

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07452

研究課題名(和文) 脈絡叢特異的CAMDIノックアウトマウスを用いた自閉症様病理との関連解析

研究課題名(英文) Association analysis with autism-like pathology using choroid plexus-specific CAMDI knockout mice

研究代表者

福田 敏史 (Fukuda, Toshifumi)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：50372313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脈絡叢特異的CAMDIノックアウトマウスを作製し、組織学的・行動学的な解析を行うことで自閉症病理との関連を解析した。CAMDIは微小管骨格を安定化し中心体の成熟を制御することを報告している。RNA-seq法の結果、「細胞移動に関する線毛運動」「微小管を基軸にした運動」などで遺伝子発現の減少が認められた。また、分化・成熟マーカーであるトランスサイレチンの発現低下が認められた。脈絡叢特異的CAMDIノックアウトマウスの行動学的解析を行ったところ、社会的接触や社会的認知の低下が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達障害の要因として神経細胞の移動やスパインの形成に関与する蛋白質や抑制性神経やオリゴデンドロサイトの不全、脳内炎症などに着目した研究が多く主流である。胎生期の脈絡叢の成熟や脳実質への影響と発達障害を結びつける実験的な証明はほとんどなされていない。ヒトの臨床像から示唆される発達障害の要因について「脈絡叢の未成熟」の視点から取り組むことで、発達障害の病理に新しい知見をもたらすことが考えられる。

研究成果の概要(英文)：We generated choroid plexus-specific CAMDI knockout mice and analyzed their relationship with autism pathology by conducting histological and behavioral analyses. CAMDI reportedly stabilizes the microtubule and regulates centrosome maturation. As a result of the RNA-seq method, gene expression was decreased in "ciliary movement related to cell migration" and "microtubule-based movement". In addition, decreased expression of transthyretin, a differentiation/maturation marker, was observed. Behavioral analysis of choroid plexus-specific CAMDI knockout mice showed decreased social interaction and cognition.

研究分野：神経生物学

キーワード：脈絡叢 自閉症 発達障害 社会性 線毛 中心体 CAMDI

1. 研究開始当初の背景

自閉症などの発達障害は、脳の発生期における様々な異常が原因であると考えられている。大脳皮質の神経細胞の移動異常は発達障害の原因の一つと考えられており、細胞移動に関与する蛋白質の分子レベルでの機能解析は発達障害の発症メカニズムの解明に重要である。現在までに申請者は新規蛋白質 CAMDI が統合失調症関連蛋白質 DISC1 と結合し、胎児大脳の神経細胞移動を制御していることを明らかにした (Fukuda T. et al., *J. Biol. Chem.* 2010)。CAMDI ノックアウトマウスを作成し解析を行ったところ、神経細胞の移動異常と、自閉症様の行動 (多動、繰り返し行動、新規環境への適応不全) を見出した。さらに、CAMDI は HDAC6 と結合して脱アセチル化活性を抑制するため、ノックアウトマウスでは HDAC6 の過剰な活性化が認められた。さらに CAMDI ノックアウトマウスの胎生期に HDAC6 特異的阻害剤 (Tubastatin A) を母体に投与することで、神経細胞移動とともに自閉症様行動の一部が回復することを申請者は明らかにした (Fukuda T. et al., *EMBO Rep.* 2016)。

自閉症などの発達障害は、脳の発生期における様々な異常が原因であると考えられている。大脳皮質の神経細胞の移動異常は発達障害の原因の一つと考えられており、細胞移動に関与する蛋白質の分子レベルでの機能解析は発達障害の発症メカニズムの解明に重要である。自閉症様行動を示す全身 CAMDI ノックアウトマウスを用いた網羅的な遺伝子発現解析の結果、脈絡叢に発現する遺伝子の発現レベルの大幅な低下が認められた。これらのことから、脳の形成期における脈絡叢の成熟の異常が発達障害に関与する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスを作製・解析することで、脈絡叢の異常による自閉症の病理を組織学と発生学、行動学の面から解明することを目的とした。

3. 研究の方法

脈絡叢特異的に Cre 遺伝子を発現できる FoxJ1-CreERT2 マウスと CAMDI flox/flox マウスを掛け合わせることで、脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスの作製を行った。組織免疫染色、網羅的な遺伝子発現解析 (RNA-seq)、qRT-PCR 法、社会性を評価する社会性認知試験を中心とした行動学的解析を行なった。

4. 研究成果

(1) 脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスの組織学的解析

全身 CAMDI ノックアウトマウスは大脳皮質神経細胞の移動異常を示すことが明らかとなっている。一方、脈絡叢の異常と脳実質の現象である神経細胞移動との関連を示す報告は認められない。脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスにおいて、神経細胞移動の異常が認められなければ、脈絡叢の異常による影響を反映していると考えられる。

FoxJ1-CreERT2 マウスと CAMDI flox/flox マウスを掛け合わせて胎生 15.5 日 (E15.5) にタモキシフェンを投与することにより脈絡叢特異的な欠損を誘導した。生後 2 日目 (P2) において II/III 層の神経細胞のマーカーである Cux1 抗体、V/VI 層のマーカーである CTIP2 抗体を用いて染色した。その結果、大脳皮質神経細胞の移動は正常であったことから、脈絡叢の CAMDI は、脳実質の神経細胞移動に関与しないことが明らかとなった。

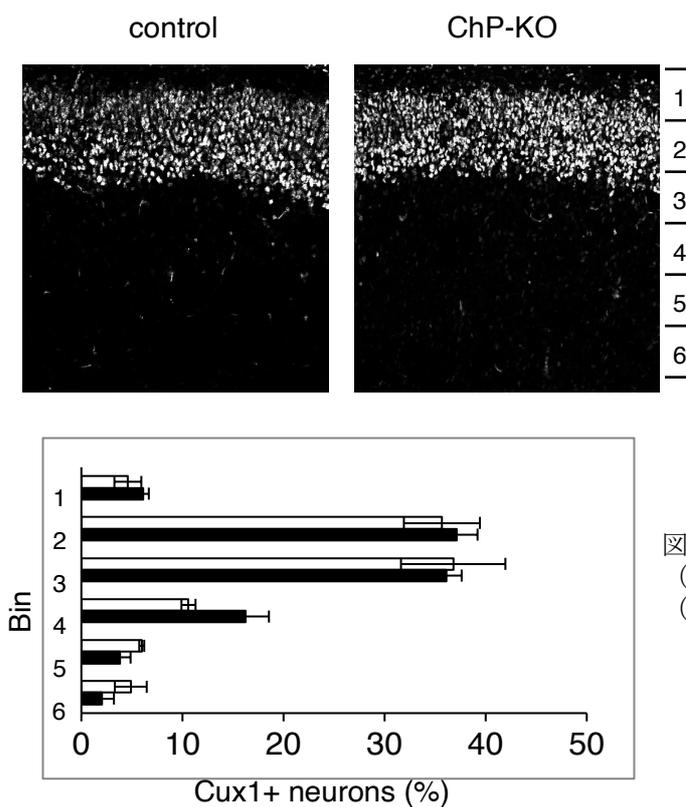


図 1 (上段) P2 における Cux1 染色画像 (下段) 各層における細胞数の定量

(2) 脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスの脈絡叢での遺伝子発現解析

全身 CAMDI ノックアウトマウスは微小管を骨格に持つ中心体の未成熟による神経細胞移動の異常を示す。また、CAMDI は微小管の脱アセチル化酵素である HDAC6 と結合し、その活性を負に制御していることを見出している。CAMDI の欠損により微小管関連の遺伝子発現に影響が出ている可能性が示唆された。そこで RNA-seq 法を用いて、脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスの脈絡叢における網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、GO 解析により「細胞移動に関する線毛運動」「微小管を基軸にした運動」などで遺伝子発現の減少が認められた。そこで qRT-PCR により発現確認を行なったところ、全身ノックアウトマウスにおいて線毛関連遺伝子 Hydin や Armc4 mRNA の減少が認められた。今後、脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスを用いてこれらの遺伝子発現について解析を行う予定である。

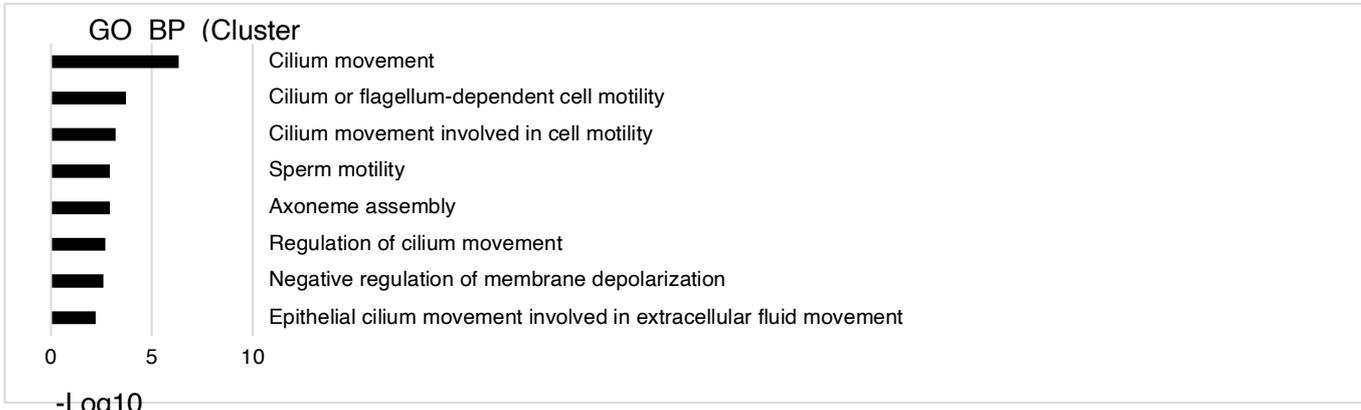


図2 RNA-seq の結果を用いた GO 解析

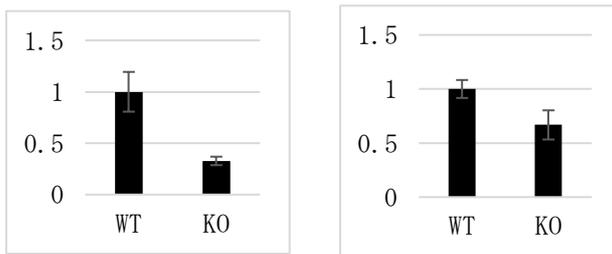


図3 qRT-PCR による遺伝子発現の確認  
(左) Hydin mRNA の定量  
(右) Armc4 mRNA の定量  
RNA-seq の結果を qRT-PCR により確認

(3) 組織免疫学的な手法により線毛形成の様子を確認したところ、胎生後期の段階において脈絡叢上皮細胞における中心小体の増幅や線毛の形成に異常が認められた。また、分化・成熟マーカーであるトランスサイレチンの発現低下が認められた。

(4) 脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスの行動学的解析

全身 CAMDI ノックアウトマウスにおいて自閉症様の行動が確認されており、胎生期の HDAC6 特異的阻害剤の投与により神経細胞移動とともに自閉症様行動の一部が回復することを報告している。一方、社会性を含む経験に依存する行動や高次脳機能に依存すると考えられる行動の回復は認められなかった。これらのことから、神経細胞移動に依存する行動と、それ以外の異常に依存する行動があることが示唆される。脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスの行動学的解析を行ったところ、社会的接触試験と社会的認知試験において、全身ノックアウトマウスに似た表現型を示すことが明らかとなった。

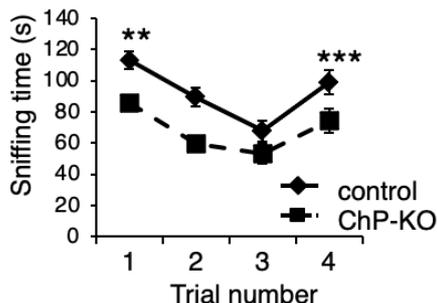


図4 社会性認知試験  
縦軸：匂い嗅ぎ行動 (社会性) の時間  
コントロールマウスと比較して脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウス (ChP-KO) は社会性の低下を示す

全身 CAMDI ノックアウトマウスにおいて自閉症様の行動が確認されており、胎生期の HDAC6 特異的阻害剤の投与により神経細胞移動とともに自閉症様行動の一部が回復することを報告している。一方、葉酸の代謝産物である Folinic acid がヒトの自閉症治療に用いられる奏功していることが報告されている、脈絡叢には葉酸受容体が発現していることが明らかであることから、脈絡叢特異的 CAMDI ノックアウトマウスにおける葉酸受容体の発現や葉酸の投与による治療効果を検討した。まず、葉酸受容体である FolR1 の mRNA を qRT-PCR 法にて解析したところ有意に発現が減少していた。次に、妊娠 12.5 日から 17.5 日に母体に Folinic acid を投与し、生後 21 日目でオープンフィールド試験により解析を行った。その結果、多動と新規環境への適応について改善の傾向が認められた。今後、規定数に達するまで繰り返し試験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Okuda Shohei, Sato Mariko, Kato Saho, Nagashima Shun, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru, Fukuda Toshifumi | 4. 巻<br>297                   |
| 2. 論文標題<br>Oscillation of Cdc20-APC/C-mediated CAMDI stability is critical for cortical neuron migration        | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Biological Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>100986 ~ 100986 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jbc.2021.100986  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                     |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|   |
|---|
| 東京薬科大学生命科学部再生医科学研究室<br><a href="https://www.toyaku.ac.jp/lifescience/labo/lifescience03/regenerativemedicine.html">https://www.toyaku.ac.jp/lifescience/labo/lifescience03/regenerativemedicine.html</a><br>胎児脳の発生に必須な神経移動機構を解明 ~ 自閉症など発達障害の新たな治療法の開発に期待 ~<br><a href="https://www.toyaku.ac.jp/lifescience/newsttopics/2021/0727_4578.html">https://www.toyaku.ac.jp/lifescience/newsttopics/2021/0727_4578.html</a> |
|---|

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|