

令和元年6月10日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07034

研究課題名（和文）CRMP4 タンパク質が関わる脳の性差についての研究

研究課題名（英文）CRMP4 is involved in forming sex differences in the brain

研究代表者

金子 律子（大谷律子）（Ohtani-Kaneko, Ritsuko）

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：00161183

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：以前の我々の研究により、CRMP4がAVPVの性差形成に関与することを見出した。さらに、whole-exome sequencingにより自閉症患者の男性にCRMP4の1か所のみ点変異が見つかった。自閉症は、発現頻度や症状に明確な男女差が認められる症候群である。さらに、CRMP4欠損マウスを用いた実験から、種々の感覚試験異常、社会性行動低下、遺伝子発現変化、培養神経細胞の突起伸長異常が見つかり、その多くはメスよりオスで異常や変化が激しかった。本研究により得られた結果から、遺伝子発現および突起伸長変化を介してCRMP4が脳の雌雄差形成に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、発生頻度や症状に男女差が激しいことで知られる自閉症の発症に、CRMP4の変異が関わる場合があることを見出した。さらに、CRMP4欠損マウスでは、自閉症患者で示されている（あるいは診断基準になっている）特徴が数多く見られ、それらの殆どに雌雄差が見られた（人間の場合と同様、オスの方が特徴が出やすかった）。自閉症の原因遺伝子はこれまでに大変沢山知られているが、それらに共通のメカニズム解明に本研究は大きく寄与するものである。さらに、「脳の性差がどのように形成されるか」について、今後メカニズム解明を進める上で、CRMP4欠損マウスが極めて有用なモデル動物となることを示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Previous our researches have demonstrated that the collapsin response mediator protein 4 (CRMP4) is involved in the formation of sex difference in the AVPV in the preoptic area. We revealed, with a whole-exome sequencing, a de novo variant (S541Y) of CRMP4 in a male patient with autism spectrum disorder (ASD). In addition, we showed that Crmp4-knockout (KO) mice have some phenotypes similar to those observed in human patients with ASD. Compared with wild-type mice, Crmp4-KO mice exhibit impaired social interaction, abnormal sensory sensitivities, broader distribution of activated (c-Fos expressing) neurons, altered dendritic formation, and aberrant patterns of neural gene expressions, most of which have sex differences. These our studies provide Crmp4-KO mice as an appropriate animal model for investigating the mechanisms underlying not only some ASD phenotypes but also sex-biased differences,

研究分野：神経生物学

キーワード：脳 性差 CRMP4 自閉症 社会性行動 感覚異常 樹状突起異常

1. 研究開始当初の背景

【1】研究開始当初の国内・外の研究動向

(1) 視床下部・視索前野領域に、性周期、性行動の調節に重要であると考えられる神経核が存在し、それらの神経核は機能だけでなく形態的にも雌雄差が認められる「性的二型核」であることが広く知られている。形態的雌雄差形成には、アポトーシス、細胞移動、突起伸張およびシナプス形成に対する性ステロイドホルモンの制御が関わると考えられている。

(2) 一方、軸索の成長円錐の制御に関わるタンパク質として CRMP2 が本研究分担者である五嶋らによって発見されて以来、CRMP ファミリーに属するタンパク質 (CRMPs1-5) が神経系の発達・再生に深く関わっていることが示されつつある。CRMPs が統合失調症や自閉症など発達障害に関係するとの報告も近年出されている。

しかし、(A)と(B)の両者を結び付けた「性差のある発達障害の発症メカニズム解明」に関する研究はこれまでまったくなされていなかった。

【2】これまでの研究 ((1), (2)は上記の(1), (2)にそれぞれ対応する)

(1) 脳の性差形成に関する研究代表者の研究概要

平成 17~20 年に特定領域研究「性分化機構の解明」に採択され、(A)in vitro 系での臨界期シナプス形成に及ぼす E2 の影響と機構についての研究、及び(B)性差神経回路形成に関わる蛋白質のプロテオミクス解析による in vivo での探索、を行った。

その結果、性的二型核 (前腹側脳室周囲核、AVPV) の性差形成時期に時期・部位特異的に、発現に蛋白レベル・mRNA 共に発現レベルに有意な雌雄差を持つ性差形成蛋白質を見出した。そのうちの 1 つは Collapsin Response Mediator Protein (CRMP) ファミリーの CRMP4 であった (Iwakura et al., Dev. Neurobiol. 2013)。

(2) CRMP4 の機能に関する研究代表者の研究概要 (嗅球と視床下部を中心として)

CRMP4 の基礎的知見や CRMP4 ノックアウト (CRMP4-KO) マウスを用いた研究から、本研究代表者は以下の ~ の事象を発見した。

CRMP4 mRNA は生後 0~1 週に多くの脳部位で最も強く発現する (Tsutiya & Ohtani-Kaneko, J. Anatomy, 2012)。

二次元電気泳動とそれに続くウェスタン解析により、野生型マウス脳で生後 0~7 日で発現が顕著に変化する CRMP4 のスポットを発見し、質量分析からそのリン酸化修飾部位を明らかにした。このリン酸化部位が CRMP4 の機能発現に重要と考えられる (米国神経科学会、2015)。

CRMP4 欠損 (KO) マウスの AVPV では Kiss ニューロン数は雌雄差に影響がなく、ドーパミン作動性 (TH) ニューロン数は雌雄差が拡大した (Iwakura et al., Dev. Neurobiol., 2013)。

CRMP4-KO オス・マウスの層の厚さ、僧帽細胞層の細胞密度や樹状突起の長さについて、野生型と比較して有意な違いがあった (Tsutiya et al., J. Anatomy, 2016 (申請当初は論文未発表))。

野生型と CRMP4-KO マウス嗅球間で様々な神経伝達物質受容体や合成酵素の発現を調べたところ、CRMP4-KO オスではグルタミン酸受容体 (GluR1 と 2) の発現が mRNA および蛋白質レベルで有意に増加した (Tsutiya et al., Eur. J. Neurosci. 2015)。

単一刺激を与えた時、誘起される興奮ニューロン (c-Fos 陽性細胞) が野生型のように 1 箇所に限らず、広範囲に亘って嗅球内に存在する (Tsutiya et al., Eur. J. Neurosci. 2015)。

CRMP4-KO オス仔マウスでは匂いの識別能力が低下していた (同上、2015)。

2. 研究の目的

本研究では研究期間内に、CRMP4 遺伝子欠損オスマウスで観察された形態的变化 () および雄で発見された嗅覚に関する変化 (~) をもとに、CRMP4 の機能と性差への関与について in vivo でさらに詳細に解析すると共に、CRMP4 欠損マウスを自閉症モデル動物として用いることが妥当か、自閉症の性差研究を含めた脳の性差形成研究に用いることが妥当か検証する。さらに、培養細胞を用い、CRMP4 の有無や変異が、突起形成にどのように影響するか明らかにし、CRMP4 の機能について基礎的所見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

【in vivo の実験】

(1) CRMP4 欠損マウスおよび野生型マウスの雌雄を用いて、種々の行動実験および感覚実

験を行い、その異常および性差を調べた。行動実験では、不安、記憶、運動能力、社会性行動について6週および10週の雌雄マウスを用いて解析した。感覚については、嗅覚、温度感覚について、生後7日の仔マウスの超音波発声回数(母親を呼ぶ回数)を元に、刺激に対する反応を解析した。

(2)雌雄のCRMP4欠損マウスと野生型マウスの大脳皮質、海馬、嗅球について、GABAやグルタミン酸作動性シナプスに關与する合成酵素やトランスポーターや受容体の遺伝子発現をリアルタイムqRT-PCR法により比較した。

【*in vitro*の実験】

野生型およびCRMP4欠損マウスの海馬を生後0日に摘出し、細胞を単離後、培養し、野生型由来細胞にはGFPベクターを導入、CRMP4欠損マウス由来細胞にはGFPベクター、GFP-CRMP4ベクター、またはGFP-CRMP4点変異(ヒト自閉症患者で見出したのと同部位の点変異)ベクター、のいずれかを導入する。GFPを発現している細胞のうち、僧帽細胞と思われるニューロン(MAP2で染色後、細胞体のサイズを計測して判断)の樹状突起長および分枝数を計測した。

4. 研究成果

CRMP4欠損による行動学的異常はこれまで見つかっていなかった。我々は世界で初めて、CRMP4-KOマウスが匂いに対する反応や温度感覚、およびsocial interaction行動に異常があることを見出した。しかもこれらの異常には、明瞭な雌雄差があることを今回初めて見出した(Tsutiya et al., 2017年、Scientific Reports)。Social interaction test(ヤングアダルト個体で実験)をThree chamber testで調べたところ、雌のCRMP4欠損マウスと野生型の雌雄マウスと異なり、雄のCRMP4欠損マウスでは、active interaction(Strangerネズミの匂いを嗅ぐ時間)よりObjectの匂いを嗅ぐ時間が長いという結果を得た(図1、Scientific Report 2017年12月)。記憶能力や不安については、雌雄とも野生型と異なる行動は検出されなかった。感覚については、生後7日の仔マウスを用いて実験した。自分の巣の匂いと真新しい敷き藁の違いを認識しているか、超音波発声により調べた(通常、自分の巣の場合は、超音波発声で母親を呼ぶ回数が少ないが、異なる匂いを嗅ぐと超音波発声回数が増加する)。雄のCRMP4欠損マウスでは、両方の敷き藁に対して超音波発声回数に有意差が無かった。一連の超音波発声回数を調べた実験から、雄のCRMP4欠損マウスは、雌雄の野生型マウスや雌のCRMP4欠損マウスより、嗅覚識別能力が劣っている(同程度に超音波発声を行う)ことが分かった。さらに、異なる複数の温度環境に仔マウスを置いたところ、雌雄の野生型マウスと雌のCRMP4欠損マウスは、似たパターンの超音波発声を示した。しかし、雄のCRMP4欠損マウスでは、全く異なるパターンの超音波発声を示した。

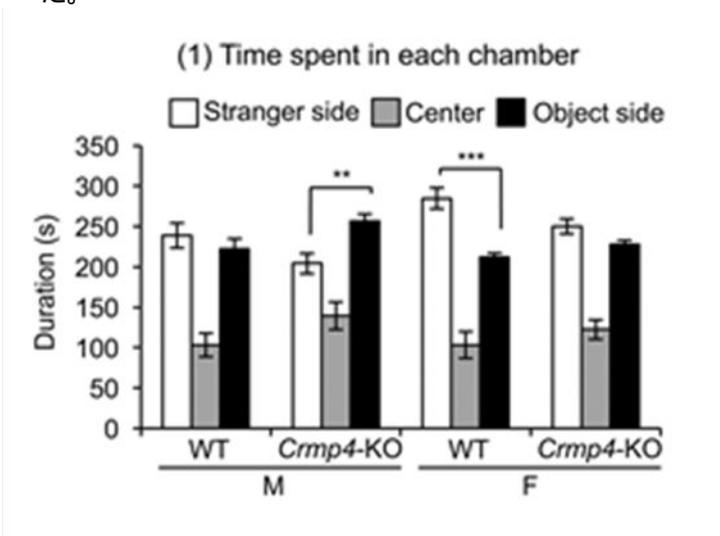


図1 Three Chamber Testの結果(Tsutiya et al., Scientific Reports, 2017)

遺伝子発現について21遺伝子について調べたところ(Supplementary Table S5)興奮性シナプスに關連する幾つかの遺伝子に野生型マウスとCRMP4欠損マウスとの間に有意差が存在し、しかもこれらの多くには雌雄差も生じていた(詳細は、下記にサイトを掲載した論文のTable 1およびSupplementary Table類に纏められている)。

*In vitro*の実験では、海馬錐体細胞の樹状突起が、野生型マウス由来のものより、CRMP4欠損マウス由来では有意に長くなり分枝数も有意に増加することが明らかとなった。さらに、

CRMP4 にヒト自閉症患者で見られた変異を起こして CRMP4 欠損マウス由来の細胞に導入した場合は、野生型マウス由来の細胞より突起長は長くなる傾向が見られ、また分枝数は有意に増大した。さらに、野生型 CRMP4 を同上に導入した場合は、野生型と同等の突起長および分枝数となった。以上から、CRMP4 の変異および欠損は、ニューロンの突起を正常より伸長・分枝させることが明らかとなった（添付論文の Fig. 同様の結果は、株化細胞（HT22 細胞や PC12 細胞）でも見られた。

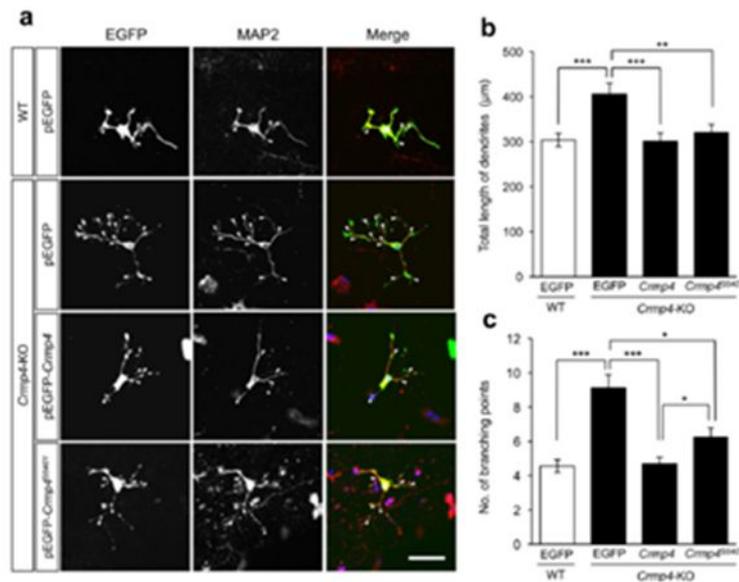


図 2 CRMP4 培養海馬錐体の突起長と突起分枝数

野生型マウス由来(EGFP 導入)、CRMP4 欠損マウス由来(EGFP 導入、EGFP-野生型 CRMP4 導入、EGFP-変異 CRMP4 導入)(Tsutiya et al., 2017)

以上の研究から、CRMP4 の欠損マウスは、社会性の低下や感覚異常という自閉症様症状の幾つの特徴を示すこと、またこれらの症状には雌雄差が存在し、雄の方が雌より症状が明確であることが分かった。また、ニューロンの樹状突起伸長(突起および分枝)も CRMP4 欠損により異常となること、および自閉症で見つかったのと同様の点変異を起こした CRMP4 を発現させた場合にもニューロンの突起が有意に増える事が分かった。(突起伸長は有意差ではないが、CRMP4 点変異により増加傾向を示した)。

さらに、興奮性神経伝達に関わる遺伝子発現が調べた部位(海馬、皮質、嗅球)では、野生型に比べ CRMP4 欠損マウスでは増加する事が分かった。この変化は、部位によって異なり、またこれら変化した遺伝子発現には多くの場合、雌雄差が見られた。

これらの結果や、これまでに得られた結果は、CRMP4 が脳の性差形成に関与することを支持するデータであった。さらに本研究では、全トランスクリプトーム解析から、CRMP4 の点変異のみ異常を持つ自閉症患者が見つかった。このことから、CRMP4 欠損マウスが自閉症様の特徴を示すか行動および感覚実験を行って調べた。その結果、CRMP4 欠損マウスが、自閉症の発症メカニズム解明に適したモデル動物となることや、自閉症の雌雄差が生じるメカニズムについても解明する手掛かりを与えてくれるモデル動物であることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tsutiya A, Watanabe H, Nakano Y, Nishihara M, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. Deletion of collapsin response mediator protein 4 results in abnormal layer thickness and elongation of mitral cell apical dendrites in the neonatal olfactory bulb. *J Anat.* 2016, 228:792-804. doi: 10.1111/joa.12434. (査読有)

Tsutiya A, Nakano Y, Hansen-Kiss E, Kelly B, Nishihara M, Goshima Y, Corsmeier D, White P, Herman GE, Ohtani-Kaneko R. Human CRMP4 mutation and disrupted *Crmp4* expression in mice are associated with ASD characteristics and sexual dimorphism. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1):16812. doi: 10.1038/s41598-017-16782-8. (査読有)
本論文のサイト

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5711804/>

本論文 PDF 版

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5711804/pdf/41598_2017_Article_16782.pdf

この論文の Supplementary files は、以下のサイトに掲載されている。

https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1038%2Fs41598-017-16782-8/MediaObjects/41598_2017_16782_MOESM1_ESM.pdf

〔学会発表〕(計 6 件)

中野 結、土屋 貴大、Hansen-kiss Emily、Kelly Benjamin、西原 真杉、五嶋 良郎、White Peter、Herman E Gail、大谷-金子 律子：自閉症患者の Whole exome sequencing と CRMP 4 ノックアウトの表現型解析から、CRMP 4 欠損と ASD との関連が示された。 Whole exome sequencing of a patient with ASD and phenotyping of CRMP4-KO mice revealed the relationship between CRMP4 deficiency and ASD、第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜 (横浜、日本)、2016 年 7 月 22 日

Yui Nakano、Atsuhiko Tsutiya、Masugi Nishihara、Yoshio Goshima、Ritsuko Ohtani-kaneko： Behavioral and gene expression analyses on CRMP4-KO mice revealed sexual different disorders in CRMP4-KO mice、the 22nd International Congress of Zoology、the 87th meeting of Zoological Society of Japan、Okinawa Convention Center (Okinawa、Japan) 2016 年 11 月 17 日、18 日

Y. NAKANO、A. TSUTIYA、E. HANSEN-KISS、B. J. KELLY、M. NISHIHARA、Y. GOSHIMA、D. CORSMEIER、P. WHITE、G. E. HERMAN、R.OHTANI-KANEKO： Studies using Crmp4-KO mice show the functional relevance of Crmp4-deficiency to some symptoms of ASD、Neuroscience 2017、Walter E. Washington Convention Center (Washington D.C, USA) 2017 年 11 月 13 日

野間 爽也佳、中野 結、吉津 葵、土屋 貴大、大谷-金子 律子、CRMP4 遺伝子欠損がマウス扁桃体内側核の遺伝子発現に及ぼす影響—マイクロダイゼクションによる RNA 抽出方法の検討—、日本動物学会 第 88 回 富山大会 2017、富山県民会館 (富山、日本) 2017 年 9 月 21 日

毛利彩乃、吉津葵、蓮田拓郎、大谷-金子律子、CRMP4-Knockdown が PC12 細胞の突起伸長と生存率に及ぼす影響。日本動物学会 第 89 回 札幌 (地震のため東京に変更) 2018 東京大学、2018 年

塩野鈴佳、中野結、大谷-金子律子、Collapsin Response Mediator Protein 4 (CRMP4) 遺伝子欠損が他の CRMP4 ファミリーの遺伝子発現に及ぼす影響。日本動物学会 第 89 回 札幌 (地震のため東京に変更) 2018 東京大学、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.toyo.ac.jp/~r-kaneko/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：五嶋 良郎

ローマ字氏名：Yoshio Goshima

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 00153750