

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790392

研究課題名(和文)新規分子CAMDIによる大脳皮質構築の制御と精神疾患発症の関連研究

研究課題名(英文)Study for relationship between CAMDI function in cortical lamination and psychiatric disorders

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) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに統合失調症関連蛋白質DISC1と結合する新規の蛋白質CAMDIを発見した。CAMDI遺伝子のノックアウトマウスを作製した結果、神経細胞の移動異常、樹状突起の短縮、スパイン密度の増加が認められた。

そこで本年度は行動学的な解析を行い、精神疾患様の表現型の有無を調べた。その結果、多動や社会性の低下、繰り返し行動の増加など、自閉症を含む発達障害とよく似た表現型が認められた。CAMDI遺伝子は染色体2q31の領域に存在するが、この領域は自閉症患者におけるリスク領域であることも知られている。CAMDIの異常が発達障害の発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)-associate protein, name d CAMDI. CAMDI knock-down experiment by sh-RNA using in utero electroporation revealed severely impairment of radial migration with disoriented centrosomes. The CAMDI gene knockout mice revealed an abnormal neuronal migration, short dendrite and high spine density at the cerebrum. The cerebrum is known as a brain region related to high-level brain functions such as recognition, learning and memory formation. In addition, abnormality of these functions observed in a brain of psychiatric patients. Thus, we studied a behavioral analysis of the CAMDI knockout mice. As a result, the knockout mice showed a hypermobility, hypo-sociality and repetitive behavior. CAMDI gene located a 2q31.2 where is known as a candidate region for autism or related disease. These findings indicate that CAMDI have an important role for normal brain development and might be due to a psychiatric disorder.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：CAMDI 脳 発生

1. 研究開始当初の背景

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申請者は明らかにした (J. Biol. Chem. 2010, corresponding author)。CAMDI は胎児発生中の大脳皮質中間帯 (IZ) に発現が認められた。この領域は発生中に神経細胞が移動を始めることが知られている。また、秩序だった神経細胞の移動は将来の大脳皮質 6 層構造の形成に重要な役割があることも知られている。これらのことから、子宮内遺伝子導入法を用いてマウス胎児において CAMDI 遺伝子の発現を抑制したところ、有意に神経細胞の移動が阻害された。

また、CAMDI 遺伝子は染色体 2q31 の領域に存在するが、この領域は自閉症患者におけるリスク領域であることも知られている。これらのことから、CAMDI 遺伝子の異常が統合失調症や自閉症といった精神疾患の発症と関連がある可能性が示唆された。

2. 研究の目的

CAMDI 遺伝子のノックアウトマウスの作製を行い、個体における CAMDI の機能を明らかにすることを目的とした。

(1) CAMDI ノックアウトマウスの組織学的解析

大脳皮質の層構造における特異的マーカー蛋白質に対する抗体染色を中心に、組織学的な解析を行い詳細に定量化した。

(2) CAMDI ノックアウトマウスの行動学的解析

子宮内遺伝子導入法による解析から、CAMDI 遺伝子の発現を抑制すると脳の高次機能に直接的な影響を与えていると考えられる。そこで CAMDI のノックアウトマウスを用いて記憶形成や行動学的な解析を行い、精神疾患様の表現型の有無を調べることが目的とした。

3. 研究の方法

(1) CAMDI 遺伝子のノックアウトマウスを用いて大脳皮質を HE 染色や Nissl 染色することで、マクロ的な構造を確認した。大脳皮質層構造のマーカー蛋白質 (II/III 層: Cux1, V 層: Ctip2 など) が存在することが知られていることから、それらに対する抗体を用いて大脳皮質の層構造における組織学的な解析を行った。精神疾患の剖検脳において異常所見があると報告されている前頭前野内側部や海馬歯状回、CA1 領域などを中心に解析を行った。

(2) CAMDI 遺伝子のノックアウトマウスを用いて記憶形成や行動学的な解析を行い、精

神疾患様の表現型の有無を調べた。特に自閉症の表現型として大きな指標となる社会的相互作用や認知・記憶形成などを中心に解析を行った。

4. 研究成果

(1) CAMDI 遺伝子ノックアウトマウスは外見적으로는正常に生育し、生殖も可能であった。胎児はメンデルの法則に従って誕生した。

(2) 大脳皮質層構造のマーカー蛋白質 (II/III 層: Cux1, V 層: Ctip2) に対する抗体を用いて、生後 2 日と 21 日の大脳皮質の染色を行った。その結果、II/III 層の神経細胞を標識する Cux1 抗体で染色される細胞が、V, VI 層にも存在することが明らかとなった。このことは、II/III 層の神経細胞の移動が異常であることを示す。また、生後 2 日で異常が認められることから、CAMDI の異常は大脳皮質形成異常を伴う発達障害の原因になる可能性が示唆された。

(3) 子宮内遺伝子導入法を用いることでノックアウトマウスに EGFP 遺伝子を発現させ、個体内における個々の神経細胞の移動や突起伸長、スパインを可視化させて詳細な観察を行った。胎生 14.5 日で EGFP 遺伝子を導入し、II/III 層の神経細胞の標識を行った。その結果、神経細胞の移動異常が認められ、V/VI 層にとどまったままであることが確認された。生後 21, 56 日後においても確認された。これらの細胞は樹状突起を形成しているものの、その長さは短縮していた。ノックアウトマウスでは異所的に存在する神経細胞が、本来の相手ではない細胞とシグナルをやり取りしている可能性が示唆された。また、生後 21 日において神経細胞同士の信号をやり取りする場であるシナプスの後方部 (スパイン) はノックアウトマウスにおいて密度の増加と未成熟な形態が認められた。これらの所見は、精神疾患患者 (特にスパインの増加と未成熟は自閉症) の剖検脳でも確認されていることから、CAMDI ノックアウトマウスを精神疾患モデルマウスとして考えることができる可能性が示唆された。一方で生後 56 日ではスパインの密度と形態の差は減少していた。これらのことから、CAMDI ノックアウトマウスではスパインの形成そのものに異常があるのではなく、その形成が遅延している可能性が考えられた。

(4) CAMDI ノックアウトマウスを用いて行動学的な解析を行い、精神疾患様の表現型の有無を解析した。まず生後 21 日の離乳直後

の幼弱なマウスにおいて解析を行った。新規の場所における自由行動量を測定したところ、有意に行動量の増加が認められた(多動)。その際に野生型マウスにおいてほとんど認められないジャンプする回数が有意に増加していた(無意味な繰り返し行動)。さらに、毛繕いの減少が認められた(新規環境への順応の減少)。次に、生後56日の若い成体マウスを用いて解析を行った。新規環境における行動量を測定したところ、有意に行動量の増加が認められた。また、ジャンプの量も増加していることが確認された。次に、3-チャンパー社会性試験を行った。その結果、新規マウスに対する接触時間の減少が認められた(社会性の低下)。自分の縄張り内に侵入した新規マウスの存在下において床敷を掘り返す動作の増加が認められた(無意味な繰り返し行動や不安行動)。また、水の嫌いなマウスに強制的に水泳をさせる試験において、逃走を早々と諦める行動において有意な増加が認められた(うつ様行動)。その他に、熱に対する感覚鈍麻や衝動性の増加が認められた。これらの結果より、多動や社会性の低下、繰り返し行動の増加など、自閉症を含む発達障害とよく似た表現型が認められた。CAMDI 遺伝子は染色体 2q31 の領域に存在するが、この領域は自閉症患者におけるリスク領域であることが知られている。CAMDI の異常が発達障害の発症に關与する可能性が示唆された。

- (5) これまでの研究により、CAMDI の新規結合蛋白質として KIBRA を同定している。KIBRA は AMPA 受容体の輸送に關与し、ノックアウトマウスにおいて長期記憶の形成に異常が生じることが報告されている。そこで、CAMDI ノックアウトマウスを用いて認知・記憶に關する試験を行った。バーンズ迷路テストを用いて空間学習に關する試験を行った。トレーニング期間として 12 日間に渡って逃避箱を探す訓練を行った。野生型マウスでは探し出すまでの時間や間違った場所を探す回数は、日にちを追うにつれて減少することが確認された。一方で CAMDI ノックアウトマウスでは、減少していくことは確認されたが、その度合いは野生型と比較して有意に減少していた。さらに、試験後 2 週間通常飼育した後に、その逃避箱の位置を記憶しているか試験を行ったところ、CAMDI ノックアウトマウスでは有意に記憶が減少していることが認められた。次に新規物体に対する認知試験を行った。2 つの物体を用いて一定時間自由行動させて、その物体に慣れさせた。その後、2 つのうち片方の物体を新規の物体に変えて試験を行った。野生型マウスは新規物体を探索する時間の割合が有

意に増加していた。一方、CAMDI ノックアウトマウスではあらかじめ慣れている物体と新規物体を探索する割合がほぼ同じであることが明らかとなった。このことは、CAMDI ノックアウトマウスが新規物体を認識することができず、探索時間が減少したことを示す。また、社会性の認知試験においても、社会性の低下とともに社会性認知の低下が認められた。自閉症患者において、社会性の低下や限局した興味の範囲を示すことが知られており、CAMDI ノックアウトマウスにおけるこれらの行動と關連がある可能性が示唆された。

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 1 件)

- (1) Sugiura A., Nagashima S., Tokuyama T., Amo T., Matsuki Y., Ishido S., Kudo Y., McBride HM., Fukuda T., Matsushita N., Inatome R., Yanagi S.
MITOL Regulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contacts via Mitofusin2.
Mol. Cell 2013 Jul 11; 51 (1) 20-34

〔学会発表〕(計 1 件)

- (2) 山崎紘子、福田敏史、柳 茂
CAMDI 遺伝子ノックアウトマウスにおける大脳皮質の解析。
第 86 回日本生化学会年会. 2012, 12/15, 福岡

〔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

<http://logos.ls.toyaku.ac.jp/Life-Science/lmb-8/>

6．研究組織

(1)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：5 0 3 7 2 3 1 3

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし