

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：83902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16315

研究課題名(和文)新規自閉症関連遺伝子COPS7A及びPER3の変異による分子病態メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of pathophysiological mechanisms of novel autism-related genes, COPS7A and PER3

研究代表者

野田 万理子(Noda, Mariko)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・分子病態研究部門・研究員

研究者番号：50571311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(ASD)を始めとした発達障害は、遺伝的な疾患と考えられており、臨床遺伝学的な解析の発展により、優に1000を超える原因遺伝子(候補)が報告されている。しかし、これらの遺伝子に見られる様々な異常が、ASDで見られる多様な精神・神経症状や行動異常をどのようにして形成していくのか、すなわち患者個々の遺伝子異常を基にした病態形成メカニズムの解析はあまり進んでいない。本研究では、臨床グループとの連携で見いだされたASDの新規病態関連遺伝子候補であるCOPS7A(核内タンパク質複合体であるシグナロソーム構成分子)、およびPER3(時計遺伝子)が、病態形成に果たす役割を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝学的解析技術の進歩により、疾患原因遺伝子(候補)の同定が進んでいる。一方、高効率の解析手法が無いこともあって、それらの遺伝子の生物学的な研究は大きく遅れている。本研究で解析したCOPS7Aは進化上高度に保存されていることから、その異常は重要な細胞機能に影響を与えられられる。一方、従来のASDの研究では、PER3などの時計遺伝子の異常によって引き起こされる概日リズムの異常とASD病態の関連性はほとんど明らかにされてこなかった。従って本研究でCops7aおよびPer3の機能を包括的に解析したことで、ASD病態研究に新たな視点を生み出す契機になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Autism Spectrum Disorder (ASD) is one of the most prevalent neurodevelopmental disorders, which is highly genetically heterogeneous and may be caused by both inheritable and de novo gene variations. Clinical and genetical investigations have revealed thousands of genes linked to ASD. However, the pathophysiological mechanisms of these gene mutation remain largely unclear, especially in developmental stage.

In this study, we analyzed pathophysiological mechanism of novel autism-related gene candidates, COPS7A (a nuclear protein complex, a signalosome constituent molecule) and PER3 (clock gene). As the result, Cops7a was revealed a crucial regulator in corticogenesis through the regulation of excitatory neuronal migration and maturation. Per3 was found to play a pivotal role in corticogenesis via regulation of excitatory neuron migration and synaptic network formation. Loss-of-function of Per3 was supposed to relate to ASD etiology and clinical features.

研究分野：解剖学、神経発生、神経免疫

キーワード：COPS7A PER3 ASD 神経細胞移動 神経細胞成熟 大脳皮質形成 発達障害

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は社会性・言語やコミュニケーション能力の発達障害、およびパターン化した行動・興味・活動とこだわりを主徴とする発達障害である。ASD を含む発達障害の病態の本質は、大脳皮質発生過程の構造・機能異常と考えられる。哺乳類の大脳皮質は、時間空間的に厳密に制御された神経細胞産生や細胞移動の結果として精緻な6層構造を形成する。正常に配置された神経細胞は、その場所で突起(樹状突起や軸索)を伸ばして成熟し、突起上にシナプスを形成する。そして、「神経細胞の配置」、「神経細胞突起形成・成熟」、「シナプス形成・成熟」の異常の組み合わせや程度によって発達障害の多彩な病態が形成されると考えられる。これまでの発達障害研究は臨床遺伝学的な研究の進展が著しく、既に1000種類以上の“原因遺伝子候補”が報告されている。しかし、ハイスループットな解析手法が無いこともあり、細胞生物学的な病態機能解析は非常に遅れている。現在、「遺伝子異常が蛋白質レベルの異常を介して神経機能の異常を引き起こす分子メカニズム」の解明は非常に重要な課題である。本研究では、臨床グループとの共同研究により見いだされた新たなASDの病態関連遺伝子候補である2つの分子(COPS7AおよびPER3)に着目し、それらの異常とASDの病態形成の関連性を明らかにすることを目的とした。

シグナロソーム (CSN; 細胞外のシグナルが細胞内に伝わる際に機能する情報変換装置) 構成分子の一つである COPS7A は、進化的に高度に保存されており、様々な生命現象に関与している。一方で、ASD 患者死後脳を用いた網羅的 mRNA 発現解析で顕著な発現減少が報告された (Ellis *et al.*, Transl. Psychiatry (2016)) が、その病理学的意義は不明である。このような遺伝学的解析や *in silico* 解析で、COPS7A の発現抑制が発達障害の原因となることが強く示唆されるが、その分子病態メカニズムは全く不明である。一方、ASD の主要な症状の一つに睡眠障害がある。最近、臨床グループとの共同研究により、ASD 患者で時計遺伝子 PER3 にアミノ酸置換を伴うミスセンス変異(p.R366Q)が発見された。興味深いことにこの変異は、PolyPhen-2, SIFT, Mutation Taster 解析で ASD の病態形成に寄与することが確認された。そこで本研究では、“発達障害解析バッテリー”を用いて COPS7A および PER3 の包括的解析を遂行することとした。

2. 研究の目的

“発達障害関連分子の解析バッテリー”を用い、新規発達障害病因遺伝子候補である COPS7A および PER3 が大脳皮質発生に果たす役割、およびその遺伝子異常が大脳皮質形成(特に、神経細胞の移動・局在と形態、軸索・樹状突起伸長と成熟に関して)に果たす役割を解析することで、ASD の病態形成メカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、“発達障害因子の解析バッテリー”を駆使して、1) 新規 ASD 原因遺伝子候補である COPS7A と PER3 が大脳皮質形成に果たす役割、および、2) 疾患で見出された変異に基づく蛋白質機能障害が大脳皮質形成や神経細胞機能の異常を引き起こす分子病態メカニズム、を解析する。

具体的には、マウス胎仔脳を用いた子宮内エレクトロポレーション法 (IUE 法; 子宮内のマウス胎仔の脳室内に遺伝子を注入し、電圧をかけて脳室近くの神経幹細胞に導入する方法)により、*in vivo* で疾患の遺伝子異常を模倣し、大脳皮質神経細胞の移動・形態、軸索伸長、樹状突起の発達、細胞周期への影響、を解析する。さらに、大脳皮質あるいは海馬由来培養神経細胞でも遺伝子異常を模倣し、細胞形態、シナプス形態、生化学・分子生物学的解析、の *in vitro* 解析を行った。

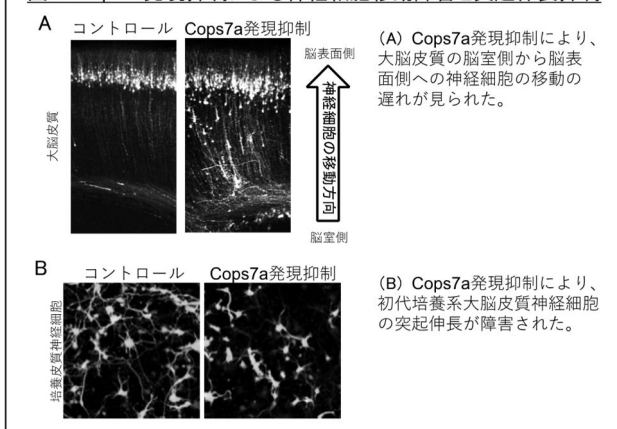
4. 研究成果

1. 大脳皮質発達過程での Cops7a 発現抑制による大脳皮質層形成への影響

マウス脳において、Cops7a は発生の初期段階から一定量発現していた。そこで、Cops7a の RNAi ベクターを作成し、子宮内胎仔電気穿孔法を用いて発現抑制を行なったところ、大脳皮質興奮性神経細胞の配置異常が見られ (図 1A) 神経細胞軸索の進展も抑制された。培養皮質神経細胞では、発現抑制により神経突起の伸長が阻害された (図 1B)。神経幹細胞では、発現抑制により細胞周期の異常を引き起こす事 (細胞周期再侵入の亢進) が明らかとなった。

以上のことから、COPS7A の遺伝子異常 (ハプロ不全など) に伴う発現減弱により、大脳皮質での興奮性神経細胞の配置や形態異常を引き起こし、ASD をはじめとした発達障害の病態に寄与する可能性が示唆された。一方で ASD の病態に関連するシグナル伝達経路との関連を見いだすことができず、病態形成機序の解明に至らなかった。

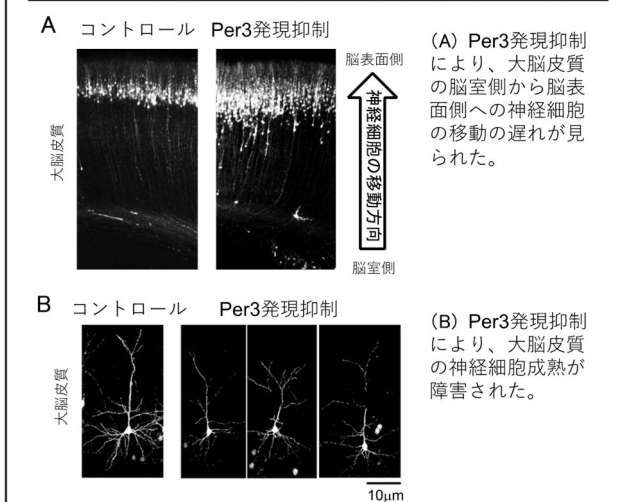
図1 Cops7a発現抑制による神経細胞移動障害と突起伸長抑制



2. Per3 発現抑制による大脳皮質形成過程への影響

まず、*in situ hybridization* により発生期マウス脳での Per3 発現解析を行った。Per3 は発生初期から大脳皮質に発現し、発生が進むに従って次第に発現が強くなるのが明らかとなった。睡眠障害を伴う ASD 患者で見られる PER3 の遺伝子異常はアミノ酸置換を伴う変異 (p.R366Q) であるため、この変異タンパク質を初代培養系神経細胞に発現させ、タンパク質の構造安定性への影響を検討した。その結果、R366Q 変異体タンパク質の発現は神経細胞で著しく低下しており、以後この変異体タンパク質発現状態の模倣には、Per3 発現抑制で代替し得ることが明らかとなった。そこで、胎生 14 日目のマウスで子宮内胎仔電気穿孔法を用い、*in vivo* で RNAi による Per3 発現抑制を行なったところ、生後 2 日目の脳で大脳皮質興奮性神経細胞の配置異常 (図 2A) 軸索伸展などの神経細胞成熟阻害が見られた。また、培養皮質神経細胞で Per3 の発現を抑制したところ神経突起の伸長が阻害された。これらの表現型は RNAi 抵抗性 Per3 蛋白質の共発現により回復した。また、胎生 16 日目の脳スライスを作成し、移動中の神経細胞を共焦点ライブイメージングにより観察したところ、先導突起が複数形成されるなどの形態異常が観察され、それが移動速度の遅延を引き起こし、細胞の配置異常の原因となっていることが示唆された。この配置異常は生後 10 日目になっても引き継がれ、皮質 II/III 層に配置されるべき神経細胞の一部が IV 層へと配置が変化していた。II/III 層に配置された成熟神経細胞の形態を解析したところ、Per3 発現抑制された神経細胞は樹状突起形成が著しく抑制されていた (図 2B)。

図2 Per3発現抑制による神経細胞移動障害と形態異常



以上のことから、Per3 は大脳皮質形成過程の興奮性神経細胞の移動やシナプスネットワーク形成に重要な役割を果たし、さらに Per3 の発現や機能低下によって ASD の病態が引き起こされる可能性が示された。

謝辞

本研究の遂行に当たり、助成を賜りましたことに深く感謝申し上げます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Noda M, Iwamoto I, Tabata H, Yamagata T, Ito H, Nagata K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of Per3, a circadian clock gene, in embryonic development of mouse cerebral cortex.?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 5874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-42390-9	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 Matsunaga Y, Noda M, Murakawa H, Hayashi K, Nagasaka A, Inoue S, Miyata T, Miura T, Kubo KI, Nakajima K.	4. 巻 114
2. 論文標題 Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA.	6. 最初と最後の頁 2048-2053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1615215114	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 Ishizuka K, Tabata H, Ito H, Kushima I, Noda M, Yoshimi A, Usami M, Watanabe K, Morikawa M, Uno Y, Okada T, Mori D, Aleksic B, Ozaki N, Nagata KI	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 野田万理子
2. 発表標題 時計遺伝子Per3の脳皮質形成における機能解明.
3. 学会等名 名古屋大学脳とこころの研究センター 第4回拡大ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田 万理子、岩本 郁子、田畑 秀典、伊東秀記、山形 崇倫、永田 浩一
2. 発表標題 時計遺伝子Per3の脳皮質形成における機能解明.
3. 学会等名 第51回日本臨床分子形態学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K-I Nagata, M Noda, I Iwamoto, H Ito, H Tabata
2. 発表標題 Role of Per3, a circadian clock gene, in brain development
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A Miyauchi, M Noda, A Matsumoto, M Goto, K Kojima, H Osaka, E Jimbo, K Nagata, T Yamagata
2. 発表標題 Circadian-relevant gene PERIOD3 is related to autism spectrum disorder and has function neuronal development
3. 学会等名 ASHG 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nagata K, Noda M, Iwamoto I, Mizuno M, Tabata H, Yamagata T.
2. 発表標題 Pathophysiological significance of a missense mutation of PER3, a circadian clock gene, in autism spectrum disorders.
3. 学会等名 Gordon Research Conference "Fragile X and Autism-Related Disorders" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田 万理子、岩本 郁子、水野 誠、田畑 秀典、山形 崇倫、永田 浩一
2. 発表標題 Pathophysiological significance of a missense mutation of PER3, a circadian clock gene, in autism spectrum disorders.
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noda M
2. 発表標題 Role of COPS7A, a COP9 signalosome subunit, in the brain development.
3. 学会等名 NAGOYAグローバルリトリート
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 野田 万理子, 下島 圭子, 山本 俊至, 永田 浩一
2. 発表標題 疾患iPS細胞のマウス胎仔脳への移植による脳形成過程への影響.
3. 学会等名 神経組織培養研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所 分子病態研究部門
<https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hattatsu/departement/index4.html>
 発達障害研究所神経制御学部
<http://www.inst-hsc.jp/d-molecular/index.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------