味覚障害をはじめとした感覚異常のメカニズムについて関連性を調べる事とする。

<引用文献>

① XLMR protein related to neurite extension(Xpn/KIAA2022)regulates cell-cell and cell-matrix adhesion and migration.

Magome T,Hattori T et al., Neurochem Int. 63(6):561-569(2013)

② Loss of function of KIAA2022 causes mild to severe intellectual disability with an autism spectrum disorder and impairs neurite outgrowth.

Van MaldergemL, Hou Q, et al. ,Hum Mol Genet. 15;22(16):3306-14(2013)

③ Transient expression of Xpn, an XLMR protein related to neurite extension, during brain development and participation in neurite outgrowth.

Ishikawa T, et al., Neuroscience volume 214, 181-191(2012)

④ Spatiotemporal expression in mouse brain of Kiaa2022, a gene disrupted in two patients with severe mental retardation.

Cantagrel V, et al., Gene Expr Patterns, 9(6):423-9. doi: 10.1016 (2009)

⑤ Disruption of a new X linked gene highly expressed in brain in a family with two mentally retarded males.

Cantagrel V, et al., J, Med Genet. 41(10):736-42 (2004)

⑥ DISC1 (disrupted-in-schizophrenia-1) Regulates differentiation of oligodendrocytes.

Hattori T et ai., Plos One, Feb 7;9(2) :e88506. (2014)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文・学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬込 卓弥 (Magome, Takuya)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20769731