

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500427

研究課題名(和文) 攻撃行動を指標とした自閉症、発達障害原因遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Functional screening and study of genes based on aggressive behavior, which is involved in autism and human developmental disorders.

研究代表者

小泉 恵太 (Koizumi, Keita)

金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授

研究者番号：70377406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では遺伝子スクリーニングのツールとして多用されるショウジョウバエ研究から始め、マウスでのin vivo/in vitroでの分子研究から、発達障害、精神疾患関連遺伝子の同定、機能研究を行うことを目指した。

本研究期間中に、Robo2、Ect2、Fam107B(Hitと命名)の3遺伝子に絞り込み、このうち、Robo2に関してはヒト死後脳を使った自閉症臨床研究まで発展させることが出来た。また、新規遺伝子、Hitに関してはストレスホルモン応答性の遺伝子であり、同様の機能を持つSgk1(うつ病の危険因子と考えられている)と機能的関連性を持つことを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Starting from Drosophila genetic screening based on aggressive behavior, we aim to identify and study genes involved in human developmental disorders and psychiatric disorders such as depression. In this 3 years project, we finally reach 3 candidates, Robo2, Ect2 and Fam107B (we call it as "Hit") that is related to autism, mental retardation and depression.

One of them, Robo2 shows decreased expression in autistic human postmortem brain. Another gene, Hit responsible to stress hormone and related to function of Sgk1, a risk factor gene that may cause depression.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：攻撃衝動 ストレスホルモン 発達障害

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症などに代表される発達障害は、遺伝子上の小さな変異が主要な原因と考えられるタイプの精神疾患である。ところが、その原因とされる遺伝子は多岐に渡っており、例えば、現在自閉症の原因と考えられている遺伝子は百以上報告されている。それぞれの遺伝子の機能は多様であり、また互いの遺伝子の関連性についても未解明の部分が多く、このことが分子レベルでの原因究明の大きな障害となっている。また、うつ病、双極性障害、統合失調症などの精神疾患に関しても、遺伝的要因の影響が指摘されているが、その分子機能研究は未解明な部分が多い。このような問題を解決する為にはモデル動物を利用したシステムティックな研究が有効であると考え、以下に述べる通り本研究を遂行した。

### 2. 研究の目的

我々は遺伝子研究の優れたツールとして多用されるモデル動物、ショウジョウバエを使った遺伝子スクリーニングを最初のステップとして選び、本研究に先立ちハエ神経発生に関わる遺伝子のスクリーニングを行ってきた (PNAS 104:5626-31, 2007)。興味深いことに、スクリーニングされた遺伝子のヒトホモログの中には発達障害に関連する遺伝子が多数存在することが明らかとなった。本研究では、スクリーニングされたハエ遺伝子について二次的なスクリーニングをハエ/マウスにて行い、発達障害に関わる遺伝子の同定を行い、さらに他の遺伝子との分子レベルでの機能的相互作用を明らかにしていくことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ショウジョウバエの攻撃衝動性を元にしたスクリーニング

ショウジョウバエの社会的隔離 (すなわち単独飼育) は攻撃性を増すことが知られており、これにはセロトニン系神経が関与していることが明らかになっている (Neuroscience 158: 1292-300, 2009)。そこで、この攻撃行動を指標とし、RNAi による遺伝子スクリーニングを行い、リスト中の遺伝子の絞り込みを行う

#### (2) マウスの系での遺伝子機能解析

##### ① 遺伝子発現解析

RT-PCR、免疫染色により対象遺伝子の脳内発現や時期特異性などについて解析する。

##### ② 初代培養系での解析

胚期のマウス脳を用いた初代培養細胞を用い、神経分化、遊走性、神経突起伸長などの解析を行う。

##### ③ in utero electroporation による遺伝子導入実験

in vivo での遺伝子機能解析のため、in utero electroporation 法を用い遺伝子導入を行い、対象遺伝子の機能解析 (神経分化や大脳皮質での神経遊走性) を行う (申請時には、レンチウイルスによる解析を行うと書いたが、代わりに本法を用いた解析を行った)。

### 4. 研究成果

研究成果に関しては、研究対象とした遺伝子ごとに説明したい。

#### (1) robo 遺伝子の解析

robo は免疫グロブリンファミリーに属する、細胞接着因子の遺伝子である。robo 遺伝子に関しては、ヒト研究から、注意欠陥・多動性障害 (ADHD) の原因遺伝子の候補とされている (J Hum Genet.52:104-9, 2007)。ショウジョウバエの行動解析からは、robo 遺伝子をセロトニン神経系で強制発現させると社会隔離状態で見られた攻撃衝動性の高まりが抑制されていることが明らかとなった。Robo の欠失が衝動的な問題行動を起こす ADHD と関連するとされていることを考えると非常に興味深い。マウスでの分子機能解析に関して既に多くの報告があるが、特に発達障害との関連性から、Neuroigin/Neurexin との関連性を免疫沈降により解析した。残念ながら両者との関連性は見出すことが出来なかった。この robo に関しては、浜松医科大学精神科の森教授との共同研究から、さらに、ヒト robo 遺伝子 (Robo2) の死後脳での発現解析を行った。この結果、自閉症者では Robo2 の mRNA 発現が前帯状皮質にて減少していることをつきとめた (Mol Autism. 2: 14, 2011, 図 1)。

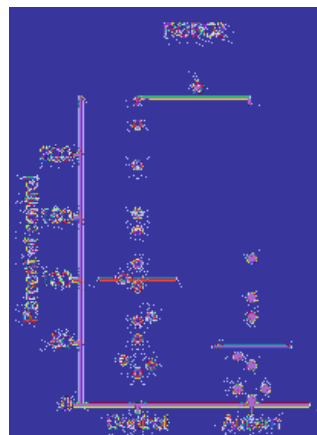


図 1. 死後脳、前帯状皮質での Robo2 発現

#### (2) pebble 遺伝子 (マウス/ヒトでは Ect2 遺伝子) の解析

pebble は GEF ファミリーに属する遺伝子であり、我々のスクリーニングからハエ神経発生に異常をもたらすことを確認している (PNAS 104:5626-31, 2007)。ショウジョウバエ研究から、ubiquitin ligase と機能的に密接に関わることが報告されている (Hum Mol Genet. 15:2825-35, 2006)。ヒト Ubiquitin

*Ligase 3A* は自閉症の原因遺伝子として良く知られていることから、この遺伝子、*Ect2* について、マウスを使った解析を進めた。この結果、マウス脳組織では脳下垂体に特異的に発現していることが明らかとなり、ホルモンの分泌に影響を与えることが示唆された (Cell Mol Neurobiol. 31: 663-8, 2011)。(本遺伝子に関しては、ショウジョウバエの行動解析からは明確な行動異常は見出せなかったが、特に自閉症関連遺伝子の可能性が高いことから、マウスでの解析を進めた)

### (3) CG9328 (マウス/ヒトでは *Fam107A/B*) 遺伝子の解析

CG9328 はハエでは未解析の遺伝子である。マウス/ヒト研究でも機能が明らかとなっていない遺伝子であったが、*Fam107A* が双極性障害/統合失調症患者の死後脳で発現が減少していること (Biol Psychiatry 64:89-97, 2008) が報告されている。また、本研究期間中に *Fam107A* がストレスホルモン、グルココルチコイド応答性の分子であり、マウス幼若期の神経発達に重要な働きを持つことが明らかにされた (PNAS 108:17213-8)。我々のハエ研究からも重要な遺伝子であることが示唆されたため、マウスでの研究を、特に未解明の *Fam107B* (*Hit* と命名) に関し進めた。現在、最も注目している遺伝子である。

#### ① 細胞増殖、神経遊走性への影響

培養細胞を用いた増殖解析からは、*Hit* 遺伝子の強制発現が増殖を抑制し (Int J Oncol. 41: 1347-57, 2012)、且つ細胞遊走性も抑制することが明らかとなった。さらに、*in vivo* での機能解析のため、*in utero electroporation* により *Hit* 遺伝子の強制発現を行ったところ、大脳皮質での神経遊走を抑制することを見出した (図2)。神経遊走についてはセロトニンが受容体 5HT6 とともに働くことも突き止めた (Biomed Rep. 2: 29-33, 2014)。両者の関連性は今後の研究課題である。

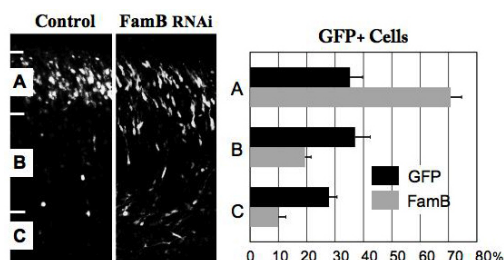


図2. *Hit* 強制発現による神経遊走抑制

#### ② グルココルチコイド応答性

また、*Fam107A* 同様にグルココルチコイド応答性の分子であり、特に妊娠時での母体へのストレス負荷 (拘束ストレス) により、胎児脳内での顕著な発現減少をもたらすことを見出した (図3)。また、グルココルチコイドは培養細胞の遊走性、大脳皮質での神

経細胞遊走に同様に影響を与えることから、*Hit* がグルココルチコイドによる脳発生期の障害の主要な原因因子の一つである可能性が明らかとなった。

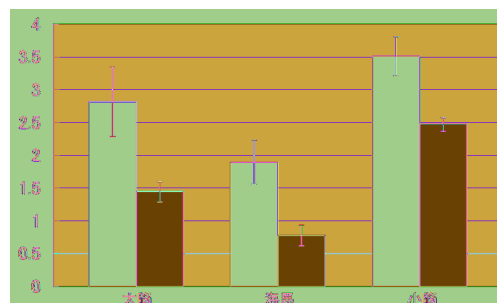


図3. 母体への拘束ストレス後 (灰色) の胎児脳での *Hit* 発現変化

マウス/ラット母体へのストレス負荷が胎児の脳発生に影響を与え、生後の情動行動に影響を与えることは良く知られているが、ヒトでも同様の影響があるものと危惧されており、さらにはうつ病 (Neurosci Biobehav Rev. 43: 137-162) や自閉症 (Neuroscience and Biobehavioral Reviews 32: 1519-1532, 2008) との関連性も指摘されている。

#### ③ 他の発達障害/うつ病関連遺伝子との相互作用

*Fam107B* の発達障害/精神疾患との関連性を明確にするため、他の遺伝子との関連性を解析した。精神遅滞原因遺伝子 *Xpn1* は転写因子と考えられ、よく似た神経発生異常をもたらすが、この *Xpn1* の発現抑制が *Fam107B* 遺伝子発現を抑制することが明らかとなった。

また、*Hit* 同様にグルココルチコイド応答性の分子として報告されている *Sgk1* (うつ病の危険因子、PNAS 110: 8708-13, 2013) との関連性を調べたところ、*Sgk1* の inhibitor が *Hit* の機能を促進していることが示唆された (すなわち、機能的に逆方向に働く)。この結果は *Hit* がストレスにより分泌された、グルココルチコイドにตอบสนองし、*Sgk1* と連動して働くタイプの分子であり、うつ病との関連性が高いことを示唆している。

以上の様に、おもに3遺伝子について研究を進めた。今回の研究を通して、ショウジョウバエ遺伝子スクリーニングから見出した遺伝子が、ヒト発達障害、精神疾患に関連する遺伝子研究に結びつくことを明らかに出来たと考えている。*Hit* の様に昆虫の攻撃行動でのスクリーニングら、心的ストレスに関連する遺伝子が同定できたことは、非常に興味深い。今後、研究の効率化を進めれば、この系から、新たなストレス関連遺伝子が見出せるかもしれない。妊娠時のストレスと生後の発達障害、うつ病などの精神疾患との関連性については、ほぼ未解明と言っても過言で

はない。今後の研究発展につながる大きな成果が得られたと考えている。

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6件)

① Nakajima H, Koizumi K.

“Family with sequence similarity 107: A family of stress responsive small proteins with diverse functions in cancer and the nervous system (Review).”

*Biomed Rep.* 2: 321-325, 2014.

doi: 10.3892/br.2014.243. (査読有)

② Nakajima H, Koizumi K.

“Serotonin induces the migration of PC12 cells via the serotonin receptor 6/cAMP/ERK pathway.”

*Biomed Rep.* 2: 29-33, 2014.

doi: 10.3892/br.2013.203. (査読有)

③ Nakajima H, Koizumi K (12名中2目),,,  
Motoo Y.

“Loss of HITS (FAM107B) expression in cancers of multiple organs: tissue microarray analysis.”

*Int J Oncol.* 41: 1347-57, 2012.

doi: 10.3892/ijo.2012.1550. (査読有)

④ Kuzin A, Kundu M, Ross J, Koizumi K, Brody T, Odenwald WF.

“The cis-regulatory dynamics of the Drosophila CNS determinant *castor* are controlled by multiple sub-pattern enhancers.”

*Gene Expr Patterns.* 12: 261-72, 2012.

doi: 10.1016/j.gep.2012.05.004. (査読有)

⑤ Suda S.,,,Koizumi K. (16名中13番目),  
Higashida H.,, Mori N.

“Decreased expression of axon-guidance receptors in the anterior cingulate cortex in autism.”

*Mol Autism.* 2: 14, 2011.

doi: 10.1186/2040-2392-2-14. (査読有)

⑥ Tsuji T, Higashida C, Yoshida Y, Islam MS, Dohmoto M, Koizumi K, Higashida H.

“Ect2, an ortholog of Drosophila's pebble, negatively regulates neurite outgrowth in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells.”

*Cell Mol Neurobiol.* 31: 663-8, 2011.

doi: 10.1007/s10571-011-9668-3. (査読有)

[学会発表] (計6件)

① Koizumi K, Nakao K, Nakajima H.

“Study of FAM107A/B, new candidate genes critical for human developmental disorders.”

第36回日本分子生物学会年会、12/2、

神戸ポートアイランド、神戸、2013年

② Koizumi K, Ito M, Nakao K, Nakajima H.

“Study of new candidate genes that may have critical role for autism and also schizophrenia.”

Neuroscience Meeting 2013, 11/12,

Convention Center, Sandiego, USA, 2013.

③ Koizumi K, Nakao K, Nakajima H.

“Study of new candidate genes critical for human developmental disorders.”

第56回日本神経化学学会大会、6/21、

国立京都国際会館、京都。2013年

④ 小泉恵太、東田陽博、中島日出夫

“自閉症、精神遅滞などの発達障害に関わる  
ことが期待される新規遺伝子”

第35回日本分子生物学会 (12/11、福岡、  
マリンメッセ福岡)、2012年

⑤ Nakajima H, Koizumi K

“HITS (FAM107B): Novel heat-shock induced protein involved in cancer progression and neurogenesis.”

18th World Congress on Advances in

Oncology (Oct 10-12, Hotel Creta

Maris Resort, Greek), 2012.

⑥ Koizumi K, Nakajima H, Higashida H.

“Fly/mouse studies identify genes that have important role to cause human developmental disorders including mental retardation and autism.”

第 34 回日本分子生物学会年会、12/14、  
パシフィコ横浜、横浜、2011

〔図書〕 (計 1 件)

① Higashida H, Munesue T, Yokoyama S,  
Hashii M, Koizumi K. and Matsushima A.

(Edited by: Eapen V)

“Autism-A Neurodevelopmental Journey from  
Genes to Behaviour” (Chapter 10)、

総ページ : 485ページ

In Tech, 2011.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小泉 恵太 (Koizumi, Keita)

金沢大学・子どものこころの発達研究

センター・特任准教授

研究者番号 : 70377406

### (3) 連携研究者

棟居 俊夫 (Munesue, Toshio)

金沢大学・子どものこころの発達研究

センター・特任教授

研究者番号 : 50293353

東田 陽博 (Higashida, Haruhiro)

金沢大学・子どものこころの発達研究

センター・特任教授

研究者番号 : 30093066

中島 日出夫 (Nakajima, Hideo)

熊本大学・エイズ学研究センター・研究員

研究者番号 : 00333394