

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791322

研究課題名（和文） 自閉症関連環境要因暴露による胎児脳のエピジェネティック異常の解明

研究課題名（英文） Analysis of epigenetic abnormality in the fetal brain exposed to autism related environment factors in mice.

## 研究代表者

岩田 圭子（IWATA KEIKO）

福井大学・子どものこころの発達研究センター・特命助教

研究者番号：30415088

## 研究成果の概要（和文）：

ウイルス感染を模倣する poly(I:C) を母マウスに投与した発達の各段階の胎児の脳において、時期特異的にメチル化酵素の発現が異常であることを明らかにした。また、本異常は脳部位特異的であった。さらに、これまで自閉症候補因子として知られている遺伝子群の中で、数種類に脳部位特異的な発現の変化が認められ、これら遺伝子を自閉症関連ウイルス感染感受性遺伝子として同定した。

## 研究成果の概要（英文）：

I have found that time-specific effects of poly (I:C), which mimic a bacterial and viral infections, on methyltransferases in the brain of embryos in a part-specific manner. Additionally, the expressions of some candidate genes for autism change part-specific manner, and these genes are identified as viral infection susceptibility genes.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：児童・思春期精神医学

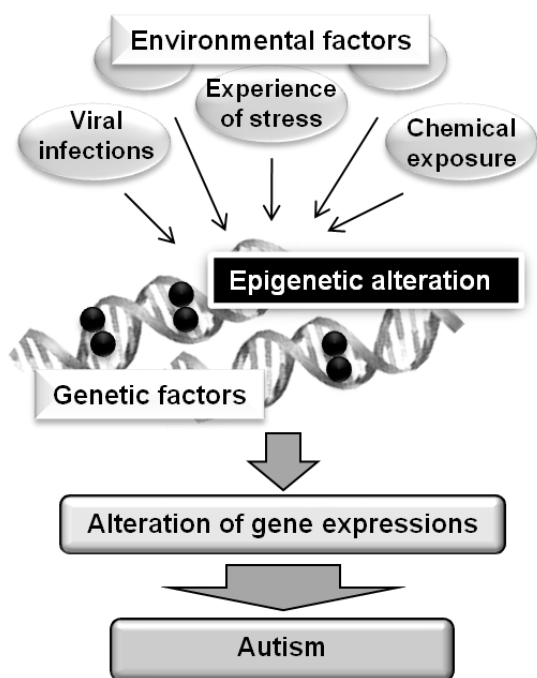
## 1. 研究開始当初の背景

自閉症は、対人的相互作用やコミュニケーションの障害、興味・活動の限定された反復的常同的な行動様式などによって特徴付けられる広範性発達障害である。最新の報告によると、有病率は実に 1.75% であるといわれている (Baron-Cohen et al. 2009)。しかし、自閉症の原因および病態発現のメカニズムはいまだ不明であり、根本的な治療法は確立されていない。自閉症は卵性双生児の発症率が約 90% であることから遺伝的要素が強いと考えられてきた。そのため世界中で原因遺伝子の同定が試みられ、これまでに多数の候補遺伝子が報告されているが、その同定には至っていない (Folstein and Rosen-Sheidley

2001, Toro et al. 2010)。また、以前より、胎児の母体におけるウイルス、ストレスおよび化学物質などの環境要因への暴露が自閉症のリスクファクターとして広く知られている (Geier et al. 2009, Libbey et al. 2005, Kinney et al. 2008)。一方、自閉症の発症率は年々増加しており、これは単純に診断カテゴリーの拡大や自閉症への関心の高まりでは説明できない。これらのことを複合的に考え、現在では遺伝的要因と環境要因の相関性が自閉症の病因に深く関与していると考えられている。しかし、環境要因がどのように遺伝子発現に影響を与え、自閉症発症に起因しているかは不明である。近年、環境要因がエピジェネティクス (DNA のメチル化、ヒ

ストンのアセチル化、non-coding RNAs など)に影響を与えるということが解明されつつある(Choudhuri et al. 2010)。事実、ウイルス感染、ストレス、および化学物質によりエピジェネティクス(特にメチル化)の変化が引き起こされることが報告されており(reviwed in Iwata et al. 2010)、さらに、*reelin*などの自閉症候補遺伝子がエピジェネティック制御を受けることが分かっている(Noh et al. 2005, Kundakovic et al. 2006)。これらのことから環境要因がエピジェネティクスの変化を介して遺伝子発現の異常を引き起こすというメカニズムが推測される(図.1)。

図 1. 環境因子のエピジェネティクス変化を介しての自閉症発病への関与



## 2. 研究の目的

本研究課題では、遺伝的要因と環境要因の相関性をエピジェネティクスおよび遺伝子発現の変化の観点から解明することを目的とする。環境要因によりエピジェネティクス(特にメチル化)の変化する自閉症候補遺伝子を同定し、自閉症発症メカニズム解明、更には予防法および治療法の開発に利用する。

## 3. 研究の方法

### 概要

自閉症リスクファクターである環境要因【ウイルス (poly(I:C)) に暴露した胎児脳のDNAのメチル化状態、およびメチル化酵素の発現の変化を解析し、環境要因によって胎児脳のメチル化異常がおこる時期を同定する。次に、同定された時期における自閉症候

補遺伝子の発現を解析し、自閉症関連ウイルス感染感受性遺伝子を同定する。さらにこれら遺伝子のメチル化変化を検討し、遺伝子発現異常の継続される期間を明確にする。以上の結果から自閉症関連環境要因に高感受性の遺伝子を同定し、遺伝子の特性を組み合わせ自閉症発症への関与を考察する。

実験動物はマウスを用い、環境要因としてウイルス感染を用いた。ウイルス感染は、胎児がE12.5の母マウスにpoly(I:C), 20 mg/kg、もしくはネガティブコントロールとして生理的食塩水を腹腔内投与した(Mueller et al. 2008)。

発生期に重要なメチル化酵素、DNA methyltransferase 1 (DNMT1), DNMT3a, DNMT3b の発現を解析した。環境要因によってメチル化の変化が起こる時期および部位が異なる可能性がある。そこでそれぞれの発達の段階において胎児の脳を採取し、各脳部位に分け、それぞれの脳部位から mRNA を抽出した。遺伝子の発現は定量的リアルタイム PCR で測定・解析した。なお、インターナルコントロールとして GAPDH を用いた。これらの解析により、環境要因によって胎児脳のメチル化異常がおこる時期および部位を同定した。

続いて、上記で同定された時期の脳部位を用い、これまで自閉症候補因子として知られている遺伝子群(図.2)について遺伝子発現解析を行った。遺伝子の発現は定量的リアルタイム PCR で測定・解析した。なお、インターナルコントロールとして GAPDH を用いた。

図 2. 自閉症候補遺伝子群

Candidate genes
AVPR1A (arginine vasopressin receptor 1A), DISC1 (disrupted in schizophrenia 1), ITGB3 (integrin beta 3), AHI1 (Abelson helper integration site 1), EN2 (engrailed homeobox 2), GRIK2 (glutamate receptor ionotropic kainate 2 precursor), NRXN1 (neurexin 1), SLC25A12 (solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, Aralar) member 12), CACNA1C (calcium channel voltage-dependent L type alpha 1C subunit), CNTNAP2 (contactin associated protein-like 2), MET (met proto-oncogene), OXTR (oxytocin receptor), SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3), SLC6A4 (solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin) member 4), CADPS2 (Ca <sup>2+</sup> -dependent activator protein for secretion 2), DHCR7 (7-dehydrocholesterol reductase), FMR1 (fragile X mental retardation 1), NLGN3 (neuroligin 3), NLGN4X (neuroligin 4 X-linked), PTEN (phosphatase and tensin homologue), TSC2 (tuberous sclerosis 2), GABRB3 (gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor beta 3), MECP2 (methyl CpG binding protein 2), TSC1 (tuberous sclerosis 1), UBE3A (ubiquitin protein ligase E3A), RELN (reelin)
Control genes
LINE-1 (long interspersed nuclear element-1), GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

## 4. 研究成果

まず、環境要因によってメチル化の変化が起こる時期が異なる可能性があるため、それぞれの発達の段階に胎児の脳を採取し、発生

期に重要なメチル化酵素の遺伝子発現を解析した。その結果、時期特異的にメチル化酵素の発現が異常であることを明らかにした。

次に、脳を各部位に分け、同様にメチル化酵素発現を解析し、部位特異的な異常であることを突き止めた。

続いてメチル化酵素の発現異常が認められた時期の脳部位を用い、これまで自閉症候補因子として知られている遺伝子群について遺伝子発現解析を行った。その結果、数種類の遺伝子に脳部位特異的な発現の変化が認められ、これら遺伝子を自閉症関連ウイルス感染感受性遺伝子として同定した。(図. 3)

図. 3 自閉症関連ウイルス感染感受性遺伝子

gene No.	telencephalon		diencephalon		mesencephalon		cerebellar primordium	
	fold chang	Sig. (2-tailed)	fold chang	Sig. (2-tailed)	fold chang	Sig. (2-tailed)	fold chang	Sig. (2-tailed)
1	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
2	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
3	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
4	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
5	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
6	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
7	N.S.		N.S.		1.202012	0.00026	N.S.	
8	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
9	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
10	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
11	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
12	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
13	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
14	0.85515	0.00181	N.S.		N.S.		N.S.	
15	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
16	0.837014	0.00174	N.S.		N.S.		N.S.	
17	0.763155	0.00126	N.S.		N.S.		N.S.	
18	N.S.		N.S.		N.S.		1.719646	0.00093
19	N.S.		1.500583	0.00191	N.S.		N.S.	
20	N.S.		N.S.		N.S.		1.518765	0.00027
21	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
22	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
23	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
24	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	
25	N.S.		N.S.		N.S.		N.S.	

今後、自閉症関連ウイルス感染感受性遺伝子のウイルス感染によるメチル化変化を詳細に検討し、さらに遺伝子発現異常の継続される期間を明確にし、それぞれの遺伝子の特性と組み合わせ自閉症発病への関与を考察することで、自閉症発症メカニズム解明、更には予防法および治療法の開発に利用する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① **Iwata K.**, Izumo N, Matsuzaki H, Manabe T, Ishibashi Y, Ichitani Y, Yamada K, Thanseem I, Anitha A, Vasu MM, Shimmura C, Wakuda T, Kamenno K, Takahashi T, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Mori N. (2012) Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats. Mol Autism, Oct 30;3(1):11. (査読有) doi:10.1186/2040-2392-3-11
- ② **Iwata K.**, Matsuzaki H, Miyachi T, Shimmura C, Suda S, Tsuchiya KJ,

Matsumoto K, Suzuki K, Iwata Y, Nakamura K, Tsujii M, Sugiyama T, Sato K, Mori N. (2011) Investigation of the serum levels of anterior pituitary hormones in male children with autism. Mol Autism, Oct 19;2(1):16. (査読有) doi: 10.1186/2040-2392-2-16.

[学会発表] (計 10 件)

### 【国際発表】

- ① Paparelli A, **Iwata K.**, Iyegbe C, Matsuzaki H, Wakuda T, Di Forti M, Jhon P, Murray RM, Takei N. (2012) Is Hypoxia the Remote-Controller for Schizophrenia Genes? EPA-EU GEI Conference, Maastricht, Netherlands, 14th-16th June.
- ② **Iwata, K.**, Matsuzaki, H., and Mori, N. (2012) Serum levels of anterior pituitary hormones in children with autism. 2012 International Meeting for Autism Research, Sheraton Centre Toronto, Toronto, Canada, May 17-19 (19).
- ③ Matsuzaki H, **Iwata K.**, and Mori, N. (2012) VLDL-Specific hypolipidemia pattern in human subjects with autism and autistic models. 2012 International Meeting for Autism Research, Toronto, Canada, May 17-19 (19).
- ④ **Iwata, K.**, Matsuzaki, H., Takei N, and Mori, N. (2012) Alteration of the expression balance of hnRNP C1 and C2 changes the expression of myelination- and schizophrenia-related genes in the human neuroblastoma cell line. 3<sup>rd</sup> Biennial Schizophrenia International Research Society Conference, Florence, Italy, April 14-18.

- ⑤ Wakuda T, **Iwata K.**, Suzuki K, Takei, N, and Mori N. (2012) Alteration of several schizophrenia candidate genes expression in medial prefrontal cortex in perinatal asphyxia rodent model. 3<sup>rd</sup> Biennial Schizophrenia International Research Society Conference, Florence, Italy, April 14-18.

### 【国内発表】

- ⑥ **岩田圭子**、中林一彦、松崎秀夫、中村和彦、秦健一郎、森則夫：自閉症死後脳縫線核メチル化状態の網羅的解析。第 39 回日本脳科学会，小倉市，リーガロイヤルホテル小倉，2012 年 10 月 5-6 日 (奨

励賞受賞)

- ⑦ **Iwata K.**, Nakamura K, Matsuzaki H, Nakamura K, Hata K, Mori N (2012) Genome-wide DNA methylation profiles in post-mortem brains from subjects with autism. The 55<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry, Kobe, Kobe Convention Center, September 30-October 2.
- ⑧ **岩田圭子**、松崎秀夫、森則夫：hnRNP C1 および C2 発現パターンの変化がミエリン関連遺伝子の発現に及ぼす影響. 第38回日本脳科学会，那覇市，沖縄県市町村自治会館，2011年10月8-9日
- ⑨ **Iwata, K.**, Matsuzaki, H., Mori, N., (2011) Alteration of the expression balance of hnRNP C1 and C2 changes the expression of myelination-related genes in the human neuroblastoma cell line. The 54<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Neurochemistry, Kaga, Ruriko, September 26-28
- ⑩ **岩田圭子**、松崎秀夫、眞部孝幸、森則夫：hnRNP C1 および C2 発現パターンの変化がミエリン関連遺伝子の発現に及ぼす影響. RNA フロンティアミーティング 2011，大府市，あいち健康プラザ，2011年8月30日-9月1日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩田 圭子 (IWATA KEIKO)  
福井大学・子どものこころの発達研究センター・特命助教  
研究者番号：30415088