

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：83902

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21589

研究課題名（和文）遺伝子異常を原因とする発達障害におけるアストロサイトの病態意義の解明

研究課題名（英文）Pathophysiological significance of astrocyte in developmental disorders with gene abnormalities

研究代表者

永田 浩一（Nagata, Koh-ichi）

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・部長

研究者番号：50252143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：アストロサイトは神経回路の発達・機能形成に重要な役割を果たす。遺伝子異常が生じた場合はニューロン同様に機能障害を受け、発達障害の病態形成に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、膨大な遺伝学的データが蓄積される一方、数少ない病態メカニズム研究はニューロンに集中し、アストロサイトを含むグリア細胞の分子病態意義は殆ど不明なままである。

本研究は、申請者らが独自に構築した「ニューロンにおける発達障害責任遺伝子のin vivo/vitro病態解析バッテリー」を土台にして「アストロサイト発達障害解析バッテリー」を新規に構築し、発達障害をアストロサイトの機能障害と云う視点から解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳機能におけるアストロサイトの重要性が大きくクローズアップされ、その形態・機能異常が病態形成に関連する可能性も高い。しかしながら、これまで、アストロサイトの機能異常に焦点を当てた発達障害の分子病態メカニズム解析は殆どされていない。アストロサイトに着目してin vivo/in vitro解析バッテリーを構築し、発達障害の病態メカニズムを新規の観点から捉え直す点で、本企画の学術的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：Astrocytes are the most abundant cell type in mammalian brains. They play essential roles not only in physiological functions, but also in the neural network formation through regulating synaptogenesis and synapse elimination during the cortical development and maturation, suggesting that their functional deficits may cause neurodevelopmental disorders. Despite their potential importance, how astrocytes are involved in pathophysiology of neurodevelopmental disorders are poorly understood. In this study, we have developed a analytical battery for astrocytes. With this battery, we recapitulated haploinsufficiency conditions of RBF1 and NR1D1 genes in astrocytes. We then analyzed the knockdown effects of these genes on astrocytes per se and surrounding cortical neurons.

研究分野：小児発達障害

キーワード：アストロサイト 発達障害 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

自閉性障害(ASD)や知的障害(ID)などの発達障害は人口の約 10%に発症し、遺伝学的解析により、1000 以上の発達障害責任遺伝子(候補を含む)が報告されている。病態の本質は、神経シナプスの機能障害を基盤とする大脳皮質発達障害とされる。一方、最近の研究から、従来はニューロン機能を支える裏方と考えられてきたグリア細胞(アストロサイトなど)の異常も、発達障害の病態形成に必須の役割を果たすことが確認されている。

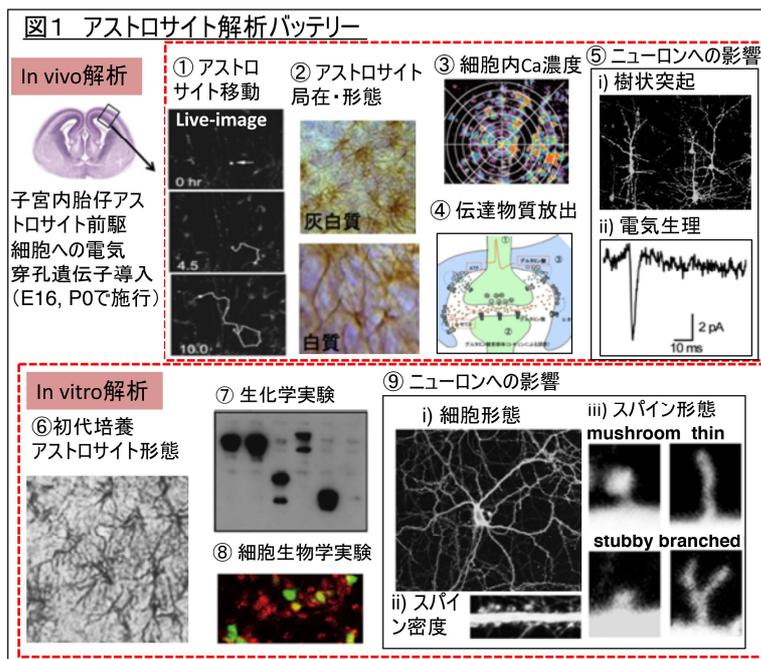
アストロサイトは細胞膜受容体やイオンチャンネルを発現し、生理活性物質や化学伝達物質の放出機能も有する。したがって、神経回路の発達・機能形成に重要な役割を果たすと共に、遺伝子異常の場合はニューロン同様に機能障害を受け、発達障害の病態形成に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、膨大な遺伝学的データが蓄積される一方、数少ない病態メカニズム研究(生化学・形態学・細胞生物学研究)はニューロンに集中し、アストロサイトを含むグリア細胞の分子病態意義は殆ど不明なままである。

2. 研究の目的

私共は、電気穿孔法によるマウス子宮内胎仔脳遺伝子導入法を基軸として「発達障害責任遺伝子の in vivo/vitro 病態解析バッテリー」を独自に構築・運用している。この「バッテリー」を駆使して、大脳皮質形成障害に焦点を当てて、1) 皮質ニューロンおよび海馬歯状回ニューロンの移動・形態・局在(共焦点レーザー顕微鏡ライブイメージングを含む)、2) 軸索伸長、3) 樹状突起発達、4) 細胞増殖、5) マウス行動、6) 電気生理、を in vivo で、さらに、7) 初代培養海馬ニューロンを用いた形態学、8) 生化学、9) 細胞生物学の解析を in vitro で遂行している。本研究は、この「バッテリー」を土台にして「アストロサイト解析バッテリー(図1)」を新規に構築し、発達障害をアストロサイトの機能障害と云う視点から解析し、新規診断・治療法開発の端緒を見出すことを目的とする。

3. 研究の方法

私共は、「発達障害遺伝子の in vivo/in vitro 解析バッテリー」を用いた解析を展開し、ニューロンの機能障害に基づく分子病態メカニズム解明で大きな成果を挙げている。そのノウハウを生かして本研究では「アストロサイト解析バッテリー(図1)」を構築して病態メカニズム解析を行うことを計画した。解析対象としては、ASD や ID の責任遺伝子でアストロサイトにも発現している分子(RBFOX1, NR1D1)を選択・解析した。解析を進める上での具体的な考え方として、遺伝子欠失を RNAi ベクターによる発現抑制により模倣し、下記項目を検討した。



(1) 遺伝子異常を模倣したアストロサイトの in vivo 解析

発達期のマウス脳で RBFOX1 と NR1D1 発現抑制を行い、灰白質と白質に局在予定のアストロサイトで遺伝子異常を模倣する。具体的には、E16(胎生 16 日)で RNAi ベクターを導入し P10(生後 10 日)で固定スライス標本を作成し、遺伝子異常を有するアストロサイトの形態と局在を免疫組織観察する。一方、脳の発達過程ではニューロンの局在化がアストロサイトの分布に先行する。そこで、ニューロンで対象遺伝子の異常を模倣した時に、アストロサイトの分布・形態が受ける影響も解析する。

(2) アストロサイト遺伝子異常がニューロンに及ぼす影響

発達期のマウス脳で RBFOX1 と NR1D1 発現抑制を行い、アストロサイトで遺伝子異常を模倣する。その異常がニューロンの形態や樹状突起形成に及ぼす影響を、胎生期から生後まで経時的に形態観察する。さらに、アストロサイトの遺伝子異常が、大脳皮質ニューロンのシナプス機能 (NMDA 受容体機能、自発発火) に及ぼす影響を、電気生理学的に解析する。

(3) 遺伝子異常を模倣したアストロサイトの in vitro 解析

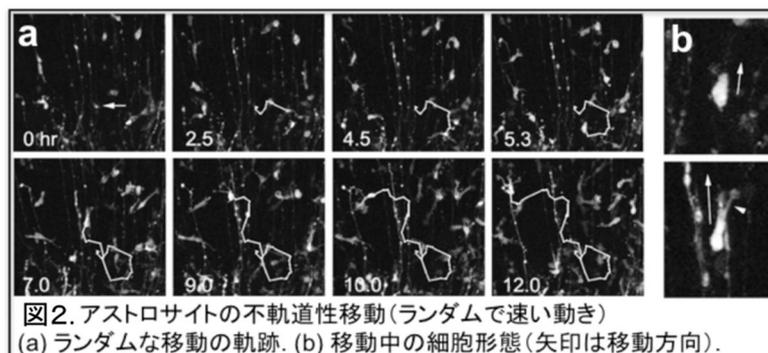
マウス大脳皮質より調整した初代培養アストロサイトの生化学・細胞生物学解析を行う。具体的には、培養開始直前に RNAi ベクターによる発現抑制を行うことで遺伝子異常を模倣し、20 日後に形態解析及び化学伝達物質 (D-セリンとアデノシン) の放出を測定する。次いで、遺伝子異常の模倣が分化・増殖に果たす役割を検証する。さらに、遺伝子異常を模倣したアストロサイトと正常海馬ニューロンを共培養し、アストロサイトの機能障害がニューロンの形態と機能 (特にシナプス形態に着目) に及ぼす影響を免疫組織学的に解析する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子異常を模倣したアストロサイトの in vitro および in vivo 解析

RBFOX1 と NR1D1 発現抑制を行い、固定スライス標本を作成し、RBFOX1 および NR1D1 を発現抑制したアストロサイトの形態と局在を免疫組織観察した。いずれの場合にも、アストロサイトの形態及び局在に顕著な差異は認められなかった。その原因として、RNAi ベクター導入後の観察を P10 に固定したことが考えられる。現在、観察のタイミングを P5 および P30 に広げて表現型を観察中である。一方、ニューロンで RBFOX1 および NR1D1 を発現抑制したアストロサイトの分布・形態についても、P10 の時点では変化がなかった。この解析についても、観察のタイミングを P5 および P30 に広げて解析中である。

一方私共は、共焦点レーザー顕微鏡ライブイメージングで、アストロサイトの移動・形態変化を in vivo 解析してきた。この過程で、アストロサイトがニューロン (単一方向性の直進移動) とは全く異なる高速かつランダムな移動 (不軌道性移動) をすることを見出していた。そこで、RBFOX1 の発現抑制を行い



この移動様式が影響を受けるかどうかを解析した。その結果、移動速度に関しては変化がなかった。ランダムな移動様式にも特筆すべき表現型は得られていない。引き続き例数を増やして観察している。

(2) アストロサイト遺伝子異常がニューロンに及ぼす影響

発達期のマウス脳で RBFOX1 と NR1D1 の RNAi ベクターを E14 で導入し、アストロサイトで発現抑制することで遺伝子異常を模倣した。P10 で脳を固定し、異常がニューロンの形態や樹状突起形成に及ぼす影響を、P0, P3, P7, P30 まで経時的に形態観察した。観察にあたっては、遺伝子異常が模倣されたアストロサイトが接触しているニューロンに焦点をあてた。現在までのところ、いずれの時点においても、異常アストロサイトがニューロンの形態に影響を及ぼす表現型を得られていない。

(3) 遺伝子異常を模倣したアストロサイトの in vitro 解析

マウス大脳皮質より調整した初代培養アストロサイトの生化学・細胞生物学解析を行った。最初に、培養開始直前に RBFOX1 と NR1D1 の RNAi ベクターによる発現抑制を行うことで遺伝子異常を模倣し、20 日後に D-セリンとアデノシンの放出を測定した。しかしながら、これらの化学物質の放出量に有意な変化を生じなかった。その原因として、RNAi ベクターの導入効率が悪く、放出の変化が周辺に存在する正常細胞によってマスクされた可能性が考えられた。現在、導入効率を上げるべく、実験条件を再検討している。次いで、遺伝子異常の模倣が分化・増殖に果たす役割も検証したが、RBFOX1 と NR1D1 の発現抑制はアストロサイトの増殖や分化に影響を及ぼさなかった。さらに、遺伝子異常を模倣したアストロサイトと正常海馬ニューロンを共培養し、アストロサイトの機能障害がニューロンの形態と機能 (特にシナプス形態に着目) に

及ぼす影響を免疫組織学的に解析したが、有意な影響を観察するには至っていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Nishikawa Masashi、Ito Hidenori、Noda Mariko、Hamada Nanako、Tabata Hidenori、Nagata Koh-ichi | 4. 巻 44 |
| 2. 論文標題 Expression Analyses of Rac3, a Rho Family Small GTPase, during Mouse Brain Development | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Developmental Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 49 ~ 58 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000521168 | 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 Noda Mariko、Ito Hidenori、Nagata Koh-ichi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Physiological significance of WDR45, a responsible gene for -propeller protein associated neurodegeneration (BPAN), in brain development | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 22568 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02123-3 | 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 Ito Hidenori、Morishita Rika、Noda Mariko、Ishiguro Tomoki、Nishikawa Masashi、Nagata Koh-ichi | 4. 巻 297 |
| 2. 論文標題 The synaptic scaffolding protein CNKSR2 interacts with CYTH2 to mediate hippocampal granule cell development | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 101427 ~ 101427 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101427 | 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 Hamada Nanako、Iwamoto Ikuko、Nishikawa Masashi、Nagata Koh-ichi | 4. 巻 43 |
| 2. 論文標題 Expression Analyses of Mediator Complex Subunit 13-Like: A Responsible Gene for Neurodevelopmental Disorders during Mouse Brain Development | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Developmental Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 43 ~ 52 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000515188 | 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 Nishikawa Masashi、Ito Hidenori、Noda Mariko、Hamada Nanako、Tabata Hidenori、Nagata Koh-ichi | 4. 巻 54 |
| 2. 論文標題 Expression analyses of PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, during mouse brain development | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology | 6. 最初と最後の頁 146 ~ 155 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-020-00275-1 | 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 Ito Hidenori、Morishita Rika、Noda Mariko、Iwamoto Ikuko、Nagata Koh-ichi | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Biochemical and morphological characterization of SEPT1 in mouse brain | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology | 6. 最初と最後の頁 221 ~ 228 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-020-00248-4 | 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 Hamada Nanako、Ito Hidenori、Shibukawa Yukinao、Morishita Rika、Iwamoto Ikuko、Okamoto Nobuhiko、Nagata Koh-ichi | 4. 巻 529 |
| 2. 論文標題 Neuropathophysiological significance of the c.1449T>C/p.(Tyr64Cys) mutation in the CDC42 gene responsible for Takenouchi-Kosaki syndrome | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 1033 ~ 1037 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.104 | 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 Suliman-Lavie Reut、Title Ben、Cohen YaheI、Hamada Nanako、Tal Maayan、Tal Nitzan、Monderer-Rothkoff Galya、Gudmundsdottir Bjorg、Gudmundsson Kristbjorn O.、Keller Jonathan R.、Huang Guo-Jen、Nagata Koh-ichi、Yarom Yosef、Shifman Sagiv | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Pogz deficiency leads to transcription dysregulation and impaired cerebellar activity underlying autism-like behavior in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nature Communications | 6. 最初と最後の頁 5836 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-19577-0 | 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 該当する |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Hamada Nanako, Iwamoto Ikuko, Kawamura Noriko, Nagata Koh-ichi | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Heterotrimeric G protein, Gi1, is involved in the regulation of proliferation, neuronal migration, and dendrite morphology during cortical development in vivo | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15205 | 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 Nishikawa Masashi, Ito Hidenori, Noda Mariko, Hamada Nanako, Tabata Hidenori, Nagata Koh-ichi | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Expression analyses of PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, during mouse brain development | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-020-00275-1 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 永田浩一 |
| 2. 発表標題 発達障害を観て考える |
| 3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 浜田奈々子、永田浩一 |
| 2. 発表標題 Role of a heterotrimeric G-protein, G i1, regulates neurogenesis, migration and development in cortical excitatory neurons. |
| 3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 永田浩一、浜田奈々子、岩本郁子、河村則子 |
| 2. 発表標題 三量体Gタンパク質GNAI1の発達障害における病態意義 |
| 3. 学会等名 第62回日本小児科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 野田 万理子、岩本郁子、田畑秀典、伊東秀記、永田浩一 |
| 2. 発表標題 Role of WDR45, the autophagy-related gene, in the development of mouse cerebral cortex |
| 3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 伊東秀記、森下理香、野田万理子、永田浩一 |
| 2. 発表標題 X連鎖知的障害関連分子CNK2の性状機能解析 |
| 3. 学会等名 日本臨床分子形態学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 永田浩一、西川 将司、伊東 秀記、野田万理子、 浜田奈々子、田畑 秀典 |
| 2. 発表標題 発達障害責任遺伝子 PLEKHG2 の神経組織における発現解析 |
| 3. 学会等名 日本臨床分子形態学会学術集会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|