

平成30年6月6日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21319

研究課題名(和文) シナプス機能障害マウスを用いた新規発達障害モデルの検討・解析

研究課題名(英文) Validation of PSD-Zip70 knockout mice as a novel mouse model for neurodevelopmental disorder.

研究代表者

真柳 平 (Mayanagi, Taira)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：20432544

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)：前頭前皮質を中心としたシナプス成熟異常を示すPSD-Zip70欠失マウスの行動特性の解析を行い、同じくシナプス機能障害が関与する自閉症スペクトラム障害(ASD)などの発達障害様の表現型について検証した。その結果、社会性行動や常同性などASD様行動異常は認められず、その一方で強い不安傾向を示すことを明らかにした。さらに社会性ストレス負荷への応答性を検証し、PSD-Zip70欠失マウスではストレス負荷が不安傾向をより増悪させた。これらの結果からPSD-Zip70欠失は不安の発現に深く関与し、病的な不安を伴う気分障害、不安障害の病態解明に有用な実験系となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Postsynaptic protein PSD-Zip70 knockout (PSD-Zip70KO) mice possess defects in glutamate synapse transmission in the prefrontal cortex (PFC). To evaluate whether PSD-Zip70KO mice can be used as a model for neurodevelopmental disorders such as autism spectrum disorder (ASD), we investigated their behavioral traits. As a result, PSD-Zip70KO mice did not exhibit stereotypical behavior or social ability defect, as typical ASD-like behavior. On the other hand, PSD-Zip70KO mice exhibited anxiety even without stress, and the trait was exacerbated by SD stress. Rap2 was activated and phosphorylation level of AMPA receptor GluA2 subunit at Ser880 was prominently elevated in SD-stressed mice, which leads internalization of surface-expressed AMPA receptors and decreases postsynaptic responsiveness. The PSD-Zip70-Rap2-related PFC hypofunction is involved in specifically social stress-induced anxiety. Our finding would provide valuable basis to analyze the mechanism for expression of anxiety.

研究分野：神経科学

キーワード：PSD-Zip70 前頭前皮質 シナプス 発達障害 行動解析 ノックアウトマウス 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

神経細胞間で形成されるシナプスは神経回路網の基本単位であり、シナプスの形成・維持および機能制御のメカニズムは複雑な脳の機能を理解する上で必要不可欠な重要課題である。主要な興奮性神経伝達物質グルタミン酸による興奮性シナプスは樹状突起上の微小突起（スパイン、棘突起）上に形成される（図1）。発生過程でスパインはその数と形態を変化させ、神経回路形成とシナプスにおける刺激応答性に可塑性をもたらしている。記憶や学習の基盤となるシナプス可塑性の例として知られる長期増強（LTP）や長期抑制（LTD）において、スパインの形態・機能制御とシナプス部位に表出するグルタミン酸受容体の数および反応性の変化が深く関与している。

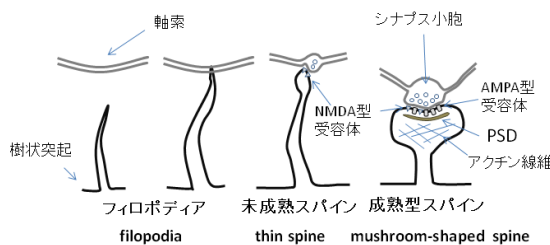


図1. シナプス形成におけるスパインの形態的变化
フィロポディアと呼ばれる樹状突起から形成された突出構造は軸索繊維と接触することによりシナプスが形成される。シナプス未成熟時には thin spine という頭部が小さく基部が長い形態を示す。シナプス構造が成熟するとともに頭部はアクチン線維と PSD により裏打ちされて安定化し、表出受容体の増加により伝達効率が上昇する。

近年、発症の分子基盤が未解明であった発達障害および精神疾患の発症にシナプス機能の障害が深く関与することが知られるようになり、シナプス機能の制御が一躍注目を集めている。自閉症スペクトラム障害（ASD）などの発達障害や脆弱性X症候群の精神遅滞患者剖検脳では、スパイン形態や密度に異常が生じていることが明らかになった（図2、Hutsler and Zhang, Brain Res. 2010; 1309: 83, Irwin et al. Cereb. Cortex. 2000; 10: 1038）。ASD では遺伝的素因が発症に深く関与することが知られており、近年のゲノム解析により精神疾患・発達障害の原因候補遺伝子として報告されたものはシナプス・スパイン制御に関わるものが大部分を占めているこ

とは示唆に富んでいる（Penzes et al. Nat. Neurosci. 2011; 14: 285）。その中の1つ、PSD主要構成因子である Shank(Shank1,

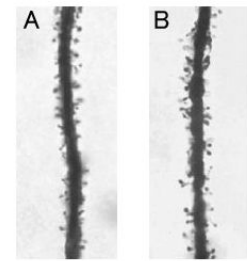


図2. 自閉症剖検脳で認められるスパイン異常 ヒト前上頭回領域錐体神経細胞のゴルジ染色像。A. 正常、B. ASD。(Hustler et al. 2010 より一部拡大)

-2, -3)はASDの原因候補遺伝子として注目されており、構造的基盤かつシグナル伝達の場として重要な PSD における役割の解析が進められている（Jiang and Ehlers, Neuron 2013; 78: 8）

我々は PSD に存在するタンパク質として PSD-Zip70 を同定し、その機能を解析してきた(Konno et al. J. Cell Sci. 2002; 115: 4695, Maruoka et al. J. Neurosci., 2005; 25: 1421, Wendholt et al. J. Biol. Chem. 2006 281: 13805)。PSD-Zip70 は神経細胞樹状突起上のスパインに局在し、海馬と大脳皮質（特に前頭前野：PFC）で発現が高い。最近、新たな PSD-Zip70 の結合タンパク質として前出の ASD 原因候補遺伝子由来 PSD タンパク質 Shank3 を見出しており、この両者の機能的相互作用が強く示唆される。

我々は個体レベルでの解析を行うため PSD-Zip70 欠失マウス (PSD-Zip70KO マウス) を作成し解析した結果、PSD-Zip70 KO では PFC の錐体神経細胞樹状突起において細長いスパインが高頻度に認められた（図3左）。この異常は初代培養皮質神経細胞でより著明であり、頭部が小さく細長い未成熟な形態を示した（図3右）。これらの結果は、ASD 患者のスパイン形態的異常と極めて類似して

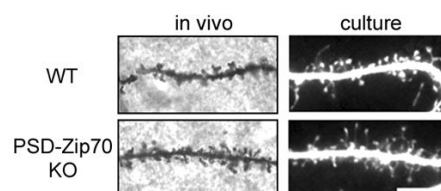


図3. PSD-Zip70 欠損によって認められるスパイン異常
左) 前頭前野皮質のゴルジ染色
右) 初代培養皮質神経細胞の GFP 蛍光像

いる(図2)。電気生理学的解析と生化学的解析により、PSD-Zip70KO マウスでは AMPA 型グルタミン酸受容体を表出する成熟したシナプス密度が低いことが判明した。さらに PSD-Zip70KO マウスの神経細胞では、グルタミン酸受容体の動態制御に関わる低分子 G タンパク質 Rap2 の活性亢進が起こっていることを突き止めた (Mayanagi et al. J Neurosci. 2015; 45: 14327)。次いでこの現象は、PSD-Zip70 結合タンパク質として我々が同定した SPAR (Spine associated RapGAP) の機能不全および RapGEF (Rap 活性化因子) である PDZGEF1/2 の活性亢進によることを明らかにした。Rap2 に関しては別の RapGEF である EPAC2 が ASD の原因候補遺伝子として報告されている (Bacchelli et al. Mol. Psychiatry 2003; 8: 916)。以上の結果は、PSD における Shank3 と PSD-Zip70 の相互作用と PSD-Zip70/SPAR/PDZGEF から Rap2 につながる活性調節が ASD の発症に関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

中枢神経のシナプス機能の異常は発達障害・精神疾患の発症に関与している。我々はシナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) タンパク質 PSD-Zip70 が低分子 G タンパク質 Rap2 の活性調節を介してシナプス機能を制御することを解明してきた。作成した PSD-Zip70KO マウスは前頭前野 (PFC) を中心にシナプス機能の異常を認めた。本研究は PSD-Zip70KO マウスを用いた行動および分子的解析と臨床検体を用いた解析により、PSD-Zip70 の発達障害への関与の検証とシナプス機能障害による新規マウスモデルの確立を目的とする。自閉症スペクトラム障害 (ASD) 原因候補遺伝子 Shank3 と、同じく ASD 候補遺伝子 EPAC2 の下流因子 Rap2、これまで接点を持たないこの2つの因子を PSD-Zip70 が結びつけている可能性があり、これら重要

因子に注目して発達障害発症の分子メカニズム解明を試みる。

PSD-Zip70KO マウスを用いた解析が発達障害のモデルとなるか判断できることを到達目標とする。連携させて進めるシナプス機能制御の分子メカニズムの解析がその判断を助け、本研究が発達障害および関連精神疾患の理解について、より重要な知見を与えることができるものになる。

3. 研究の方法

本研究課題では以下の3種のアプローチによって、PSD-Zip70 によるシナプス機能制御と発達障害・精神疾患の病態との関わりについて解明を目指す。研究期間は3年間を予定する。

PSD-Zip70 欠失が行動に及ぼす影響を解析 : PSD-Zip70KO マウスを用いて認知・記憶・学習・不安・社会性などについての行動解析を行い、表出した行動特性から脳機能における PSD-Zip70 の役割を明らかにする。

PSD-Zip70 欠失によるシナプス異常の分子メカニズムの解析 : PSD-Zip70 による Rap2 活性制御経路と、PSD-Zip70 結合タンパク質 Shank3 (ASD 原因候補遺伝子) との関係について注目し、分子レベルでのメカニズム解明を目指す。

臨床検体を用いた PSD-Zip70 と疾患の関連性の解析 : ASD を始めとする PSD-Zip70 の関与が示唆される発達障害について、臨床データおよび患者からの脳組織検体を用いた解析を行い、疾患発症・病態における PSD-Zip70 の関与について研究する。

4. 研究成果

前頭前皮質のシナプス成熟不全を示す PSD-Zip70 遺伝子破壊 (PSD-Zip70KO) マウスの行動解析から PSD-Zip70 欠失が不安傾向、作業記憶および認知機能の障害を引き起こすことを見出した (Mayanagi et al. J

Neurosci. 2015; 45: 14327)。さらに ASD (自閉症スペクトラム障害) などの発達障害に見られる行動特性として社会性、常同行動について、また、うつ病に見られる行動特性として抑うつ行動、快感喪失、無気力性に注目した解析を行った。ASD、うつ病に認められる行動特性の多くに対して PSD-Zip70 欠失は大きな影響を及ぼさないという結果となった。行動異常の中で顕著であった不安傾向について注目し、不安障害、感情障害発症の起因となるストレス負荷との関係についてさらに解析を進めた。その結果、PSD-Zip70 欠失に加えてストレス負荷がかかると、不安傾向の増悪が認められた。これらの結果は PSD-Zip70 欠失マウスは ASD など発達障害に見られる行動特性は示さず、強い不安傾向とストレスに対する脆弱性といった不安障害様の特性を持つことを示唆した。

PSD-Zip70KO マウスの行動特性は ASD など発達障害様とは言えないことから、臨床検体を用いての解析については ASD 患者ではなく、不安行動への関係性が強いうつ病患者に関して解析を進めた。過去の論文における発現解析データベースの検索を進めた上で、臨床検体を用いた解析を進めた

また、PSD-Zip70 はグルタミン酸刺激によって速やかに神経細胞内における細胞内局在を変化させることを見出した。PSD-Zip70 は Rap2 の活性化因子 PDZ-GEF1/2 および不活性化因子 SPAR のいずれとも結合しており、その活性制御に重要な役割を果たしていることを明らかにしている (図 4)。

PSD-Zip70 の局在変化はシナプス刺激による Rap2 活性変化に重要であることを明らかに

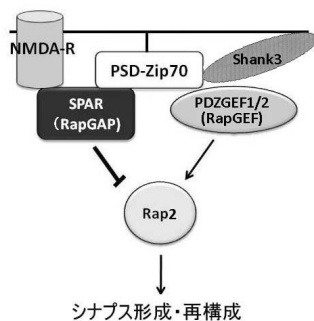


図 4. PSD-Zip70によるRap活性調節を介したシナプス形成・可塑性制御

した。局在変化に関わる PSD-Zip70 結合タンパク質を新規に複数種類同定し、刺激応答における制御機構について詳細に解析を行った。PSD-Zip70 は刺激依存的に結合タンパク質を変化させ、Rap2 活性変化と AMPA 型グルタミン酸受容体動態を介してシナプス応答の可塑性に関与するメカニズムを明らかにした。さらにストレスに起因するシナプス機能低下と不安行動において、前頭前皮質での PSD-Zip70 が介在する Rap2 活性化が関与することを明らかにした (図 5)。

不安はうつ病などの気分障害、PTSD、パニック障害などの不安障害などストレスが引き金となる精神疾患に関わりが深い。今回、本

研究課題によって不安の発現には Rap2 活性化を伴う前頭前皮質のシナプス伝達異常が深く関与することが明らかになった。当初、シナプス形成・成熟の障害から想定した ASD などの発達障害との関連については否定的な結果となったが、PSD-Zip70 欠失による影響が不安に特異的に強く影響することは予想外ながら非常に興味深い結果である。不安の制御については、前頭前皮質が抑制的に働いている他に扁桃体の重要性など脳機能領域、回路についての解析は進められているが、それらの場所の神経細胞機能の変化について分子レベルで解析された例は少ない。シナプス障害を伴う前頭前皮質の機能低下が不安の発現についてどのように影響するのか解析する上で優れた実験系となる。本研究課題による成果を基盤としてさらに解析を進め、病的な不安を伴う精神疾患の発症・病態の分子機構の

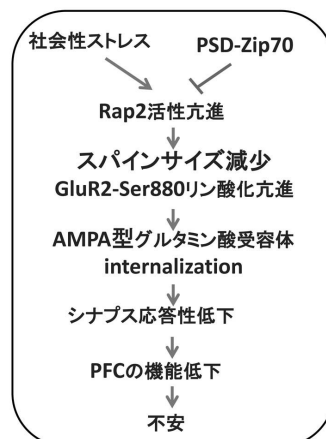


図 5. 社会性ストレスによる不安の発現には Rap2 活性化を伴う前頭前皮質の機能低下が関与する

解明および新たな治療法、創薬へとつながることが期待される。

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4件)

1. Takashi Suzuki, Kazuyoshi Nakamura, Taira Mayanagi, Kenji Sobue, Manabu Kubokawa. Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor 1 is required for ROMK1 K⁺ channel expression in the surface membrane of cultured M-1 cortical collecting duct cells, (2017) Biochemical and Biophysical Research Communications.489(2): 116-222. (査読有)
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.104.

2. Takayuki Kishi, Taira Mayanagi, Sadahiro Iwabuchi, Toshihide Akasaka, Kenji Sobue. Myocardin-related transcription factor A (MRTF-A) activity-dependent cell adhesion is correlated to focal adhesion kinase (FAK) activity. (2016) Oncotarget. 7(44): 72113-72130. (査読有)
doi: 10.18632/oncotarget.12350.

3. Toshinari Mita, Taira Mayanagi, Hiroshi Ichijo, Kentaro Fukumoto, Kotaro Otsuka, Akio Sakai, Kenji Sobue. Docosahexaenoic Acid Promotes Axon Outgrowth by Translational Regulation of Tau and Collapsin Response Mediator Protein 2 Expression. (2016) Journal of Biological Chemistry. 291(10): 4955-4965. (査読有)
doi: 10.1074/jbc.M115.693499.

4. Taira Mayanagi, Hiroki Yasuda, Kenji Sobue. PSD-Zip70 Deficiency Causes Prefrontal Hypofunction Associated with Glutamatergic Synapse Maturation Defects by Dysregulation of Rap2 Activity. (2015) Journal of Neuroscience. 35(42): 14327-14340. (査読有)
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2349-15.2015.

〔学会発表〕(計2件)

1. Taira Mayanagi, Kenji Sobue Involvement of Rap2-mediated prefrontal dysfunction in social stress-induced anxiety. (ポスター発表) 第41回日本神経科学大会 2018年7月28日 神戸.

2. 真柳 平、祖父江 憲治 ストレス起因性の不安における Rap2 活性化を伴う前頭前皮質の機能低下の関与 (ポスター発表) 日本生化学会東北支部会 第84回例会 2018年5月19日 矢巾.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

1. 名称:「PSD-Zip70遺伝子ノックアウト非ヒト動物」

発明者:祖父江憲治、真柳 平

権利者:岩手医科大学

出願番号 「特願2013-087731」

出願年月日:平成25年4月18日

国内外の別:国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

岩手医科大学医歯薬総合研究所 HP

<http://www.iwate-med.ac.jp/research/sai-sentan/sobue/>

ResearchGate

https://www.researchgate.net/profile/Taira_Mayanagi

6 . 研究組織

(1)研究代表者

真柳 平 (Mayanagi. Taira)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号 20432544