

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650077

研究課題名（和文） 自閉症スペクトル新規感受性遺伝子 *Gasc1* を標的とした疾患モデルマウスの解析研究課題名（英文） Studies on mouse model of autism spectrum disorders with mutation in a novel disease susceptibility gene *Gasc1*

研究代表者

鹿川 哲史 (KAGAWA TETSUSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50270484

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒストン脱メチル化酵素をコードする *Gasc1* 遺伝子が自閉症スペクトラム (ASD) の新規感受性 (susceptibility) 遺伝子であることを明らかにした。すなわち *Gasc1* 遺伝子変異による下流標的遺伝子のエピゲノム修飾変化がヒト発達障害の原因である可能性、および本研究に用いた *Gasc1* 遺伝子変異マウスが多動を含むヒト ASD に類した様々な行動異常を呈することから疾患モデルとして極めて有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：In this study we identified *Gasc1* gene, which encodes histone demethylating enzyme, as a novel susceptibility gene for autism spectrum disorders (ASD) by subjecting *Gasc1* mutant mice to a comprehensive behavioral test battery. The *Gasc1* mutant mice showed hyperactive and stereotyped behaviors, and working and reference memory deficits that recapitulated human ASD symptoms. Methylphenidate is the most commonly prescribed psychoactive drug for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), a developmental disorder frequently accompanied by ASD. Methylphenidate restored the hyperactive behavior of the mutant mice, suggesting that human patients and this mutant mouse line have a similar pathogenesis. These results raise the possibility that the abnormal epigenetic modifications caused by *Gasc1* mutation lead to developmental disorders, and the *Gasc1* mutant mice provide a useful animal model to study human developmental disorders including ASD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1400000	0	1400000
2011年度	1500000	450000	1950000
年度			
年度			
年度			
総計	2900000	450000	3350000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：精神・神経疾患の病態と治療・エピジェネティクス

|

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト自閉症は、遺伝的素因の高い発達障害であり、社会的行動障害や反復行動・固執を特徴とする精神疾患である。近年ではアスペルガー障害や Rett 症候群などを含めた自閉症スペクトラムとしても議論され、病因究明と治療法開発が待望されている。最近、ヒト第 9 染色体末端欠失による自閉症症候や SNP アレイを用いた家系連鎖解析が報告され、ヒト 9p24.1 近傍に自閉症スペクトル関連遺伝子の存在が示唆された。我々は 9p24.1 にマップされるエピジェネティクス修飾酵素 *Gasc1* 遺伝子に着目した。*Gasc1* はヒストン H3 の 9 番目のリジン (K9) のトリメチル基を取り除くヒストン脱メチル化酵素である。ヘテロクロマチン構造を解弛し、標的遺伝子発現に可塑性を与えると考えられている。完全な *Gasc1* 遺伝子ノックアウトマウスは胎生致死と予想された。そこで我々は、東京医科歯科大学の稲澤教授の協力を得て *Gasc1* 遺伝子変異マウス (hypomorph) の表現系解析を始めた。*Gasc1* 遺伝子変異マウスの約 40% は生後 20 日前後で致死を示し、その中には自閉症症候に酷似したてんかん痙攣を呈すマウスも観察された。さらに外見上正常と思われた残り 60% のマウスについて、藤田保健衛生大学の宮川教授らの研究協力を得て詳細な行動テストバッテリー解析を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子改変マウスの行動及び神経病理学的解析から、ヒト 9p24.1 にマップされるヒストン脱メチル化酵素 *Gasc1* 遺伝子を自閉症スペクトルの新規感受性遺伝子 (susceptibility gene) として提唱することを目的とする。すなわち、*Gasc1* 遺伝子変異による下流標的遺伝子のエピゲノム修飾変化がヒト発達障害の原因である可能性、および *Gasc1* 遺伝子改変マウスがヒト自閉症スペクトラムを含む発達障害の有用なモデルであることを示す。

## 3. 研究の方法

### (1) *Gasc1* 遺伝子変異マウスの行動バッテリー解析

予備実験段階で *Gasc1* 遺伝子変異マウスには活動量の変化や探索行動の欠如など精神障害様の行動異常が検出された。行動を詳細に解析し数値化するため、宮川教授 (藤田保健衛生大学、生理学研究所) の研究協力を得て行動テストバッテリーテストを行った。実験に用いるマウスとして体外受精により、生後 2 ヶ月令の *Gasc1* 遺伝子変異雄マウス 20 匹と正常雄マウス 20 匹を準備した。行動テストバッテリーテストとして、

ホットプレート試験 (痛覚)、Wire hang 試験、Grip strength 試験、Light/Dark transition 試験、オープンフィールド試験 (活動量と常同行動)、高架式十字型迷路 (不安様行動)、ホームケージ活動記録、Prepulse inhibition 試験、歩行機能試験、強制水泳試験 (うつ様行動)、尾懸垂試験 (うつ様行動)、ローターロッド試験 (運動学習記憶) バーンズ迷路 (空間学習記憶、参照学習記憶) や、T 字型迷路 (作業学習記憶、固執性)、概日リズムを測定した。

### (2) *Gasc1* 遺伝子変異マウスの神経病理学的解析

*Gasc1* 遺伝子変異マウスより、大脳、脳幹小脳を分離してヒストン蛋白質を部分精製し、メチル化ヒストン H3K9 をウエスタンブロットにより定量解析をした。*Gasc1* 遺伝子変異マウスには *Gasc1* 遺伝子プロモーター制御下に  $\beta$  geo 遺伝子が挿入されている。そこで、*Gasc1* 変異遺伝子ホモ接合体とヘテロ接合体における  $\beta$  ガラクトシダーゼの発現を基質である X-gal を反応させ、*Gasc1* 遺伝子発現細胞を同定した。

### (3) メチルフェニデート投与実験

当初研究計画に加えて、*Gasc1* 遺伝子変異マウスが示す顕著な多動症状に着目し、ヒト発達障害の一つである注意欠陥多動性障害の症状緩和の第 1 選択薬であるメチルフェニデートを *Gasc1* 遺伝子変異マウスに投与した。メチルフェニデートはシナプス間隙からドパミンを神経細胞内に再取り込みするトランスポーターをブロックし、シナプス間隙のドパミンの量を増加させることによって多動傾向を軽減すると考えられている。メチルフェニデート投与したマウスをホームケージに戻し、活動期 (暗期) の活動量の変化を測定した。

## 4. 研究成果

(1) *Gasc1* 遺伝子変異マウスには顕著な多動・固執傾向、反復的常同行動、および作業記憶・参照記憶異常などが検出された (図 A ~C)。これらの行動異常は自閉症スペクトラムの中核症状に類似しており、エピジェネティック修飾異常と自閉症スペクトラムの連関が予想される。

(2) 遺伝子トラップベクターに組み込まれた  $\beta$ -geo 遺伝子を指標とした *Gasc1* 発現様式の組織学的解析を行った。*Gasc1* は主にニューロンに発現しており、特に大脳皮質の第 2 層から第 6 層、海馬アンモン角や

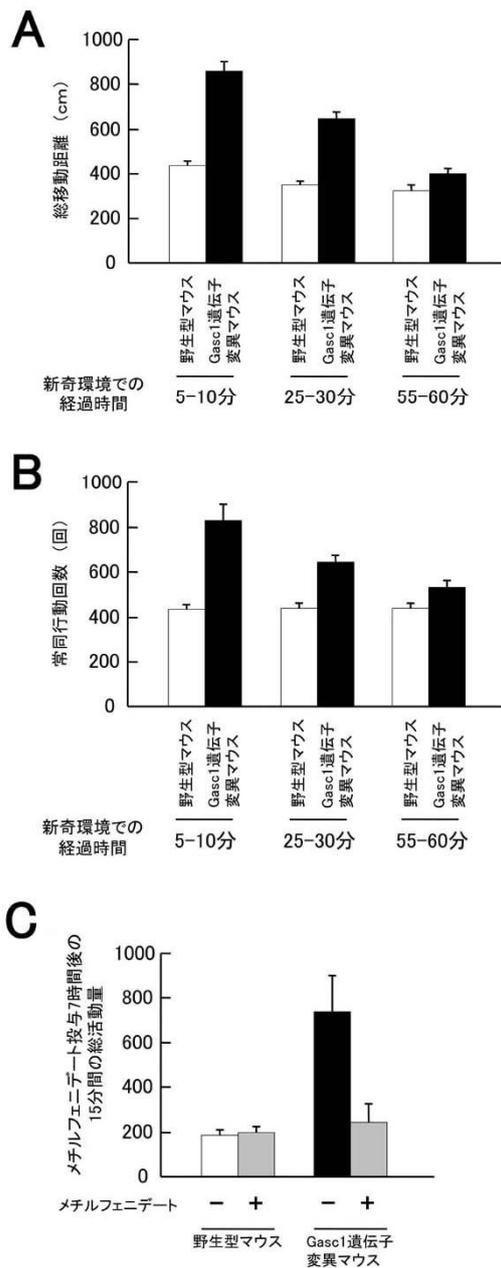


図 *Gasc1* 遺伝子変異マウスの行動解析  
 A 新奇環境のオープンフィールドで検出された *Gasc1* 遺伝子変異マウスの多動性。新奇環境に置いて 5-10 分、25-30 分、55-60 分の各 5 分間の総移動距離を算出した。  
 B 新奇環境のオープンフィールドで検出された *Gasc1* 遺伝子変異マウスの常同行動。新奇環境に置いて 5-10 分、25-30 分、55-60 分の各 5 分間の常同行動を数えた。  
 C メチルフェニデート投与による *Gasc1* 遺伝子変異マウスの多動性の改善

歯状回で強かった。*Gasc1* 遺伝子変異マウス的大脑や脳幹のジメチル化ヒストン H3K9 が減少していた。これにより、*Gasc1* のトリメチル化ヒストン H3K9 を基質とした脱

メチル化活性が初めて生体で証明された。

(3) メチルフェニデートを投与した *Gasc1* 遺伝子変異マウスは活動期に見られていた多動症状が有意に改善されたことから、本マウスはヒト発達障害に類似した原因で多動症状を呈していたことが示された (図 C)。本研究により、*Gasc1* 遺伝子変異による下流標的遺伝子のエピゲノム修飾変化がヒト発達障害の原因である可能性、および *Gasc1* 遺伝子変異マウスがヒト自閉症スペクトラムを含む発達障害のモデルとして極めて有用であることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 鹿川哲史、備前典久、田賀哲也. アストロサイトの発生・分化. *Clinical Neuroscience* 査読無 29, 1239-1242, 2011.
- ② Yoshinaga Y, Kagawa T, Shimizu T, Inoue T, Takada S, Kuratsu J, Taga T. Wnt3a Promotes Hippocampal Neurogenesis by Shortening Cell Cycle Duration of Neural Progenitor Cells. *Cell Mol Neurobiol*. 査読有 2010, 30(7):1049-58
- ③ Inoue T, Kagawa T, Inoue-Mochita M, Isono K, Ohtsu N, Nobuhisa I, Fukushima M, Tanihara H, Taga T. Involvement of the Hipk family in regulation of eyeball size, lens formation and retinal morphogenesis. *FEBS Letters*. 査読有 2010, 584(14):3233-8.
- ④ 鹿川哲史、田賀哲也. Wnt・FGF・Notch シグナル相互作用による神経幹細胞自己複製の制御機構、医学のあゆみ 査読無 233: 10, 1032-1036, 2010.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 備前典久、鹿川哲史、他. メチル化シトシンヒドロキシラーゼ Tet3 は DNA 脱メチル化を介して胎生期神経幹細胞/前駆細胞のアストロサイト分化能獲得に寄与する. 第 10 回神経発生討論会 福井市 2012 年 3 月
- ② 高沢友輝、鹿川哲史、他. 低酸素状態で発生期マウス神経幹細胞に発現する VEGF-A による幹細胞性維持と低酸素ニッチ作用. 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜市 2011 年 12 月
- ③ Kouichi Tabu, Tetsushi Kagawa、他. Maintenance of C6 glioma side population with stemness by the cellular and synthetic niche. 第 34 回日本分子生物学会年会 横浜市 2011 年 12 月
- ④ Tetsushi Kagawa、他. Specification of Glial Cell Types in the Developing Central

Nervous System 中枢神経系グリア細胞の発生分化研究の現状と展望 第 54 回日本神経化学会 加賀市 2011 年 9 月

⑤ 鹿川哲史 ヒストン脱メチル化酵素遺伝子変異マウスにおけるヒト精神運動異常様行動の解析 2011 年度包括脳ネットワーク夏のワークショップ 神戸市 2011 年 8 月

⑥ Tetsushi Kagawa、他 Analysis of glial cell sub-lineages in the mouse central nervous system マウス中枢神経系におけるグリア亜集団細胞系譜の解析 第 44 回日本発生生物学会 宜野湾市 2011 年 5 月

⑦ Norihisa Bizen, Tetsushi Kagawa、他、The role of cyclin D1 in inhibition of astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells The 9<sup>th</sup> Stem Cell Research Symposium 東京 2011 年 5 月

⑧ 国分康博、鹿川哲史、他、Gene expression and functional analyses of histone demethylase Gasc1 in brain. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸市 2010 年 12 月

⑨ 備前典久、鹿川哲史、他、Cyclin D1 inhibits astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells in a manner independent of cell cycle progression. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸市 2010 年 12 月

⑩ 鹿川哲史、他、中枢神経系グリア亜集団細胞系譜の GFAP/Cre レポーターマウスを用いた解析、Neuro2010、神戸市 2010 年 9 月

⑪ 備前典久、鹿川哲史、他、神経幹細胞/前駆細胞における細胞周期調節因子 cyclin D1 のアストロサイト分化抑制機構、Neuro2010、神戸市 2010 年 9 月

⑫ 備前典久、鹿川哲史、他、Molecular mechanism underlying cyclin D1 mediated inhibition of astrocyte differentiation from neural stem/progenitor cells. 第 8 回幹細胞シンポジウム、淡路島 2010 年 5 月

〔図書〕(計 1 件)

鹿川哲史、田賀哲也 Wnt・FGF・Notch シグナル相互作用による神経幹細胞自己複製の制御機構、別冊医学のあゆみ「生体システムとしての Wnt シグナル・ネットワーク研究」医歯薬出版株式会社 94-98, 2011.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鹿川 哲史 (Tetsushi Kagawa)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教

授

研究者番号： 50270484

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：