

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21471

研究課題名（和文）自閉症発症機構におけるシナプス形成異常をもたらす分子病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of Molecular Pathogenesis Leading to Abnormal Synapse Formation in the Pathogenesis of Autism

研究代表者

富田 泰輔（Tomita, Taisuke）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授

研究者番号：30292957

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：自閉症（ASD; Autism Spectrum Disorder）とは発達障害の一つである。本研究においては、げっ歯類ASDモデルとして頻用されているバルプロ酸投与妊娠マウスの出生仔におけるASD様の行動異常を惹起するメカニズムを解析した。その結果、神経細胞シナプス接着分子の一つであるLingo2の代謝産物分泌型Lingo2（sLingo2）が興奮性シナプス過剰形成を起こしていることを明らかとした。今後、sLingo2が興奮性シナプス形成誘導をもたらす詳細なメカニズムを明らかにすることで、新たなASD発症機構の理解につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でASDモデルマウスの病態と関連して見出されたsLingo2はヒトiPSC細胞由来神経細胞でもシナプス異常を惹起する。また、興味深いことに、Lingo2遺伝子を含む領域のコピー数変異がASD患者において見出されており、ASD患者の死後脳患者単一核RNAシーケンスデータを用いたモジュール解析においてもASDターゲット遺伝子としてLingo2が同定されている。すなわち、Lingo2はASDの発症に深く関わっていることが想定され、今後Lingo2を利用した新たなASD治療・予防薬や診断法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Autism (ASD; Autism Spectrum Disorder) is a developmental disorder. In this study, we analyzed the mechanism of ASD-like behavioral abnormalities in the offspring of pregnant mice treated with valproic acid, which is frequently used as a rodent model of ASD. They found that secreted Lingo2 (sLingo2), a metabolite of Lingo2, a neuronal synaptic adhesion molecule, caused excitatory synaptogenesis. Further clarification of the detailed mechanism by which sLingo2 induces excitatory synapse formation is expected to lead to a new understanding of the mechanism of ASD pathogenesis.

研究分野：病態生化学

キーワード：自閉症 バルプロ酸 セクレトーム シナプス

## 1. 研究開始当初の背景

ASD (Autism Spectrum Disorder) とは①社会コミュニケーションの障害②行動・興味・活動の限定された反復様式によって診断される発達障害の一つである。その社会的損失はアメリカで年間 350 億ドルに及ぶと推算され、治療法の確立は喫緊の課題となっている。ASD の原因は周産期・出生後早期の環境要因と遺伝要因の双方が考えられている。近年 ASD 患者に対する網羅的ゲノム解析により、神経細胞の情報伝達場であるシナプス関連分子に多数の遺伝子変異が報告された。そのためシナプスの機能異常、特に興奮性・抑制性シナプス機能の均衡状態 (E/I バランス) の破綻が ASD 発症と強い相関を持つとする仮説が広く支持されてきている (Nelson and Valakh, 2015)。しかし、ASD 発症につながる詳細な分子病態の解明はなされておらず、治療薬の開発には至っていない。

## 2. 研究の目的

てんかん治療薬であるバルプロ酸 (VPA) の妊娠中の服用は新生児の ASD を含む精神疾患発症リスクを増大させることが知られている (Christensen et al., 2013)。この報告に基づき、妊娠マウスへの VPA 投与が出生仔の ASD 様の行動異常を惹起することが明らかとされ、ASD モデルとして広く用いられている。しかし、実際に大脳において E/I バランスを破綻させる責任分子は明らかとなっていない。そこで本研究においては、セクレトーム解析による ASD 病態発症関連分子の同定とその機能解析を主眼として研究を遂行する。

## 3. 研究の方法

自閉症 (ASD; Autism Spectrum Disorder) とは社会コミュニケーションの障害、行動・興味・活動の限定された反復様式によって診断される発達障害の一つである。そこで本研究においては、セクレトーム解析による ASD 病態発症関連分子の網羅的同定とその機能解析を主眼として研究を遂行する。

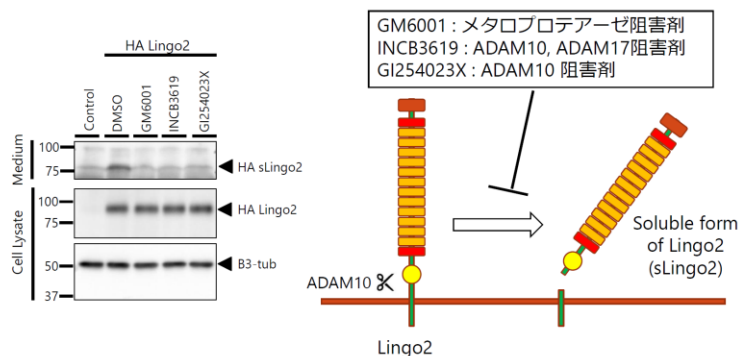
申請者は VPA 母体投与モデルの出生仔から採取した大脳皮質神経細胞において、興奮性プレシナプスマーカーである vGlut1 が増加する一方、抑制性プレシナプスマーカーである vGAT は変化しないことを見出し、VPA による E/I バランスの乱れを再現した細胞モデルの確立に成功した。また VPA による細胞モデルの培養上清に vGlut1 集積を誘導するシナプスオーガナイザー活性が含まれることを明らかとした (吉田ら、日本生化学会大会、2019 年 9 月)。

そこで本研究においては、培養上清に含まれる興奮性シナプスオーガナイザーの同定を目指し、網羅的解析を行う。本解析にあたっては、Secretome Protein Enrichment with Click Sugars (SPECS) と呼ばれる手法を用いる (Kuhn et al., 2012)。分泌タンパク質は培養液中に含まれるアルブミン等の血清タンパク質に比べ低濃度であるため検出困難である。右図に示した通り、SPECS を用いて、膜タンパク質の糖鎖部分を特異的に標識し、標識部位にビオチン基を付加することでアビジンビオチン反応により、糖タンパク質由来の分泌物質を高感度で解析することが可能となる。すでに SPECS を、Lichtenthaler 教授の指導を受けて導入し、VPA モデル初代培養神経細胞においてシナプスオーガナイザー候補分子として ASD との関連が報告されている神経接着分子 Leucine rich repeat and immunoglobulin-like containing protein 2 (Lingo2) を含む複数の分子群の発現変動を確認した。そこで特にシナプスオーガナイザー Lingo2 に着目し、興奮性シナプス形成異常 ASD 発症過程における共通した分子メカニズムの解明を目指す。

## 4. 研究成果

### 1. Lingo2 はメタロプロテアーゼによって切断され分泌型 Lingo2 が産生される。

Lingo2 は 12 個の Leucine rich repeat、1 個の Immunoglobulin like domain を有する一型膜貫通タンパク質である。Lingo2 は神経伸長・神経生存を負に制御することが知られている Lingo1 のファミリー分子の一つであるが、中枢神経系における機能は明らかとなっていない。また膜貫通タンパク質である Lingo2 が培養上清中のセクレトーム

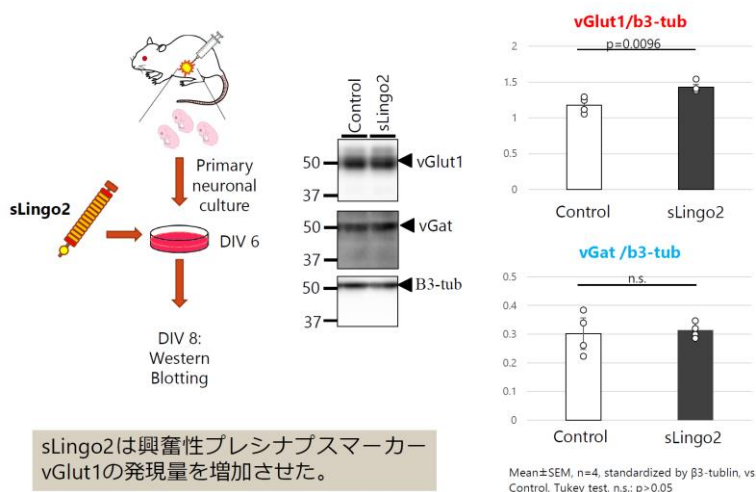


解析で同定されるメカニズムも不明であった。そこで、HEK293A 細胞に Lingo2 を過剰発現しその代謝を検討したところ、細胞ライセート中に 90k Da 近辺に二本のバンドが検出され、さらに培養上清中に 75k Da 近辺のバンドが確認された。この分子量 75k Da のバンドは広範なメタロプロテアーゼ阻害剤である GM6001 の投与により消失した。以上より、分子量 90k Da 程度の全長

Lingo2 がメタロプロテアーゼにより切断され、分子量 75 kDa 程度の可溶性分泌型 Lingo2 (soluble Lingo2: sLingo2) が放出されることが示唆された。

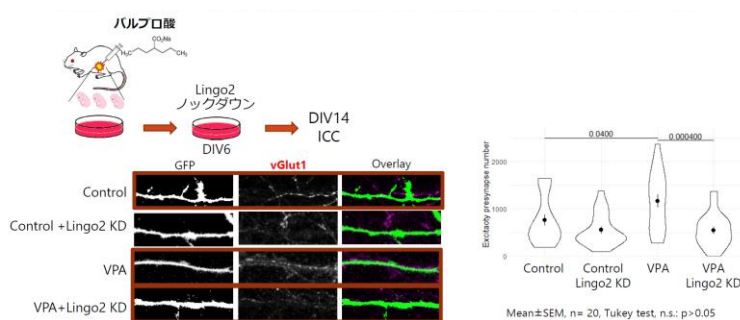
## 2. sLingo2 はマウス初代培養神経細胞において興奮性シナプス形成を誘導した。

上記 Lingo2 の代謝様式から、VPA モデルにおける興奮性シナプスオーガナイザータンパク質は sLingo2 であることが想定される。そこで、分子量から Lingo2 の切断部位を想定し、ほぼ細胞外領域のみからなるリコンビナント sLingo2 を作出した。この sLingo2 をマウス初代培養神経細胞に添加したところ、興奮性プレシナプスマーカー vGlut1 の発現が上昇し、vGlut1 陽性 presynaptic puncta の増加が認められた。一方、抑制性プレシナプスマーカーである vGat については変化が見られず、培養上清中の sLingo2 量の増加は興奮性プレシナプスを特異的に誘導することが明らかとなった。



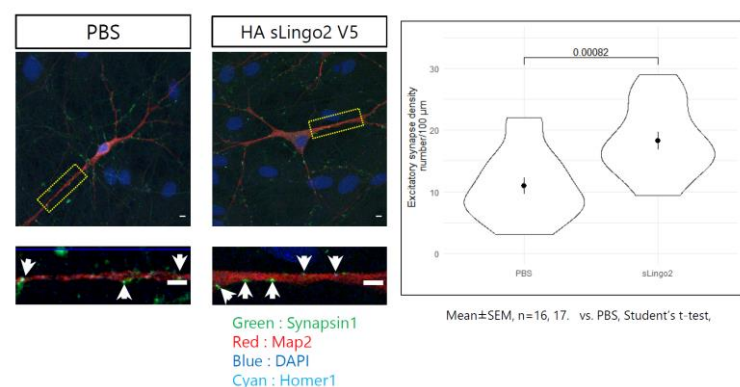
## 3. Lingo2 ノックダウンはバルプロ酸モデルにおける興奮性シナプス形成誘導を消失させた。

VPA モデルにおける興奮性シナプス過剰形成が sLingo2 の増加によるものであると想定し、Lingo2 のノックダウンにより興奮性シナプス形成が減弱するか検討した。Lingo2 のノックダウンは VPA モデルにおいて確認された vGlut1 陽性 presynaptic puncta の増加を消失させた。以上より、VPA モデルにおける興奮性シナプス誘導に sLingo2 が関与していることが示唆された。



## 4. sLingo2 は iPSC 由来ヒト神経細胞の興奮性シナプス形成を誘導した。

sLingo2 がヒト細胞においても興奮性シナプス形成を誘導するか否かを検討するため、iPSC より興奮性ヒト神経細胞を分化誘導し、sLingo2 が与える影響について解析した。その結果、sLingo2 添加により、興奮性ポストシナプスマーカー Homer1 とプレシナプスマーカー synapsin1 と共陽性となる synaptic puncta の密度が増加した。さらに sLingo2 の添加は mEPSC の頻度を顕著に増加させた。以上より、ヒト神経細胞に対しても、sLingo2 は興奮性シナプス形成誘導能をもつことが明らかとなった。

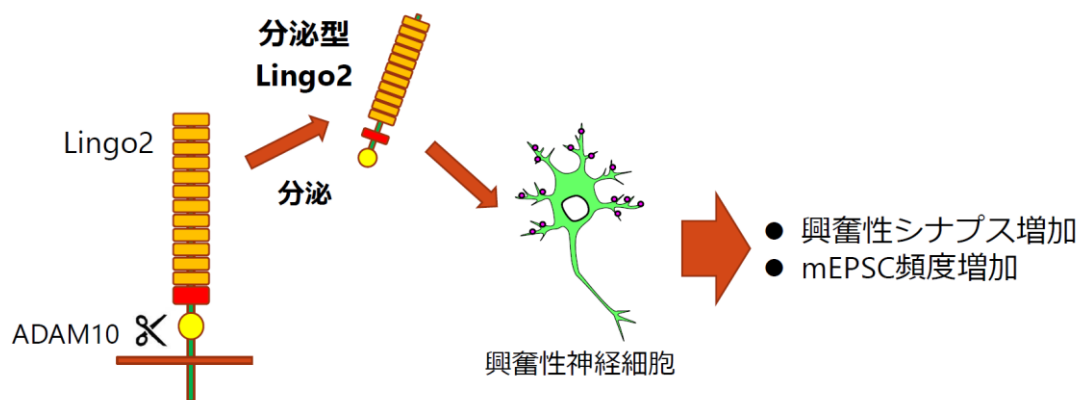


### <考察>

本研究より、VPA 母体投与モデルマウス胎児由来の初代培養神経細胞は、メタロプロテアーゼにより切断されることで生じる sLingo2 を介して興奮性シナプス過剰形成が生じていることが示唆された。さらに、ヒト神経細胞においても sLingo2 が興奮性シナプス形成を誘導することが明らかとなった。今後はマウス胎児に対し sLingo2 を脳室内投与することで ASD 様行動を惹起されるか否かについても検討していきたい。

また、興味深いことに、Lingo2 遺伝子を含む領域のコピー数変異が ASD 患者において見出されており、ASD 患者の死後脳患者単一核 RNA シークエンスデータを用いたモジュール解析にお

いても ASD ターゲット遺伝子として Lingo2 が同定されている。ゆえに ASD 発症に Lingo2 が関わっていることが示唆されており、sLingo2 が興奮性シナプス形成誘導をもたらす詳細なメカニズムを明らかにすることで、新たな ASD 発症機構の理解につながることを期待される。



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 Yumoto Takafumi, Kimura Misaki, Nagatomo Ryota, Sato Tsukika, Utsunomiya Shun, Aoki Natsue, Kitaura Motoji, Takahashi Koji, Takemoto Hiroshi, Watanabe Hiroataka, Okano Hideyuki, Yoshida Fumiaki, Nao Yosuke, Tomita Taisuke	4. 巻 11
2. 論文標題 Autism-associated variants of neuroligin 4X impair synaptogenic activity by various molecular mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Autism	6. 最初と最後の頁 0~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13229-020-00373-y	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Fumiaki Yoshida, Ryota Nagatomo, Misaki Kimura, Genta Ito, Sho Takatori, Taisuke Tomita
2. 発表標題 Elucidation of molecular mechanism that induce abnormal excitatory synapse formation in valproic acid-induced rodent model of autism spectrum disorders
3. 学会等名 BIOUT
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ウェブサイト <a href="http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neurops">http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~neurops</a>
--

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （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			
ドイツ	ミュンヘン工科大学			