

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460495

研究課題名(和文)CAMDIによる脳形成の分子基盤とマウス行動に与える影響との関連解析

研究課題名(英文)Association analysis of the molecular basis of brain development and mouse behavior using 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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CAMDIは統合失調症関連蛋白質であるDISC1に結合する新規蛋白質として申請者が同定した。CAMDIはDISC1に依存して中心体への移行し、神経細胞の移動を制御することを明らかにしていた。本研究では、CAMDIノックアウトマウスを作製し解析を行った。神経細胞移動の異常とともに、自閉症様の行動異常が認められた。さらに、CAMDIがHDAC6と結合して微小管の脱アセチル化を抑制することで中心体の安定化することを明らかにした。さらに神経細胞移動が行われる胎生期に、HDAC6阻害剤(Tubastatin A)を投与することで神経細胞移動とともに自閉症様行動を回復できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CAMDI has been suggested to promote radial migration through centrosome regulation. However, its physiological relevance is unclear. We report the generation and characterization of CAMDI-deficient mice. CAMDI-deficient mice exhibit delayed radial migration with aberrant neural circuit formation and psychiatric behaviors including hyperactivity, repetitive behavior, and social abnormality typically observed in autism spectrum disorder patients. Analyses of direct targets of CAMDI identify HDAC6 whose α -tubulin deacetylase activity is inhibited by CAMDI at the centrosome. CAMDI deficiency increases HDAC6 activity, leading to unstable centrosomes with reduced α -tubulin and acetylated α -tubulin levels. Most importantly, psychiatric behaviors as well as delayed migration are significantly rescued by treatment with Tubastatin A, a specific inhibitor of HDAC6.

研究分野：脳・神経科学

キーワード：CAMDI HDAC6 自閉症 中心体 治療 細胞移動

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 (Fukuda T. et al. *J. Biol. Chem.* 2010, corresponding author)。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である。前年度までの研究により、CAMDI 遺伝子ノックアウトマウスを作成し組織学的解析を行ったところ、神経細胞の移動異常が認められた。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 遺伝子の異常と統合失調症や自閉症といった精神疾患の発症との関連が示唆された。

2. 研究の目的

統合失調症関連蛋白質 DISC1 に結合し、胎児大脳皮質の神経細胞移動に重要な役割を担うことが明らかとなった新規分子 CAMDI のノックアウトマウスを用いた解析を行う。CAMDI 遺伝子は自閉症患者におけるリスク領域(2q31)に存在する。精神疾患様の表現型を指標とした行動学的解析(特に社会的相互作用、学習・記憶形成)を行なう。さらに、CAMDI はアクチン骨格とチューブリン骨格に存在する蛋白質と相互作用が認められる。神経細胞移動の分子基盤である細胞骨格制御や成長円錐とスパインの形成に着目した組織細胞学的な解析を行なう。CAMDI ノックアウトマウスを精神疾患モデルマウスとして捉え、大脳皮質形成の異常と精神疾患様行動との関連を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ノックアウトマウスの作製
ノックアウトマウスを作製し、C57Bl/6N へのバッククロスを行った。
- (2) マウスの行動解析
行動量、不安、恐怖、社会性、記憶・学習障害などの行動解析を行った。
- (3) CAMDI 結合蛋白質の探索
酵母ツーハイブリッド法により結合蛋白質の同定を行った。
- (4) モノアミンの定量
HPLC を用いて脳の部位別(大脳皮質、海馬、中脳、線条体、小脳)にサンプルを調整し測定した。

4. 研究成果

(1) CAMDI は大脳皮質の神経細胞移動を制御する

胎児大脳皮質の神経細胞移動に重要な役割を担うことが明らかとなった新規分子 CAMDI のノックアウトマウスを解析した。発現阻害同様にノックアウトマウスにおいても神経細胞の遅れが認められた(図 1)。遅れた神経細胞の軸索は、本来の投射先ではなく、遅れた層に存在する細胞と同じ部位に投射していた。すなわち、異なる性質を持つ神経細胞が異所的に軸索を投射していた。

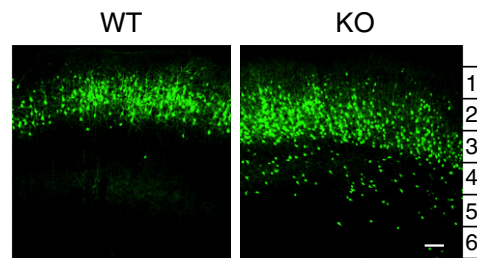


図 1 CAMDI ノックアウトマウスにおける大脳皮質神経細胞の移動異常

野生型(左, WT)では神経細胞(緑)が上層まで移動している。一方 CAMDI ノックアウトマウス(右, KO)では下層にも神経細胞が存在しており、移動異常が認められる。

(2) CAMDI ノックアウトマウスは自閉症様の行動を示す

CAMDI のノックアウトマウスを用いた行動解析を行った。その結果、強制水泳試験における抑うつ状態の増加、初対面のマウスに対する社会的相互作用の減少、新規環境における多動が認められた。そのほかに、繰り返し行動、新規環境への適応の障害、抑うつ状態の増加、不安行動の増加、感覚鈍麻などが認められた。これらの表現型は、自閉症患者に認められる症状と酷似していた。物体に対する認知・記憶の試験であるオブジェクト認識試験、空間認知に対するバーンズ試験、ならびに社会的認知を測定するソーシャル認知試験を行った。その結果、いずれの試験においても野生型マウスと比較して、認知・記憶の低下が認められた。これらの結果から、CAMDI 遺伝子が脳の高次機能である認知・記憶に関与することが明らかとなった。

(3) CAMDI はモノアミン産生細胞の成熟を制御する

CAMDI ノックアウトマウスが精神疾患様の行動を示したことから、その要因の一つとして考えられている脳内モノアミンの解析を

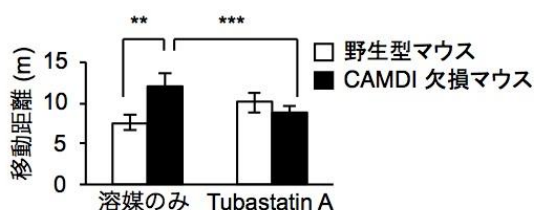
行った。その結果、中脳においてドーパミン、セロトニン、ノルエピネフリンの有意な減少が明らかとなった。その原因として中脳背側縫線核の TH（ドーパミン合成酵素）、TPH2（セロトニン合成酵素）陽性の細胞数の減少が認められた。そこでヒトの治療に用いられるセロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) の一つである Fluoxetine を投与したところ、新規環境における多動が減少した。一方で、抑うつ状態の増加に回復は認められなかった。CAMDI ノックアウトマウスにおける行動異常の一部は、脳内モノアミンの減少によるものであることが明らかとなった。

(4) CAMDI は HDAC6 と結合して中心体の成熟を制御する

CAMDI に結合する蛋白質をスクリーニングした結果、CAMDI は HDAC6 と結合してその活性を抑制することを明らかにした。安定化した微小管はアセチル化されていることが知られているが、HDAC6 はその微小管の脱アセチル化を制御する。中心体の中心子は微小管骨格からなり中心体に CAMDI が局在することから、CAMDI による中心体のアセチル化を調べた。その結果、CAMDI ノックアウトマウスにおいて中心体画分における微小管のアセチル化が減少していた。中心体の構成成分である g-tubulin も減少していたことから、中心体が未成熟であることが明らかとなった。

(5) CAMDI ノックアウトマウスの神経細胞移動と自閉症様行動は、胎生期の HDAC6 阻害剤投与で回復する

神経細胞の移動では、中心体の挙動が重要であることが知られている。そこで神経細胞の移動が行われる胎児期に HDAC6 の特異的阻害剤である TubastatinA を投与することで表現型の回復を試みた。その結果、神経細胞移動と共に、一部の行動試験において回復が認められた。これらの結果は、胎児期に治療を行うことで、自閉症様行動を回復させることができる可能性を示唆している (図 2)。



(図2) オープンフィールドテストにおけるマウスの移動距離。
溶媒のみの投与において CAMDI 欠損マウス(黒)は多動を示す。TubastatinA 投与によりその多動は回復する。

(6) CAMDI による中心体の制御機構の解析

大脳皮質発生中の神経細胞は、中心体と核が離れた後に再び距離縮めるという方式を繰り返すことで移動することが知られている。CAMDI 遺伝子ノックアウトマウスにおいて神経細胞の移動の異常が認められていることから、CAMDI が欠損することで、中心体と核との連動が破綻した結果、細胞移動の異常が観察されている可能性が示唆される。そこでまず野生型マウスに子宮内遺伝子導入法を用いて Centrin2/mCherry 遺伝子を導入して中心体を可視化することを試みた。スライスカルチャーを用いてライブイメージングを行ったところ、中心体の挙動が確認されたため、実験系が上手く機能していることを確認した。

<国内外における位置づけと今後の展望>

自閉症などの発達障害は、幼児期や学童期はもちろん、「大人の発達障害」と呼ばれるように、日常生活に大きな支障をきたし社会的な問題となっている。しかしその根本的な発症要因は未だ解明されていない。そのため、治療や対処法に関しても統一的な解釈がなく、患者数、治療費などによる社会的な損失は計り知れない。

国内外における自閉症の研究は、その原因として神経細胞移動やシナプスにおけるスパインの異常等が報告されている。また、GWAS などの解析から原因遺伝子候補が同定され、そのノックアウトマウスの作製から一剖検脳と同じ所見が見つかる等、研究が進められている。そのようなモデルマウスを用いて既存の治療薬が奏効するとの報告がある。一方で既存薬の中には作用機構が不明のものも多く、分子レベルで治療メカニズムが解明されている例はほとんどない。

精神疾患の研究において、遺伝子レベルで解析が進められている代表的な因子のひとつに DISC1 遺伝子がある。精神疾患多発家系の連鎖解析から染色体転移が起きている領域に存在する遺伝子として発見された。DISC1 遺伝子の異常は統合失調症や自閉症をはじめとする様々な精神疾患の患者で異常が報告されている。中心体やミトコンドリア、核などに局在するとの報告があり、多機能な蛋白質であると考えられている。

DISC1 の発現阻害やポイントミューテーションを持つ変異マウス、染色体転移で生じる切断型の DISC1 トランスジェニックマウスにおいて大脳皮質の神経細胞移動や行動異常が報告されている。結合蛋白質として数多くの蛋白質が同定されている。その機能として、

微小管や中心体、アクチンなど細胞骨格の制御や、細胞接着や細胞移動の制御、細胞内の輸送などに関連するとの報告がある。

CAMDI は、DISC1 に結合する蛋白質として同定した。現在までのところ、自閉症患者の解析からは CAMDI の遺伝子異常は見つかっていない。しかし、CAMDI 遺伝子が自閉症の患者で見つかっている原因ゲノム領域に存在すること、CAMDI ノックアウトマウスが自閉症様行動を示すことから、CAMDI の異常と何らかの精神疾患の発症と関連している可能性が示唆される。

さらに CAMDI の結合蛋白質として HDAC6 を同定した。CAMDI が HDAC6 と結合することで脱アセチル化活性を抑制し、中心体を不安定化させることで神経細胞移動の異常を引き起こし、結果として自閉症様行動を生じることが報告された。さらに神経細胞の移動が行われる胎生期に HDAC6 阻害剤を投与することで神経細胞の移動と自閉症様行動が回復すること報告した。分子メカニズムを明らかにした上で、関連した薬剤を用いて治療を行うことで効果を認めた初めての成果である。また、胎生期の治療であり対症療法ではなく、根本的な治療に結びつく可能性を秘めている (図 3)。

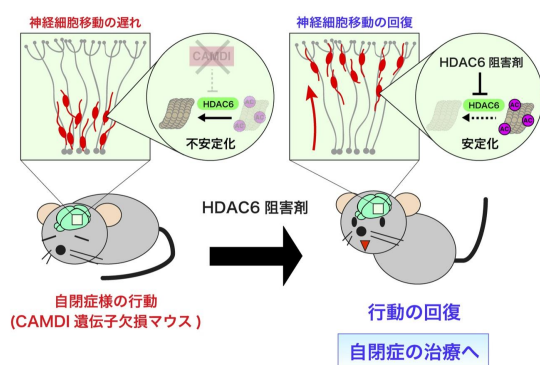


図 3 CAMDI 欠損マウスの自閉症様行動の回復

CAMDI は HDAC6 の活性を負に制御している。CAMDI 欠損マウスに HDAC6 阻害剤を投与することで、神経細胞の移動とともに、自閉症様行動の回復が認められた。

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 2 件)

全て査読有り

- ① Fukuda T., Nagashima S., Abe T., Kiyonari H., Inatome R., Yanagi S.

Rescue of CAMDI deletion-induced delayed radial migration and psychiatric behaviors by HDAC6 inhibitor.

EMBO Reports

2016; 17(12):1785-1798

DOI: 10.15252/embr.201642416

- ② Homma M, Nagashima S, Fukuda T., Yanagi S, Miyakawa H, Suzuki E, Morimoto T.
Downregulation of Centaurin gamma1A increases synaptic transmission at Drosophila larval neuromuscular junctions.
Eur J Neurosci.
2014;40(8):3158-70.
DOI: 10.1111/ejn.12681

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① 福田敏史、高橋智彦、稲留涼子、柳茂
Brain monoamine and emotional behavior in CAMDI-knockout mice.
第38回 日本神経科学大会
2015.7.28 - 31 (神戸)
- ② 玉井勇、長島駿、福田敏史、稲留涼子、柳茂
CRAGによって形成されるMitoTracker陽性の核内封入体の解析。
第38回 日本分子生物学会年会
2015.12.1 - 4 (神戸)
- ③ 柳茂、福田敏史、稲留涼子、長島駿
CRAGによるSRF活性化を介した神経細胞の生存シグナル機構。CRAG enhances neuronal cell survival through SRF activation
第37回日本神経科学学会大会
2014.9.11 (横浜) Oral
- ④ 坪井健悟、福田敏史、佐藤愛梨花、谷本悠祐、稲留涼子、柳茂
CAMDI遺伝子ノックアウトマウスにおける学習・記憶の行動学的解析。
第37回日本分子生物学会年会
2014.11.25 - 27 (横浜)
- ⑤ 高橋智彦、福田敏史、上原茉莉、佐藤真李子、稲留涼子、柳茂
CAMDIノックアウトマウスにおける脳内モノアミンレベルおよび抑うつ・不安様行動の解析。
第37回日本分子生物学会年会
2014.11.25 - 27 (横浜)

〔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〕

<https://www.toyaku.ac.jp/cms/wp-content/uploads/2016/10/プレスリリース分子生化学EMB0Rv7.pdf>

<http://www.ls.toyaku.ac.jp/content/> 「自閉症の根本治療にマウスで初成功-~次世代の治療戦略を提唱」-分子生化学研究室福田敏史講師、柳茂教授らのグループがembo-reports に論文を発表しました%E3%80%82

<https://www.nikkan.co.jp/articles/view/00403085>

<http://univ-journal.jp/10136/>

<http://news.mynavi.jp/news/2016/10/14/452/>

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：50372313

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし