

「新規自閉症関連遺伝子、NDN 遺伝子の分子メカニズム解明」

神戸大学大学院医学研究科 玉田 紘太

1 研究の背景と目的

自閉スペクトラム症は 2-3 歳から認められ、男性と女性の割合が 4:1 と非常に男性で多い発達障害である。双生児研究などから遺伝的素因が強く関与することが明らかとなってきた。自閉スペクトラム症に関連する遺伝的素因には単一遺伝子の変異に加え、より大きな単位、すなわち染色体レベルでの欠失や重複などのいわゆる染色体異常も含まれている。ヒト染色体 15q11-q13 領域の重複という現象は、自閉症者で最も高頻度に認められる染色体異常の一つである。この重複は母性由来染色体で生じることが多く、母性染色体よりのみ発現する、UBE3A 遺伝子はその原因として考えられてきた。一方で近年になり、同領域の父性染色体由来の重複が複数の自閉症者で認められるようになってきたことや、UBE3A 遺伝子を含まない非典型的な染色体重複が自閉症者で見つかったことなどを証拠に、UBE3A 以外の遺伝子の自閉症への関与が示唆されてきた。しかし、本領域は数 Mb と非常に長い染色体領域であることや、含まれている遺伝子の転写調節が極めて複雑なメカニズムにより制御されていることなどから、自閉症を誘発するキーとなる遺伝子を同定するには非常に困難であった。

これまで、我々の研究により本領域の重複マウスモデルを作製し、多階層的な解析を行うことで、自閉症様の行動学的異常、セロトニン量の異常、脳内の興奮性/抑制性バランスの破綻など種々の神経異常を見出してきた。近年では重要遺伝子の絞り込みに成功し、NDN 遺伝子が自閉症様行動異常、また大脳皮質における樹状突起スパインの異常を誘起することを明らかにした (Tamada et al., Nature Communications, 2021)。しかし、NDN 遺伝子は神経系、また非神経系において様々な役割を果たすことが報告されている一方、自閉症や樹状突起スパインとの関連は未だ報告されていない。そこで本研究では NDN 遺伝子がどのような機序をもって樹状突起スパインの量を調節するか、また、どのように自閉症の症状に関与するかを明らかにすることを目的とする。

2 研究方法・研究内容

本研究課題においては、NDN がどのようなメカニズムをもって樹状突起スパイン

の量を調節するかを明らかにすることを目標とした。まず、生体内で NDN の標的遺伝子を抽出するために、マウス脳組織から精製度の高い核抽出法をいくつか検討した。次に NDN は細胞質、核内の両方に存在し、それぞれの機能を有すると報告があるため、どちらの NDN が樹状突起スパインに決定的かを調べた。方法としては蛍光タンパク質である GFP に核移行シグナルを付けた GFP-NLS と、細胞質、あるいは核内に留まるように標識を付けた NDN を過剰発現させるためのプラスミドを用意し、子宮内電気穿孔法(Supernova 法)によりマウス大脳皮質神経細胞に疎になるように過剰発現させた。その後、このプラスミドが導入された神経細胞において、樹状突起スパインの密度を Spiso-3D ソフトウェアを用いて計測した。

3 研究成果

脳組織から精製度の高い神経細胞核を抽出するための条件検討を行った。FANS 法 (Amamoto et al., Nucleic Acid Res, 2000) と Iodixanol 法を比較し、夾雑物の混入レベルや、核の形態的完全性について評価した。その結果、FANS 法では細胞膜等の破片(debris)や、2つ以上の核や細胞が結合した凝集塊(aggregate)がいくつか認められた。一方で、Iodixanol 法ではこういった debris や aggregate がほとんど見受けられず、より高純度な核の精製に成功したと言える。

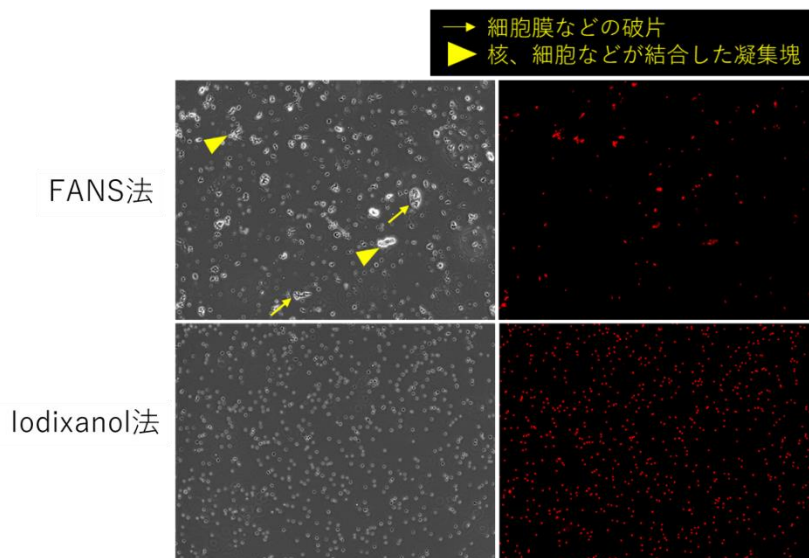


図1. 高精製度核抽出法の検討
FANS法では細胞膜などの破片や、凝集塊が認められるが、Iodixanol法では極めて高純度な核が得られた

次に NDN の樹状突起形成における役割を調べるために、樹状突起スパインの計測システムを立ち上げた。子宮内電気穿孔法(Supernova 法)によりマウス大脳皮質神経細胞に疎になるように過剰発現させた。

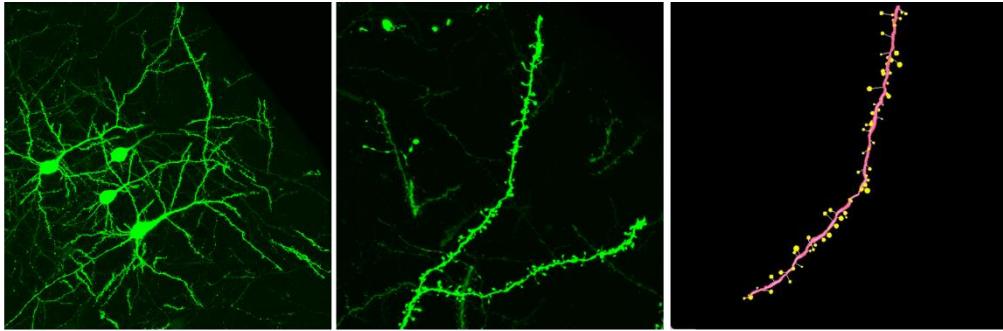
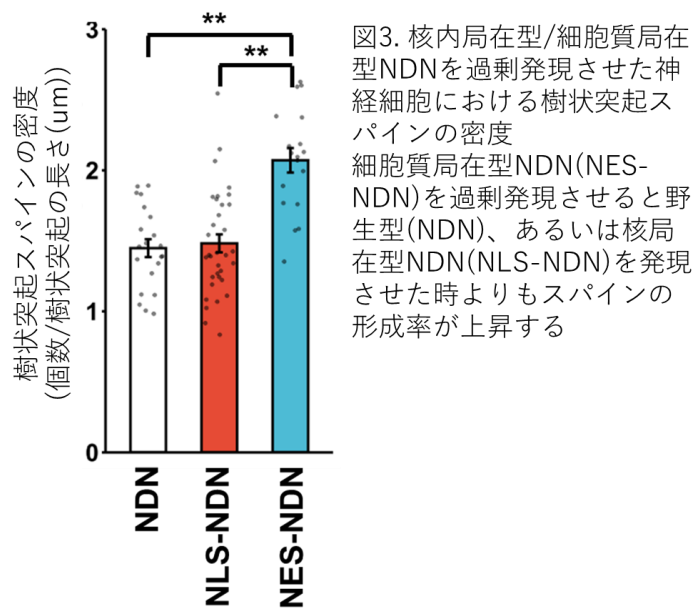


図2. 蛍光タンパク質発現による樹状突起スパインの形成率の解析
子宮内電気穿孔法により、蛍光タンパク質EGFPとNDN遺伝子をそれぞれ大脳皮質に過剰発現させた。その後、樹状突起スパインの形成率をSpiso-3Dを用いて調べた。

NDN の核内局在型と細胞質局在型のプラスミドを調製し、これを子宮内電気穿孔法によりマウス大脳皮質神経細胞に導入し、その効果を調べた。核内局在型 NDN は野生型 NDN と同じレベルの樹状突起スパイン密度の上昇が認められた一方で、細胞質局在型の NDN を導入した神経細胞ではさらなる樹状突起スパインの増加が認められた。



本結果は NDN の細胞質での役割が樹状突起スパイン形成に対して重要であることを意味し、NDN が樹状突起スパインの形成タンパク質と直接的に結合している可能性を示唆するデータである。

今後、NDN との結合タンパク質を明らかとし、自閉症における樹状突起スパイン形成にどのように関連するかを明らかとしていきたい。

4 生活や産業への貢献および波及効果

現代社会において、自閉スペクトラム症は報告によるものの、一部の報告では1/44(全体の2%以上)の罹患率と言われており、しかも年々増えてきていることが知られている。これには診断定義の改変も含まれるとされているが、男性の高年齢化などの生物学的要因も示唆されている。そのため、その発症メカニズムを明らかとすることは重要な課題と言える。遺伝的要因だけでなく、一部の環境要因も自閉症スペクトラム症のリスクとなることが知られているため、その原因は多岐にわたると考えられている。しかし、原因と結果の間に共通性を見出す方向性として、中間表現型という言葉がある。これはある疾患の原因は様々あるが、特定の表現型は共通して存在する、というものである。研究代表者は樹状突起スパインの形成率が自閉スペクトラム症の中間表現型となるのではないかと考えている。そのため、本研究で NDN による樹状突起形成の分子メカニズムを知ることは自閉スペクトラム症全体の中間表現型の解明につながるものと考えられる。

5 謝辞

本研究は、公益財団法人ひょうご科学技術協会からの学術研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。