

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19628

研究課題名(和文) 自閉性障害病因遺伝子変異がシナプス機能及び小胞体ストレスへ及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the influence of autism spectrum disorder related gene mutations on synaptic function and endoplasmic reticulum stress

研究代表者

小島 華林 (Kojima, Karin)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00468331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自閉性障害(ASD)病因遺伝子変異によるASD発症には、変異蛋白の機能喪失と、変異蛋白に誘導されるシナプス機能障害が関与すると考えられる。共通病態として変異による小胞体(ER)ストレス誘導とシナプス機能のアンバランスを想定した。CADM1含めASD病因遺伝子のERストレスへの影響の解析として、変異を持つ患者および患者家系内リンパ芽球に試薬でERストレス誘導後、ストレスマーカーの発現を解析した。変異を持つリンパ芽球はERストレス感受性が高い事を見出した。またCADM1変異ノックインマウス小脳で、抑制性-興奮性シナプスバランスが不均衡であることを同定し、変異とシナプスバランスの関連性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The onset of autism spectrum disorder(ASD) caused by a mutation of the ASD related genes, was considered to be involved in not only loss of function of mutant protein but also gain of function induced by mutant protein. As a common pathology, we assumed an endoplasmic reticulum (ER) stress induction and imbalance of synaptic function by mutation. As an analysis of the influence of ASD related genes including CADM1 on ER stress, expression of ER stress markers was analyzed after ER stress induction with reagents in patients with mutations and patient families lymphoblasts. Lymphoblasts with mutations were found to be highly susceptible to ER stress. In CADM1 mutation knock-in mice cerebellum, identifying the inhibitory-excitatory synaptic balance is unbalanced, it was suggested the association between mutations and synaptic balance.

研究分野：小児神経学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 小胞体ストレス ER stress CADM1 ノックインマウス シナプスバランス

1. 研究開始当初の背景

自閉性障害 (autism spectrum disorders: ASD) は、社会的コミュニケーションの障害、繰り返し行動やこだわりを主症状とする発達障害で、発症頻度は88人に1人と高率である。幼児期から症状がみられ、特性は生涯にわたり持続し社会生活に困難を生じる。発症に関与する病態が不明であるため、根本治療法はなく、治療法開発は重要な課題である。

ASD 発症には遺伝的要因が強く関与する。ASD 患者から染色体の微細構造異常や単一遺伝子変異が多数検出されているが、病因遺伝子は多様であり、遺伝的要因と環境的要因が関与した多因子遺伝も考えられている。

これまでASD 病因遺伝子として *NLGN3*, *NRXN*, *CNTNAP2*, *SHANK3* などのシナプス関連遺伝子が同定され、当研究室ではASD 患者からシナプス接着蛋白 *CADM1* や、シナプスで機能するG蛋白質共役受容体 (GPCR) の *GPR37*, *GPR85* に点変異を検出し、ASD への関与を報告してきた。これらの遺伝子変異解析からASD の主要病態はシナプス形成・機能不全と考えられる。遺伝子変異による共通分子病態がシナプス機能障害を惹起しASD 発症に関与すると考えた。*Cadm1* ノックアウトマウスの行動解析では、攻撃性・不安性行動が増加したが、ASD に特徴的な繰り返し行動等はみられず、ASD 発症には他の要因が推定され (Takayanagi, 2010)。また、*CADM1* 変異導入マウス初代培養神経細胞で *CADM1* 変異蛋白が小胞体ストレスを誘導すること、樹状突起の伸長が妨げられ神経細胞機能障害が惹起されることを報告している (Fujita, 2010)。さらに他のASD 病因遺伝子変異である *GPR37* 変異、*NLGN* 変異導入でも小胞体ストレスが誘導がされた (Fujita-Jimbo, 2012)。

以上から、ASD 発症には変異遺伝子による機能喪失 (Loss of function) だけでなく、遺伝子変異産物により誘導される機能障害 (Gain of function) が関与すると考える。ASD 発症に共通する分子病態機構の一つとして、遺伝子変異産物による小胞体ストレスを想定した。

2. 研究の目的

ASD 病因遺伝子変異が小胞体ストレス誘導へ与える影響と ASD 病因遺伝子がシナプス機能に与える影響の二つの機序に着目し解析する事で、ASD 共通の治療ターゲット分子を抽出し、治療法開発の手掛かりとする。

3. 研究の方法

【研究】ASD 病因遺伝子変異が小胞体ストレス誘導へ与える影響の解析

遺伝子変異による変異蛋白産生は小胞体ストレスを誘導する。ASD 病因遺伝子による変異シナプス蛋白産生は、神経細胞において小胞体ストレスを誘導し、シナプス機能障害を惹起すると仮説をたてた。ヒト脳神経細胞を直接解析する事は不可能なため、内因性の遺伝子変異をもつヒトリンパ芽球で発現解析を行い、ヒト脳神経細胞での発現を類推した。ヒト脳組織とリンパ球は遺伝子や転写産物が発現に関し脳組織と相同性が高く、リンパ球は中枢神経での遺伝子発現解析の代用として有用である (Sullivan, 2006)。

ASD 病因遺伝子変異を持つ患者リンパ芽球を用い、小胞体ストレス誘導試薬：ツニカマイシンを添加し一定時間培養後、回収した細胞を用いて小胞体ストレスマーカーの発現を解析した。特に *CADM1* 変異および *GPR85* 変異を持つ患者およびその家系内でリンパ芽球を用いた小胞体ストレス感受性解析を行った。

【研究】ASD 病因遺伝子がシナプス機能に与える影響の解析

ASD 共通病態としてシナプス形成不全、シナプスバランスの乱れを想定した。

(1) ASD 病因遺伝子に共通するシナプス病態を検出し、治療ターゲットを検索する。以下の遺伝子に着目する。

- ・ *CADM1* 変異ノックインマウスを用い、シナプス機能解析として、興奮性・抑制性シナプス蛋白の発現を組織蛍光免疫染色および Western blotting を用いて解析した。

(2) 新たな病因遺伝子変異の同定。

- ・ セクレチン受容体遺伝子 (*SCTR*) : セクレチンは神経ペプチドホルモンであり、中枢神経で GABA や dopamine 代謝に関連している。また、シナプス結合に関与している *CADM1* とシナプス後膜で結合している。そのシグナル伝達経路はシナプスバランス維持への関与が示唆される。

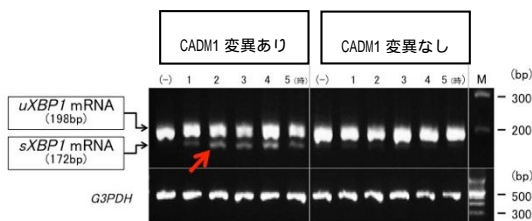
- ・ 新規 ASD 患者のアレイ CGH 解析で copy number variation (CNV) の検出を行なった。

4. 研究成果

【研究】ASD 病因遺伝子変異が小胞体ストレス誘導へ与える影響の解析

CADM1 変異 (H246N, Y251S)、*GPR85* 変異 (M152T) をもつ ASD 患者およびその家系のリンパ芽球を用いて、家系内において遺伝子変異の有無で小胞体ストレス感受性に違いがあることを検出した。

(方法) リンパ芽球に小胞体ストレス誘導試薬 (ツニカマイシン) を $1\mu\text{g/ml}$ 添加し、一定時間培養後、細胞を回収した。小胞体ストレスマーカー *CHOP* mRNA 発現量の変化を、リアルタイムPCR 定量し、変異を持つ患者リンパ芽球では *CHOP* mRNA 発現ピークが早期に現れ、小胞体ストレス感受性が高い事が示唆された。小胞体ストレス下でスプライシングを引き起こす *XBP1* mRNA のスプライシング産物の発現変化の RT-PCR 法での解析 (Fig.1)、小胞体ストレス蛋白質 GRP78 発現の Western blot での解析でも、変異を持つ者のリンパ芽球で小胞体ストレス感受性が高いことを検出した。



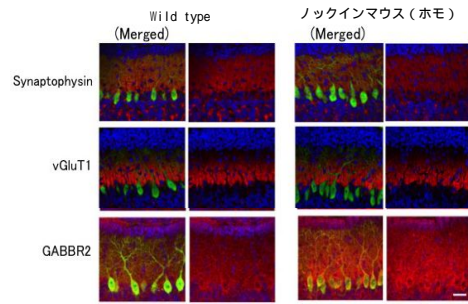
(Fig.1) ツニカマイシン添加後の *CADM1* 変異保有の有無による *sXBP1* mRNA 発現の比較

変異有りのリンパ芽球では *sXBP1* mRNA の増加が見られるが、変異無しでは断片は検出されなかった。

【研究】ASD 病因遺伝子がシナプス機能に与える影響の解析：

(1) ASD 病因遺伝子に共通するシナプス病態の検出：

ASD 病因遺伝子変異ノックインマウスの解析として、野生型 *Cadm1* (WT) マウス及び *Cadm1* 変異ノックインマウス (ホモ) の小脳 (生後10日) における興奮性・抑制性シナプス蛋白の発現を組織蛍光免疫染色および Western blotting により比較した。抑制性シナプスマーカー *GABBR2* が WT と比較し、ホモマウスで強く発現しており、シナプスバランスが抑制性に傾いている事が示唆された。(Fig.2)



(Fig.2) *Cadm1* 変異ノックインマウス生後10日小脳の組織蛍光免疫染色

Red: synaptophysin, vGluT1, *GABBR2*, Green: calbindin, Blue: hoechst (bar: $30\mu\text{m}$)

Synaptophysin: シナプスマーカー。vGluT1 (vesicular Glutamate transporter 1): 興奮性シナプスマーカー。GABBR2 (Gamma-aminobutyric acid B receptor 2): 抑制性シナプスマーカー。

前シナプス小胞に存在する蛋白 Synaptophysin および前シナプスの興奮性シナプスマーカーである vGluT1 は Wild type とホモ間での顕著な差はなかった。一方、後シナプスの抑制性シナプスマーカー *GABBR2* は WT に比較してホモで強く染まっていた。*CADM1* 変異をホモに持つマウスの生後10日小脳では、シナプスバランスが抑制性に傾いていることが示唆された。

(2) 新たな ASD 疾患関連遺伝子変異の解析：

- *SCTR* 変異解析: *SCTR* (P90L, R2C, A245T) の変異を検出し、これらはコントロール群にはなく、ASD 関連遺伝子変異の可能性が高い。

- ASD 患者のアレイ CGH 解析: ASD 患者 27 例のうち、重複1例、欠失1例を認めた。欠失例では11番染色体の短腕 (11p14.3) に父由来の約 2.2Mb の欠失を認めた。その中に *GAS2* (Growth arrest specific 2) という微小管と細胞骨格のアポトーシスを調整する遺伝子が含まれており ASD 関連遺伝子の可能性があり今後解析を進める。

(考察と今後の展望)

*Cadm1*変異ノックインマウスの生後10日小脳は、抑制性シナプスに傾いていることが示された。CADM1は、C端のPDZ結合領域を介し、PDZ領域を持つCASK、MPP3(MAGUK p55 subfamily member 3)、SynteninやMupp1と結合している。Mupp1は、後シナプス膜で興奮性シナプスではSynGAPを介してNMDARとの複合体や5HTR2Cとの複合体を形成し、抑制性シナプスではGABBR2との蛋白質複合体を形成する、またSynteninはGRIP-PICK1-グルタミン酸受容体との結合、MPP3はセロトニン受容体の1つである5HTR2Aとの結合が報告されている。*CADM1*変異があると、これらの蛋白質複合体構成分子または複合体形成に変化が生じ、興奮性・抑制性シナプスの発現に影響を及ぼす可能性が推定される。

ASD 病因候補遺伝子として知られているシナプス接着蛋白質 Neuroligin(NLGN)ファミリーのうちASD患者から同定された*Nlgn3*変異ノックインマウスの免疫染色では、*Cadm1*(Y251S)KIマウスと同様に抑制性シナプスが増加しているとの報告が有り(Krapivinsky, et al.2004)、シナプスバランスが抑制性優位になることは、ASDモデルの共通機構である可能性が高いと思われる。

これらの結果から、遺伝子変異によるASD発症には、変異蛋白質の機能喪失(Loss of function)に加え、変異蛋白質に誘導されるシナプス機能障害(Gain of function)が強く関与し、ASDの病態に小胞体ストレスとシナプス機能のバランスが共通病態として関与する可能性を示した。ASDの治療法開発研究において、小胞体ストレスの制御とシナプスバランスの調整がターゲットとなると考えられる。

今後はさらに*Cadm1*変異ノックインマウスの行動解析を行い、ASD特性とシナプスバランスとの関連性、治療介入による行動変化やシナプス機能変化などを解析することで、ASD治療薬開発への発展が期待できる。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2件)

Karin Kojima, Eriko F. Jimbo, Takanori Yamagata: *CADM1* Mutation Knock-in Mice As Mice Model of ASD Showing Abnormal Excitatory-Inhibitory Synaptic Balance. International Society for Autism Research 2017 Annual Meeting, San Francisco, USA, May 10-14, 2017.

Karin Kojima, Eriko F. Jimbo, Takanori Yamagata: Relationship Between ASD Candidate Gene Mutations And Endoplasmic Reticulum Stress. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Taipei, Taiwan, 14-17 May 2015.(Best Poster Award受賞)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小島 華林 (KOJIMA, Karin)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：00468331