

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21479

研究課題名（和文）多階層オミックス解析による発達障害の発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the etiology of neurodevelopmental disorders through multi-scale omics analysis

研究代表者

笠井 淳司（Kasai, Atsushi）

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：40454649

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）：精神疾患に対する新規機序の創薬開発は長年成功していない。特に、発達障害である自閉スペクトラム症の発症原因が不明であり、既存の背景が極めて乏しく、新たな治療法の開発が急務である。そこで本研究では、発達障害の発症原因を明らかにするため、大脳皮質発生期の誕生日タグ標識法と一細胞レベルの全脳イメージングを組み合わせて、異常な細胞群を同定することを目指した。エピジェネティクス変化により、E13.5に分化する神経細胞の大脳皮質内分布が不均一であることを明らかにした他、興奮性神経細胞よりも抑制性神経細胞の分布が大きな変化をす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

発達障害モデルマウスの脳形成期に生じる脳構造異常の詳細は不明であった。本研究により、大脳皮質の構造異常の詳細が明らかになったことから、今後これまで停滞してきた発達障害の発症メカニズムに迫ることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The etiology of neurodevelopmental disorders, such as autism spectrum disorders, remains unclear, and the current interventions are severely limited. In this study, we aimed to elucidate the etiology of developmental disorders by combining birthdate tagging techniques during the cortical development period with whole-brain imaging to identify abnormal cell populations. Our findings revealed that heterogeneity in the distribution of neurons differentiating at E13.5 within the cerebral cortex, attributed to epigenetic changes. Additionally, we observed significant alterations in the distribution of inhibitory neurons compared to excitatory neurons. These findings contribute to future drug discovery research therapeutic target for neurodevelopmental disorders.

研究分野：神経薬理学

キーワード：自閉スペクトラム症 全脳 fate mapping

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

発達障害の一つである自閉スペクトラム症(ASD)を含む精神疾患の総社会負担は甚大であり、世界保健機構(WHO)による世界疾患負担の第2位である。日本での生涯有病率も約25%と高く、薬物による治療満足度も低い。この現状にも関わらず、巨大製薬企業は精神疾患研究から撤退しており、精神疾患の新たな治療標的を見出す研究が必要とされている。特にASDでみられるコミュニケーション障害の治療は、既存の施策が極めて乏しく、医療ニーズが高い。

ASD発症リスクの環境要因として、遺伝子発現変動やDNAメチル化状態に影響する妊娠時ウイルス感染や低酸素が知られている。特に、胎生期のヒストン修飾などのエピジェネティクスの変化は、大脳皮質の正常な構造や回路形成に影響し、脳機能障害や社会性行動障害を引き起こすと考えられる。そのため、大脳皮質発達におけるエピジェネティクス変化の影響の解明は、ASD発症機序の理解に繋がると考えられる。一方で、ASDの主な症状である社会性行動の異常に繋がるエピジェネティクスの変化には、胎生(E)12.5日齢付近の短い時間窓があることが知られている。脳発生期の個々の神経細胞の大脳皮質移動は、極めて不均一であることから、E12.5付近で分化する全ての神経細胞の移動や分布を解析し、VPA投与による影響を理解する必要がある。

### 2. 研究の目的

本課題では、ASDの先制医療・新規治療法の確立に貢献する画期的シーズを創出するため、E12.5のエピジェネティクス変化により最も影響を受ける細胞群を全脳から同定し、個々の細胞特性を計測する斬新な方法論を確立する。そこから見出される神経基盤を基に、ASD発症のメカニズムを明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

実験には、野生型CD-1系統の妊娠マウスとその仔マウス(雄性・雌性)を用いた。飼育環境は室温(22±1)、照明12時間(8時~20時)とし、固形飼料と水を自由に摂取できるように与えた。なお、動物の飼育・実験は、大阪大学動物実験規定に基づき、大阪大学動物実験委員会の承認を得て行った。

妊娠12.5日のマウスに、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害作用を有するバルプロ酸ナトリウム(VPA, 500 mg/kg)を投与し、その後、FlashTag法を用いて胎仔脳のM期細胞を標識した。その後、妊娠18.5日目に胎仔を灌流固定した。脳を摘出後、全脳イメージングを行い、各脳領域の陽性細胞の座標データから大脳皮質表面までの距離を算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) HDAC阻害によるE13.5およびE14.5標識細胞の大脳皮質分布への影響

胎仔脳には、細かな脳領域の分化が進んでいないため、E18.5脳を前帯状皮質、運動皮質、体性感覚皮質、脳梁膨大後部皮質、視覚皮質に分割し、各皮質領域内のE13.5標識細胞から大脳皮質表面までの最短距離を測定した。

前帯状皮質では、対照群とVPA群の両方とも、大脳皮質表面から360µmまでの層に95%以上の標識細胞が分布していた。対照群と比較して、VPA群ではI層を含む120~180µmの標識細胞の割合が有意に減少し、I層に相当する0~60µmの標識細胞の割合が有意に増加していた。運動皮質や視覚皮質においては、両群ともほとんどの標識細胞が0~300µmに分布していたも

この、両群間に有意な差はみられなかった。体性感覚皮質において、両群とも0~240  $\mu\text{m}$  に90%以上の標識細胞が分布し、120~180  $\mu\text{m}$  にピークがみられた。しかしながら、VPA群の割合は有意に減少しており、層付近に相当する300~360  $\mu\text{m}$  の標識細胞の割合が有意に増加していた。脳梁膨大後部皮質では、対照群のE13.5標識細胞の分布は120~180  $\mu\text{m}$  がピークであったのに対し、VPA群では180~240  $\mu\text{m}$  にピークが移行し、60~120  $\mu\text{m}$  の標識細胞の割合が有意に減少した。

次に、E18.5大脳皮質におけるE14.5標識細胞の分布を解析した。E13.5標識細胞の分布と異なり、E14.5標識細胞は対照群とVPA群の両方において領域によらず60~120  $\mu\text{m}$  で50~65%のピークを示し、ほとんどの標識細胞がI層相当に分布していた。しかしVPA曝露により、脳梁膨大後部皮質の60~120  $\mu\text{m}$  のE14.5標識細胞の割合だけが有意に減少しており、他の4つの領域では有意な差は見られなかった。

これらの結果より、胎生期VPA曝露による大脳皮質の層構造への影響は、エピジェネティクスの影響は、E13.5日の脳内においても領域毎に異なること、また、脳梁膨大後部皮質は持続して影響を受けることが明らかになった。

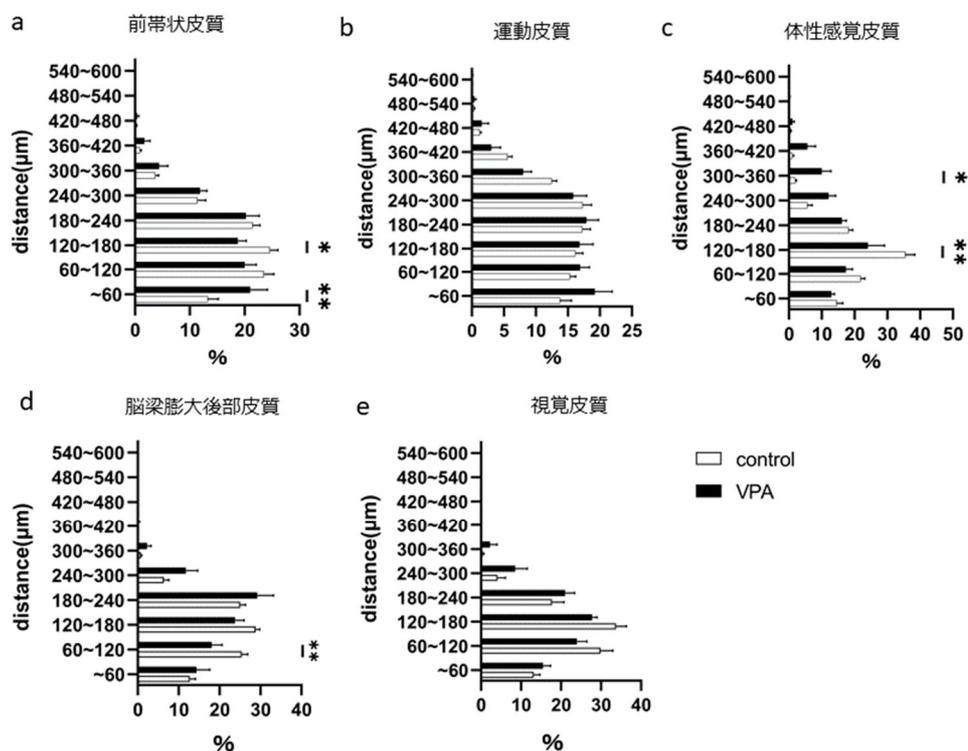


図. E13.5 標識細胞の大脳皮質分布におけるVPA曝露の影響.

一方で、3次元全脳画像解析から、VPA群の脳は対照群より小さいことも明らかになった。このことから、より正確に神経細胞の分布を個体間で比較するためには、大脳皮質3次元データの標準化が求められる。現在、マウス成体脳ではAtlasを用いて標準化し脳領域や層構造毎の細胞数等を解析できる。しかしながら、胎仔脳のAtlasは成体脳のように明確に領域の境界が示されたものはなく、未だ標準化の方法が確立できていないのが現状である。今後これらの解析方法が確立し、大脳皮質発生メカニズムとその異常のメカニズムの理解が進むことで、発達障害の発症機序が明らかになることを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Niu M, Kasai A et al	4. 巻 8
2. 論文標題 Clastrum mediates bidirectional and reversible control of stress-induced anxiety responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabi6375
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 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 Yoshinaga Satoshi, Shin Minkyung, Kitazawa Ayako, Ishii Kazuhiro, Tanuma Masato, Kasai Atsushi, Hashimoto Hitoshi, Kubo Ken-ichiro, Nakajima Kazunori	4. 巻 24
2. 論文標題 Comprehensive characterization of migration profiles of murine cerebral cortical neurons during development using FlashTag labeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102277 ~ 102277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102277	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Atsushi Kasai et al
2. 発表標題 Whole-brain activation mapping and connectivity using activity-dependent genetic labeling sheds light on a new node in stress circuitry
3. 学会等名 EMBL symposium; Seeing is believing (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠井淳司
2. 発表標題 マルチスケール脳解析から紐解く脳機能
3. 学会等名 第5回FUJITAブレインサイエンスセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠井淳司
2. 発表標題 ストレスによる不安関連行動を制御する新たな神経回路
3. 学会等名 2021年度生理学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kasai et al
2. 発表標題 Whole-brain activation mapping and connectivity using activity-dependent genetic labeling
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kasai
2. 発表標題 高精度全脳イメージングから読み解く情動制御系回路
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------