

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2011

課題番号：22591135

研究課題名（和文） 自閉性障害におけるERストレスの活性化の証明と治療介入モデルの作成

研究課題名（英文） Activation of ER stress as the major molecular pathology in autism spectrum disorder and the animal model for intervention study

研究代表者 桃井真里子（MOMOI MARIKO）
自治医科大学・医学部・教授 研究者番号：90166348

研究成果の概要（和文）：

自閉性障害（ASD）の原因遺伝子として同定した *CADM1* の喪失ではマウスは社会性の低下と不安・攻撃性という ASD 関連形質を示し、変異遺伝子発現細胞では、神経突起形成不全とシナプス形成不全を示した。不全程度は変異によって異なった。変異遺伝子発現細胞では、CHOP 発現の亢進、変異蛋白の beclin との細胞質内共存が明らかになり、ASD 関連遺伝子変異が ER ストレス活性化を来すことが示された。

研究成果の概要（英文）：

We reported that the loss of *Cadm1*, one of the autism-related gene, caused decreased social ability, anxiety and aggression. The cells expressed mutated *CADM1* protein showed the aberrant and aborted extension of neuronal spikes and the decreased synaptogenesis. We also detected that the mutated *CADM1* expressing cells showed the activation of CHOP and beclin, that suggest the activation of ER stress in the cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：

キーワード：内科系臨床医学、小児科学

1. 研究開始当初の背景

(1)自閉性障害（ASD）の原因遺伝子がいくつか報告されていたが、共通分子機構は解明されていなかった。2003年に報告された *Neurologin3,4* における ASD 関連変異が非症候性 ASD の最初の原因遺伝子変異であり、シナプス接着タンパクであったことから、ASD の中心分子病態がシナプスにあることが強く示唆された。

(2)申請者らは、ASD と関連する遺伝子変異スクリーニングを実施し、シナプス機能性タ

ンパクの一つである、*CADM1* に変異を2種報告した(2008, BBRC)。シナプス接着タンパクの一つである *Neurologin-neurexin* の関係である heterophilic な複合体によるシナプス接着機能ではなく、homophilic な接合体による機能発現であるため、シナプス後膜のみならず、前膜にも機能不全をきたす可能性が示唆され、重要な ASD 関連遺伝子であると考えられた。

(3)ASD は遺伝要因の強い精神神経発達障害の1疾患であるが、遺伝要因と環境要因の双

方が病態形成に関与すると考えられてきた。遺伝子変異の報告が蓄積されるに従い、遺伝子変異による共通分子病態解明が重要課題となってきた。ASDにおける遺伝要因は、孤発性のものは、*de novo mutation* あるいは欠失によると考えられ、変異が親から遺伝するものは、浸透率の低い常染色体優性遺伝が示唆されていた(2008)。

(4)原因遺伝子変異による *loss-of-function* だけでは、1家系内の変異保有者における病型の違い、さらには、非発症者の存在、女性と男性の発症率の差は、常染色体上遺伝子では説明困難であった。我々が報告した MBD1 (2005,Brain Dev)、CADM1 変異(2008)でも、発症の男女差、遺伝子変異を保有する親世代の非発症等が観察され、これらは、ASD 遺伝子変異の発現に共通の現象であることが示唆された。これらの data を基に我々は変異遺伝子産物による *gain-of-function* が病態形成に重要であるという仮説を立てた。

(5)分子病態解明に有用なモデルを作成することは、その後の治療介入モデル作成に不可欠であった。

(6)CADM1 に変異を同定し、Cadm1-KO マウスを作成した。

(7)*gain-of-function* の分子病態の一つとして、変異タンパクの ER への凝集とそれによる ER ストレスの活性化を仮説とした。

(8)ASD 患者脳、および SHANK3 変異導入細胞、等で、ASD 関連分子病態として、GABA 受容体の低下、あるいは亢進が報告されていた。GABA 受容体の変動が中心病態の一つであるという知見が蓄積されていた。

2. 研究の目的

① ASD の共通分子病態の解明を最終目的とした。共通分子病態が判明することで、治療ターゲット分子が抽出可能になることが予想された。

②Cadm1-KO マウスにおける受容体変動の解析による共通分子病態の抽出

③変異導入培養細胞における受容体変動の解析による *gain-of-function* 分子機構の解明

④変異遺伝子導入培養細胞における ER ストレスの活性化の証明とその変動の解析

⑤Cadm1-KO マウスの行動解析による CADM1 の *loss-of-function* に伴う臨床症状の解析

⑥共通分子機構の抽出後は、それに変動を与える治療モデルの探究

⑦Cadm1-KO マウスの神経病理学的解析

3. 研究の方法

①マウス：Cadm1-KO マウス、heterozygous マウスは、C57BL/6J との 10 世代交配で確立した。マウスは 12 時間の照明/非証明サイクルで環境調整し、行動解析は、一定の時間帯

で実施した。動物実験に関してはガイドラインに準拠し、学内の許可(H22-179、10-179)を得て実施した。10-15 週雄マウスを使用した。

a. open-field test、blight-dark transition test、elevated-plus maze test、social interaction test、hand-scored social behaviors in social interaction test、resident-intruder test、social memory/recognition test、Rotarod test、footprint test、buried food peller test、grip strength test、tail immersion and hot place tests、tail suspension test を実施した。

b. マウス行動の記録と解析は、Image LD, EP, FZ, L programs で実施した。データ解析は ANOVA、ANOVA+Dunnett t-test 解析、または、Mann-Whitney U test、または Wilcoxon signed-rank test で解析した。

②protein-protein interaction assay: His-tagged recombinant wild-type CADM1 (3 個の Ig domain を有し膜貫通 domain を欠く 48-334 アミノ酸領域)は silkworm 細胞を使用して作成し、Ni-column で調整した。野生型、変異 CADM1-p cDNA ベクターは、COS 細胞に lipofectamine2000 を使用して導入した。28 時間後、タンパクを抽出液を調整した。His-tagged recombinant CADM1 と、Myc-wild-type、H246N、Y251S を導入した COS-細胞抽出液タンパク分画のそれぞれを overnight、4 °C で混合し、Ni-column でタンパクを調整後、抗-Myc 抗体による immunoblot で検出した。

③蛍光ラベルによる Fluorescent correction spectroscopy: TAMRA-ラベルした 48-334CADM1 タンパク(wild-typeH246N、Y251S)は、543nm で検出し、Olympus 蛍光顕微鏡 Mf20 で検出した。

④神経細胞への遺伝子導入：胎生 16-day の cadm1 欠損マウスから神経細胞を調整し、Neurobasal 培地で 2 %B27 添加 L-glutamine 存在下に、37°C、5 %CO2 で培養した。6 日後に、Myc-Wild-type、H246N、Y251S-CADM1 をリン酸カルシウム法で導入した。

⑤C2C12 細胞に、wild-type、H246N-、Y251S-pcDNA-CADM1 を、4 -PBA、または rapamycin 存在下、非存在下、で導入し、4 %パラホルムアルデヒドで固定し、各抗体染色した。マウス抗-synaptophysin、マウス抗-KDEL 抗体、rabbit 抗-beclin 抗体、マウス抗-CHOP 抗体、chicken 抗-SynCAM 抗体、を使用し、Alexa Fluor488-、Alexa Fluor 568-結合二次抗体(抗マウス、抗チキン、抗ラビット)と反応させた。核は Hoechst 33342 で染色し、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した。

⑥マウスの超音波音声記録：生後 day 8 の

Cadm1-KO マウス、および wild-type マウスの USV (ultrasonic vocalization) は、5 匹ずつ検索した。マウスは母マウスから話した状態で、UltraSound Gate116 detector で 40-100Hz の超音波を 3 分間記録した。

⑦ 遺伝子発現の定量解析：マウス脳組織から RNA を抽出し、相補的 RNA を totalRNA から調整した。Real-time PCR は、Applied Biosystems 7500 fast real-time analysis で、Tak-Man gene expression assays を用いて定量解析した。統計的有意差は student's t-test で行った ($p < 0.05$ を有意とした)。

免疫染色：マウスの凍結小脳切片 ($10 \mu\text{m}$) は組織を 4% パラフォルムアルデヒドで固定後、チキン抗-SynCAM (CADM1) 抗体、ラビット抗-Calbindin、マウス抗-Synaptophysin、ラビット抗-VGUT1, VGluT2、さらに、AlexaFluor488、AlexaFluor-568 結合二次抗体と反応させ、Leica 共焦点顕微鏡 SP5 で観察した。

4. 研究成果

(1) 研究結果

① Cadm1-KO マウスの行動解析結果

a. Cadm1-KO マウスは、不安行動の増強を示した：open-field test では、有意 ($p < 0.001$) に center place への時間は低下していた。行動距離に差はなかったことから、不安増強と判定された。Light-dark transition test では、light box の時間は有意に ($p < 0.05$) 減少していたことも、不安の増強を支持した。Elevated plus-maze test では有意差を示さなかったことから、不安増強は、状況によって発現されることが示唆された。ASD に合併する臨床形質の一つである不安障害も、不安形成はすべての場面ではないことから (社会不安、新規性不安、等、一定の状況下で生じることが観察される)、この結果は、説明可能と考えられた。

b. Cadm1-KO マウスは社会性行動の障害を呈した：social interaction test では、Cadm1-KO マウスは仲間と一緒に居る時間が長かったが、Cadm1-KO マウスは、有意に動き回る時間が長く、仲間と一緒にの時間が短かった ($p < 0.05$)。新規のマウスへの関心は有意に低く ($p < 0.05$)、マウスを追い掛け回している時間は長かった。争う時間は、-KO マウスでは有意に長かった ($p < 0.05$)。heterozygote のマウスでは、社会性行動に有意な差はなかった。

このことから、Cadm1-KO マウスは ASD の形質の一部を発現するが、すべてではなく、-KO マウスは loss-of-function の解析モデルであり、ASD 病態にはそれに加えて gain-of-function 病態があることを示唆し

ている。

c. 社会性形成能の一つとして、Social memory/recognition test を実施した。Wild-type マウスが新規参入メスマウスへの関心は時間とともに有意に減弱したのに比較して Cadm1-KO マウスは新規に入れられたマウスへの関心は時間経過で減弱しなかった ($p < 0.05$)。「親しさ」が形成されにくいと判断され、ASD の臨床形質の一つと近似すると考えられた。

c. 運動記憶能力:rotarod test では、wild-type マウスが練習を繰り返すと落ちないでいる時間は長くなったのに、Cadm1-KO マウスでは、練習による改善がほとんど認められなかった ($p < 0.01$)。このことは、ASD 罹患者が粗大運動が拙劣であることと近似を示唆している。

d. 小脳運動症候：歩行に関して、Cadm1-KO マウスは明らかに後肢幅が有意に広がった。 ($p < 0.01$) 小脳症候の一つである wide-based 歩行を示唆する所見であった。

② CADM1 変異タンパクの接着機能不全の解析 CADM1 変異タンパク (H246N、Y251S) (膜貫通部分欠損) と wild-type タンパクとの結合は、それぞれ、軽度に低下していたが、83.5%、74.6% は維持されていた。変異タンパク同士との結合は wild-type よりも約 20% 弱かった。このことは、接着機能の低下で病態のすべてを説明することは困難かもしれない可能性を示している。

③ 変異タンパク導入細胞の変化：

a. myc-tagged 変異タンパクを神経細胞に導入した系では、シナプスマーカーである synaptophysin 発現との関係を調べた。変異タンパク導入細胞では、dendrites の伸展不全があり、synaptophysin 発現の減少した dendrites が多く観察された。

b. H246N 導入細胞は、dendrites のない細胞が 30% (対照は 9%)、Y251S 導入細胞では 54.4% と有意に多かった。Dendrites 形成減少の程度と、②の complex 結合の低下程度は、2 変異間で関連しており、ともに、Y251S 変異が強かった。変異による結合能低下と細胞形態に及ぼす影響の程度が一致していたことは、これらのデータが変異によるタンパク機能不全の程度を反映している可能性をより強く示唆している。

c. C2C12 細胞に導入された CADM1 では、変異 CADM1 は明らかに細胞質内に多く発現し、細胞膜上への発現は低下しており、beclin との co-localization が観察された。Beclin が ER ストレス化で ER に発現するタンパクであることから、変異 CADM1 発現細胞は ER ストレスが惹起され、CADM1 は ER に多く蓄積することが示された。

d. CHOP 発現の程度は、wild-type では発現を認めず、変異導入細胞では、NLGN3 変異導

入細胞と同程度に活性化が示され、CADM1 変異は、NLGN3 変異と同様の共通分子機構が生じていることを示唆した。

④Cadm1-Ko マウスと Foxp2-KI (R552H) マウスにおける小脳の変化と USV の変化
Cadm1-KO マウスでは言語障害を呈する遺伝子変異である Foxp2 (R552H)-KI マウスと同様に、小脳形成の低下と Purkinje 細胞形成不全、平行線維の形成不全が認められ、Cadm1-KO マウスにおける小脳不全は言語障害モデルマウス小脳と近似していた。

(2) 結果の解説

① Cadm1-KO マウスの結果が示唆する事項：ASD 患者にミスセンス変異が同定された CADM1 はシナプス接着タンパクの一つであり、-KO マウスは、その機能喪失で生じる病態の解析材料となる。Cadm1 機能を全喪失したマウスは、ASD の合併症候の一つである不安増強、攻撃性を示した。また中核症状の一つである社会性の低下と、親しさの形成の低下、を示した。追いかけてまわす行動は、常同行動の可能性がある。運動系では、粗大運動の拙劣さに近似する傾向を示し、同時に、小脳症候の一つである歩行を示した。小脳は ASD の主要病巣の一つと考えられていることから、-KO マウスが ASD の臨床症候の一部に近似する症候を示したと考えられた。すべてではないことは、ASD 病態が loss-of-function によってのみ生じていない可能性を示唆しており、-KI マウスによる、あるいは、変異遺伝子導入系による解析が必要であることを示唆している。

②変異導入細胞における変化：変異導入細胞では、どちらの変異でも同様の細胞形態の変化、シナプス形成の低下、ER ストレスの活性化が検出され、ASD 関連変異であることを示唆すると同時に、ASD の共通分子病態がシナプス形成の低下という loss-of-function であると同時に、ER ストレスの活性化という gain-of-function が生じていることを示した。ER ストレスの活性化は、膜タンパクの trafficking 不全を生じ、受容体タンパクの膜上への輸送不全を生じることが示されている。ASD 小脳などでは GABAB 受容体発現低下が報告されており、原因遺伝子変異によって二次的な受容体変動が生じることが、ASD 分子病態の中核の一つである可能性が示唆された。

③Cadm1-KO マウスが言語障害モデルマウスの Foxp2-KI (R552H) と USV 不全、小脳形成不全、Purkinje 細胞不全において一致していたことは、ASD の重要な症候の一つである言語獲得不全は、CADM1 の loss-of-function で生じうることを示唆した。FOXP2 は、ASD の原因遺伝子の一つと報告される CNTNAP2 と結合モチーフを有することが報告されている。

同様のモチーフは、CADM1 にも存在し、CADM1 と FOXP2 の結合不全が ASD の言語障害の分子基盤である可能性も示唆している。

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)

Takayanagi Y, et al. Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice. *Biochem. Biophys Res Commun* 2010;396:703-708, doi:10.1016/j.bbrc.2010.04.165

Fujita E, et al. Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, CADM1. *Cell Death and Disease* 2010;E47, Doi:10.1038/cddis.20109.23

Fujita E, et al. Cadm1-expressing synapses on Purkinje cell dendrites are involved in mouse ultrasonic vocalization activity. *Plos ONE* 2012;7:E3151, doi:10.1371/journal.pone.0030151

Momoi MY. Autism spectrum disorder; shared molecular pathology. *Medical Science Digest* 2011;37:410-413 (Japanese)

[学会発表] (計 1 件)

桃井真里子 小児期の広汎性発達障害：遺伝子と環境 第 28 回日本医学会総会 ところと神経/4-s-3-2 シンポジウム講演

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桃井真里子 (MOMOI MARIKO)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：90166348

(2) 研究分担者

森雅人(MORI MASATO)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：10337347
斉藤真理 (SAITO MARI)
自治医科大学・医学部・研究員
研究者番号：10424011

(3) 連携研究者

()

研究者番号：