

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21464

研究課題名(和文)社会行動制御に関わる神経細胞の単一細胞レベルの解析及びその活動操作の基盤技術開発

研究課題名(英文) Single-cell analysis of neurons involved in social behavior and the development of technology for manipulating its activity

研究代表者

中澤 敬信 (Nakazawa, Takanobu)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：00447335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：自閉スペクトラム症の病態の分子メカニズムは不明な点が多く残されており、多数の患者を説明できる明確な分子病因は同定されていない。本研究では、社会行動の制御に関わる神経細胞の機能解析、および社会行動を制御する神経回路の同定を目的としている。研究期間中に以下のことを明らかにした。自閉スペクトラム症モデルマウスであるPOGZ点変異マウスの社会行動異常がオキシトシンにより回復することを明らかにした。POGZがオキシトシン受容体遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を制御していることを明らかにした。社会活動により活性化したマウス前帯状皮質神経細胞の活動が社会性制御に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉スペクトラム症は社会的関係等に障害が認められる頻度が高い神経発達障害の1つであり、その解決が求められているが、病態の分子メカニズムはほとんど不明であり、多数の患者を説明できる明確な分子病因は同定されていない。本研究により、自閉スペクトラム症の中核症状である社会的関係の障害の分子病態の一端を単一細胞レベルで明らかにすることができた。本研究の成果は、自閉スペクトラム症の治療を可能にする戦略の構築に資するものであり、社会的急務の中核疾患の解決を加速する点で学術的・社会的意義が大きいものである。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanisms of the pathogenesis of autism spectrum disorders are largely unknown. To date, the certain molecular etiology has not been identified that can explain a large number of patients with autism spectrum disorders. The aim of this study was to analyze the neuronal functions involved in the control of social behavior and to identify the neural circuits that regulate social behavior. During the study period, the following results were identified. (1) We found that oxytocin restores abnormal social behavior in POGZ mutant mice, a mouse model of autism spectrum disorder. (2) We found that POGZ binds to the promoter of the oxytocin receptor gene and regulates its expression. (3) We found that the activity of anterior cingulate cortex neurons activated by social activities is important for the regulation of social behavior in mice.

研究分野：分子神経科学

キーワード：自閉スペクトラム症 社会行動 疾患モデルマウス 単一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症の中核症状の1つである社会性障害のメカニズムは不明な点が多く残されており、その解明が待たれている。近年、マウス個体の行動を制御している特定の神経回路研究がさかんに行われてきており、眼窩前頭皮質では社会行動と摂食行動を制御する回路が別個に存在し、それらに機能的な相関があることが明らかになっている。また、前頭前皮質では、それぞれの神経回路の活性化のタイミングが社会活動制御に重要であることが明らかになっている。しかし、それらの神経回路を構成する個々の神経細胞の特異的な特性の違いについて解析した報告はあまりなく、社会活動制御のメカニズム、及びその障害による(マウスの)社会行動異常発現のメカニズムは不明な部分が多く残されている。

2. 研究の目的

我々は、社会性障害の分子病態を明らかにすべく、稀ではあるが病態に直結する効果サイズが大きいと考えられる変異に関する分子病態解析を推進してきた。世界的なデータベースでトップランク 25 遺伝子のうちの1つであり、疾患との関連性が強く示唆されている POGZ 遺伝子については、POGZ 点変異導入マウスにおいて、神経細胞の発達異常や、社会行動の異常といった自閉スペクトラム症様の異常を見いだしている (Matsumura et al., Nature Commun, 2020)。さらに、脳全体の単一細胞レベルの神経活動マッピングにより、POGZ 変異マウスにおいて、社会活動時に前帯状皮質のごくわずかな神経細胞が過剰に活性化していることが明らかになった (Matsumura et al., Nature Commun, 2020)。我々は、①空間的には近接しているのに、社会活動時に活性化する神経細胞と活性化しない神経細胞のどこに違いがあるのか?②活性化した神経細胞の活性の操作で個体の社会行動を制御することは可能なのか?③疾患モデルマウスで過剰に活性化している極少数の神経細胞の特性は何か?またその操作で社会行動異常を回復させることはできるのか?という点を解析することが、脳機能およびその破綻による精神疾患の分子メカニズムを明らかにするうえで重要であると考え、本研究を実施した。

3. 研究の方法

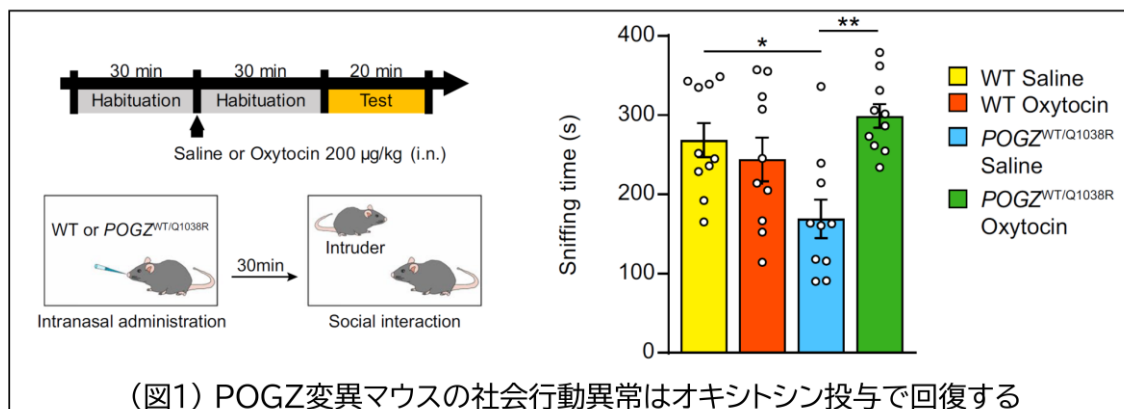
本研究では、疾患との関連性が強く示唆される POGZ 遺伝子の変異を導入して作製した妥当性の高いヒト型自閉症モデルマウスと活性化した神経細胞を可視化可能な Arc-dVenus マウスを掛け合わせたマウスを用いる。野生型マウスと比較して、社会活動後に最も過剰に神経活動が亢進している前帯状皮質の神経細胞の単一細胞レベルの解析を実施し、POGZ 変異マウスにおいて特異的に過剰に活動している神経細胞の RNA 発現特性を明らかにする。特異的に異常発現する遺伝子群のプロモーター活性を利用し、POGZ 変異マウス等の疾患モデルマウスの社会行動異常を回復させることをめざす。

(1) 社会活動時に活性化する神経細胞の特性解析: 単独で飼育していた野生型マウスを同じケージに入れることにより社会活動刺激を導入し、その後、Arc プロモータ下流の Venus の輝度を指標にして、社会活動時に活性化した神経細胞を同定する。前帯状皮質の神経細胞のうち、社会活動時に活性化する一部の神経細胞の特性を明らかにする。同様の解析を POGZ 変異マウスでも実施し、野生型マウスにおける遺伝子発現情報を参考にし、POGZ 変異マウスにおいて過剰に活性化している少数の神経細胞の特性を明らかにする。

(2) POGZ 変異マウスの過剰に活性化する神経細胞の活動を抑制し、社会活動異常を回復させる：遺伝子発現解析で同定した POGZ 変異マウスにおいて異常に活性化した神経細胞の特異的発現遺伝子のプロモーター活性および *Arc* プロモーター活性等を利用し、POGZ 変異マウスの社会行動時に異常に活性化する神経細胞においてのみ人工受容体 (DREADD) を発現させるアデノ随伴ウイルス群を作製する。この際、Cre や Flp などの複数の組み換え酵素、タモキシフェン誘導型 Cre-ER (タモキシフェンの濃度の検討など)、必要に応じて Fos-CreERT2 を発現する TRAP2 マウス等を用いて、発現の特異性を達成する。POGZ 変異マウスにおける過剰活性化神経細胞の活動を抑制することにより、社会活動異常を回復できることを実証する。

4. 研究成果

(1) POGZ 変異マウスの社会行動異常のメカニズムを明らかにし、社会行動時に活性化する神経細胞の特性を解析することを目的として、社会行動制御に関与しているオキシトシンを用いた薬理行動学実験を実施した。その結果、オキシトシンの投与により、POGZ 変異マウスの社会行動異常が回復することが明らかになった (図1; Kitagawa et al., *Molecular Brain*, 2021 を改変)。引き続き、その分子病態解析を推進し、POGZ 変異マウスでは、オキシトシン受容体の発現量が低下していることが明らかになった (Kitagawa et al., *Molecular Brain*, 2021)。一方で、オキシトシン産生神経細胞には異常がみられないことが示唆された。POGZ の機能については、不明な点が多く残されているが、そのアミノ酸配列から転写調節に関与していることが示唆されており、POGZ がオキシトシンシグナルを直接的に制御している可能性を検討した。POGZ 抗体を用いた ChIP 解析の結果、POGZ がオキシトシン受容体遺伝子のプロモーター領域に結合していることが明らかになった (Kitagawa et al., *Molecular Brain*, 2021)。これらの結果は、POGZ がオキシトシン受容体の発現を調節することにより、社会行動制御に関与していることを示唆しており、POGZ 変異マウスの社会行動異常の分子基盤の一端を明らかにすることができた。



(2) これまでの研究で、POGZ 変異マウスの社会行動異常は前帯状皮質領域のごく少数の神経細胞の過剰な活性化が原因であることが示唆されている (Matsumura et al., *Nature Commun*, 2020)。前帯状皮質領域のごく少数の神経細胞の過剰な活性化と社会行動異常との関連性を解析することを目的として、神経細胞の活動の操作実験を実施した。具体的には、社会行動により活性化された前帯状皮質領域の神経細胞の活動を DREADD 法を用いて抑制した。その結果、野生型マウスにおいては、社会行動により活性化された前帯状皮質神経細胞の活動を抑制することにより、社会行動が大きく低下することが明らかになった。この結果は、前帯状皮質の一部の神経細胞の活動が社会行動制御に重要であることを示唆している。POGZ 変異マウスを用いて同様の実

験をしたところ、社会行動に変化が見られなかったことから、社会行動により活性化された前帯状皮質神経細胞をさらに詳細に調べ、その特性により神経細胞を分類していくことが必要であることが明らかになった。

本研究により、不明な点が多く残されている社会行動制御のメカニズムおよびその破綻による自閉スペクトラム症の分子病態の一端が明らかになった。本研究の成果は、神経発達障害である自閉スペクトラム症の病態を「大人になった後でも」治療を可能にする戦略にも資するものであり、社会的急務の中核疾患の解決を加速する点で学術的・社会的意義が大きい。

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kitagawa Kohei, Matsumura Kensuke, Baba Masayuki, Kondo Momoka, Takemoto Tomoya, Nagayasu Kazuki, Ago Yukio, Seiriki Kaoru, Hayata-Takano Atsuko, Kasai Atsushi, Takuma Kazuhiro, Hashimoto Ryota, Hashimoto Hitoshi, Nakazawa Takanobu	4. 巻 14
2. 論文標題 Intranasal oxytocin administration ameliorates social behavioral deficits in a POGZWT/Q1038R mouse model of autism spectrum disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00769-8	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 Kawaguchi Chihiro, Shintani Norihito, Hayata-Takano Atsuko, Tsuchiya Soken, Sugimoto Yukihiro, Ichikawa Atsushi, Okuno Yasushi, Urade Yoshihiro, Hirai Hiroyuki, Nagata Kin-ya, Nakamura Masataka, Narumiya Shuh, Nakazawa Takanobu, Kasai Atsushi, Ago Yukio, Takuma Kazuhiro, Baba Akemichi, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Lipocalin-type prostaglandin D synthase regulates light-induced phase advance of the central circadian rhythm in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01281-w	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 Takeuchi Shuto, Kawanai Takuya, Yamauchi Ryosuke, Chen Lu, Miyaoka Tatsunori, Yamada Mei, Asano Satoshi, Hayata-Takano Atsuko, Nakazawa Takanobu, Yano Koji, Horiguchi Naotaka, Nakagawa Shinsaku, Takuma Kazuhiro, Waschek James A., Hashimoto Hitoshi, Ago Yukio	4. 巻 14
2. 論文標題 Activation of the VPAC2 Receptor Impairs Axon Outgrowth and Decreases Dendritic Arborization in Mouse Cortical Neurons by a PKA-Dependent Mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00521	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北川 航平, 松村 憲佑, 馬場 優志, 近藤 百香, 竹本 智哉, 永安 一樹, 吾郷 由希夫, 笠井 淳司, 田熊一敞, 橋本 均, 中澤 敬信
2. 発表標題 オキシトシンの鼻腔内投与はPOGZ-Q1038R点変異マウスの社会性行動異常を改善する
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中澤敬信
2. 発表標題 ヒトiPS細胞技術を用いた精神疾患および発達障害モデルの開発
3. 学会等名 第94回 日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中澤敬信
2. 発表標題 疾患iPS細胞を用いた精神疾患の分子病態研究
3. 学会等名 NPBPPP2020 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------	---------