様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月 １６ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８Ｋ０６４７７

研究課題名（和文）自閉症早期にみられる領域特異的な大脳新皮質肥大のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of region-specific 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）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：自閉症の発症メカニズムの多くは解明されていない。これまでに、自閉症児において大脳の局所領域が一過的に肥大することが報告されている。しかし、局所肥大を担うメカニズムは殆ど不明である。そこで本研究では、局所肥大を起こすメカニズムを明らかにすることを目指した。独自に開発した脳局所肥大モデルマウスの解析を行った結果、胎生期の異常が脳肥大や自閉症様行動の原因となっている可能性を示唆する結果が得られた。また、肥大領域において興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの神経活動のバランスに異常が見られることが明らかとなった。さらに、肥大マウスにおける胎生早期の大脳領域特異的な遺伝子発現の異常を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究により、脳局所肥大モデルマウスにおいて興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの活動バランス（E/Iバランス）の異常が見られた。E/Iバランスの異常は自閉症患者においても観察されており、肥大が原因となって活動異常が起こっている可能性が示唆された。また、脳局所肥大を伴う自閉症の発症メカニズムの一旦として、胎生期の局所的遺伝子変化が重要な役割を果たす可能性が示唆された。これまでの研究では、生後の自閉症症状を担う分子メカニズムが主に解析されてきたが、本研究により胎生期の異常が重要であるという可能性が新たに考えられた。

研究成果の概要（英文）：Mechanisms of autism pathogenesis remain to be elucidated. Previous reports have shown that transient overgrowth in specific regions of neocortex is observed in autistic children. However, the mechanisms responsible for the region-specific cortical overgrowth remain largely unknown. In this study, we aimed to elucidate the mechanisms responsible for the autism-related cortical overgrowth. We developed and analyzed a mouse model of rostral cortex overgrowth, and the results suggest that abnormalities in the early embryonic period may be the cause of region-specific cortical overgrowth and autistic-like behaviors. In the enlarged cortical region, the balance of neuronal activity between excitatory and inhibitory neurons (E/I balance) was impaired. Furthermore, we found that gene expression profile in the enlarged brain region was different between wild-type and mice with rostral cortical overgrowth.

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　前頭前野

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム(Autism Spectrum Disorder, ASD)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る。自閉症発症率は子供の 50-100 人に 1 人と高く、社会的にも大きな問題となっている。しかし、その発症原因について多くは不明である。これまでに、小児期自閉症患者（自閉症発症早期）に見られる解剖学的な異常として、大脳の局所的な肥大化（前頭前野などに肥大が見られる）が報告されている(Courchesne et al., Neuron, 2007; Courchesne et al., JAMA, 2011)。また、新生児の脳の肥大パターンを調べることで自閉症を発症するかを予測できるという報告もなされた(Hazlett et al., Nature, 2017)。しかし、これまでの報告は相関性を示しているのみで、「脳の局所肥大が自閉症発症の原因となっているのか」「もし脳局所肥大が自閉症発症の原因なら、いかなるメカニズムで貢献しているのか」については不明である。

２．研究の目的

上述の問題について明らかにするためには、モデル動物を用い、脳の局所肥大に関わる遺伝子変異が自閉症の原因になりうるかを探るというストラテジーが考えられる。本研究では、独自に開発した脳局所肥大型自閉症マウスモデル（大脳前方肥大と自閉症様行動を示すマウス）を用いて、どのような異常が自閉症行動に繋がるのかを明らかにすることを目指した。そこで、脳局所肥大型マウスにおける脳構造ならびに活動パターンがいかなる異常を示しているのかを検討し、さらにどのような分子の異常が肥大や自閉症様行動に貢献しているのかについて検討することを本研究の目的として研究を行った（図１）。

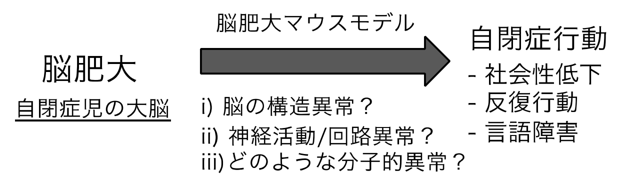

図１．肥大に伴うどのような異常が自閉症行動に繋がるのか？

３．研究の方法

3-1．肥大領域において増加している細胞種を明らかにする。

これまでの報告から、前頭前野が肥大している自閉症児においてニューロンが増加していることが明らかにされている。さらに、本研究で用いている脳局所肥大モデルマウスにおいても同様に生後のニューロン数（ニューロンマーカーNeuN 陽性細胞数）が増加することが示唆されていた。本研究ではさらに、前頭前野領域においてどのようなニューロンサブタイプが増加したのかについて検討するため、サブタイプマーカーを用いてその数を調べた。

3-2．脳局所肥大モデルマウスにおいて神経活動に異常が見られるのかを明らかにする。

上述の実験から細胞構成比に変化があったニューロンに特に注目し、前頭前野内における神経結合について脳局所肥大モデルマウスにおいていかなる異常があるかを検討した。

3-3．脳局所肥大モデルマウスにおいて、どのような領域においてどのような分子的異常が見られるのかを明らかにする。

自閉症児や脳局所肥大モデルマウスは生後初期に脳肥大が見られるため、肥大の原因は胎生期の神経幹細胞の増殖に起因する可能性を考えた。実際にこれまでの結果から、胎生期の早い段階における異常が肥大の原因となっていることが示唆されていた。そこで、胎生期神経幹細胞においていかなる分子的異常が見られるのかを RNA-seq により網羅的に調べた。

４．研究成果

4-1．肥大領域において興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの構成比に異常が見られることが示唆された。

肥大領域におけるニューロンサブタイプを調べるにあたって、自閉症患者において見られている異常として興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの構成比や活動比に異常が見られている点に注目した。そこで、野生型と脳局所肥大モデルマウスの前頭前野領域において各種興奮性ニューロンサブタイプマーカー、抑制性ニューロンサブタイプマーカーの免疫組織染色を行った。その結果、少なくとも興奮性ニューロン全体と抑制性ニューロン全体の構成比が肥大脳において異常を示す可能性が示唆された。今後は、さらなるサブタイプの違いを詳細に解析する予定である。

4-2．脳局所肥大モデルマウスにおいて神経活動のバランス（興奮性-抑制性バランス）に異常が見られた。

興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの構成比に異常が見られることが示唆されたため、脳局所肥大モデルマウスにおいて神経活動の異常が見られる可能性を考えた。そこで、肥大脳領域における神経活動の測定を行った。その結果、興奮性のシナプス入力と抑制性のシナプス入力のそれぞれに異常が見られた。すなわち、神経活動のバランス（E/I バランス）に異常が引き起こされていることが示唆された（図２）。このような神経活動のバランス(E/I バランス)の異常は自閉症患者において観察されており、肥大が原因となって活動異常が起こっている可能性が考えられる。

図２. 肥大マウスの前頭前野において興奮性-抑制性バランス(E/Iバランス)に異常が見られた

4-3．脳局所肥大モデルマウスの胎生期神経幹細胞において遺伝子発現の異常が見られた。

脳局所肥大モデルマウスの異常が胎生期の早い段階の異常、すなわち神経幹細胞の異常に起因する可能性が示唆されていた。そこで、野生型と脳局所肥大モデルマウスにおいて神経幹細胞における遺伝子発現プロファイルの変化を RNA-seq により比較した。その結果、胎生早期の大脳領域特異的な遺伝子発現の変化が明らかになった。

本研究により、局所脳肥大を伴う自閉症の発症メカニズムの一旦として、胎生期の局所的遺伝子変化が重要な役割を果たす可能性が示唆された。これまでの研究では、生後の自閉症症状を担う分子メカニズムが主に解析されてきたが、本研究により胎生期の異常が重要であるという可能性が考えられる。この可能性をさらに検証するため、本研究により見出した分子的異常をマウス胎生早期において再現させることで脳肥大や局所脳活動異常、自閉症様行動が引き起こされるのかを今後検討する予定である。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　4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 Daichi Kawaguchi, Yukiko Gotoh	４．巻 218
２．論文標題 Neurexin nanoclusters: A novel structure at presynaptic terminals	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Journal of Cell Biology	６．最初と最後の頁 2442～2443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201907074	査読の有無 無
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 Yui Imaizumi, Shohei Furutachi, Tomoyuki Watanabe, Hiroaki Miya, Daichi Kawaguchi, Yukiko Gotoh	４．巻 10
２．論文標題 Role of the imprinted allele of the Cdkn1c gene in mouse neocortical development	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 1884
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58629-9	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 後藤昂宏，表伯俊，川口大地	４．巻 Vol.37 No.17
２．論文標題 神経系前駆細胞（放射状グリア）とアストロサイトの多様性	５．発行年 2019年
３．雑誌名 実験医学増刊	６．最初と最後の頁 2822-2827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Utsunomiya Shun、Kishi Yusuke、Tsuboi Masafumi、Kawaguchi Daichi、Gotoh Yukiko、Abe Manabu、Sakimura Kenji、Maeda Kazuma、Takemoto Hiroshi	４．巻 15
２．論文標題 Ezh1 regulates expression of Cpg15/Neuritin in mouse cortical neurons	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Drug Discoveries & Therapeutics	６．最初と最後の頁 55～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2021.01017	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 Naoya Yuizumi, Yujin Harada, Takaaki Kuniya, Takehiko Sunabori, Masato Koikem, Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama, Yutaka Suzuki, Daichi Kawaguchi, Yukiko Gotoh	4．巻 -
2．論文標題 Maintenance of neural stem-progenitor cells by the lysosomal biosynthesis regulators TFEB and TFE3 in the embryonic mouse telencephalon	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Stem Cells	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/stem.3359	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 Omiya Hanae、Yamaguchi Shima、Watanabe Tomoyuki、Kuniya Takaaki、Harada Yujin、Kawaguchi Daichi、Gotoh Yukiko	4．巻 11
2．論文標題 BMP signaling suppresses Gemc1 expression and ependymal differentiation of mouse telencephalic progenitors	5．発行年 2021年
3．雑誌名 Scientific Reports	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79610-6	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3件（うち招待講演　1件／うち国際学会　2件）

1．発表者名 Daichi Kawaguchi, Nobuto Watanabe, Yukiko Goto
2．発表標題 A mechanism of region-specific neocortical overgrowth relevant to autism spectrum disorder.
3．学会等名 第19回蛋白質科学学会・第71回日本細胞生物学会 合同年次大会（招待講演）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Daichi Kawaguchi
2．発表標題 Brain overgrowth and Autism
3．学会等名 Cutting Edge in Life Science（国際学会）
4．発表年 2018年

１．発表者名 Daichi Kawaguchi, Dennis O'Leary and Yukiko Gotoh
２．発表標題 A mechanism of region-specific neocortical overgrowth relevant to autism spectrum disorder
３．学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience（国際学会）
４．発表年 2018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

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