

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500386

研究課題名(和文) シナプス接着蛋白 Cadm1 の自閉性障害変異導入マウスにおける分子病態の解析

研究課題名(英文) Studies on the influence of brain and neurons of mutation of synaptic cell adhesion molecule protein, Cadm1 using autism mouse models.

研究代表者

神保 恵理子(藤田恵理子)(Jimbo, Eriko)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20291651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自閉性障害患者は年々増加傾向にあるといわれている。自閉性障害は、脳発達障害であり、遺伝及び環境要因が関与し、分子病態の把握は難しい。原因候補遺伝子の多くは、脳で機能しており脳内で蛋白質複合体形成やシグナル伝達に影響する可能性が強く考えられる。本研究では、自閉性障害の分子病態の解明を目指し、これまで見出してきた候補遺伝子のひとつであるCADM1に注目し、複数のCadm1遺伝子改変マウスを用いて、Cadm1蛋白質複合体の形成及び局在の変化を可視化し、変異の影響を解析した。その結果、Cadm1変異蛋白質は、一部がシナプスに局在せず、神経細胞の成熟、Cadm1複合体の形成に影響を及ぼしていた。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorder is the neurodevelopmental disorder, characterized by impaired social interactions, social communication impairments. It seems that a combination of genetic and environmental, factors contribute to the pathogenesis of autism. Most candidate genes for conferring susceptibility to autism are known to play a role in brain development.

We previously found missense mutations, in the gene-encoding CADM1 in patients. In this study, we aimed to make clear the molecular mechanisms of Autism, and focus the Cadm1 gene and do some experiment about the protein-complex included Cadm1 using the mice of Cadm1-KO, Cadm1-KI and Cadm1-GFP-Tg. As the results, we found that the mutated CADM1 affected the synaptogenesis, the neuronal maturation, the formation of CADM1-molecular complex.

研究分野：神経分子生物学

キーワード：シナプス接着分子 Cadm1 変異

1. 研究開始当初の背景

脳発達障害である自閉性障害は、遺伝的な要因と環境的な要因とが複雑に絡み合って引き起こされていると推測されており、その包括的な分子病態の把握は難しい。アメリカ疾病予防管理センター (Centers for Disease Control and Prevention : CDC) の自閉性障害患者統計において、患者は年々増加傾向にあるといわれている。現在に至るまで、自閉性障害との関与が示唆される遺伝子及び蛋白質が多く報告されているものの、ひとつの遺伝子に集約されることなく未だ統一の見解が存在しない。しかしながら、これらの遺伝子の多くは、脳、神経において機能していることから、脳内機能と深いつながりがあるものと考えられてきた。これまでに我々が自閉性障害患者において変異を見出してきた遺伝子である *Cadml*、*GPCR* など脳で機能しており、多数の疾患関与遺伝子及び蛋白質との複合体形成やシグナル伝達における関与の可能性が強く考えられる。

CADM1 (別名 SynCam、RA175) と呼ばれている)は、申請者らが当初 RA175 として名付け発見した蛋白質であり、シナプス形成に関与する。この蛋白質は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属し、ホモフィリックな結合をする (Urase K et al.,2001; Fujita E et al.,2003 ; 2005)。 *Cadml* の細胞内領域の C 末端 PDZ 結合モチーフ (EYFI) は、シナプス前膜や後膜において様々なシナプス受容体、チャンネルと複合体を形成し機能シナプスを形成すると考えられているが、その複合体の構成蛋白及び機能には不明な点が多く残されている。自閉性障害におけるシナプス接着蛋白質群と疾患との関係は、CADM1 以外にも Neuroligin3、Neuroligin4、CNTNAP2 に変異が見られている (Jamain S et al.,2003; Bakkaloglu B et al., 2008)。

報告者は、これまで *Cadml* 欠損 (ノックアウト:KO)マウスを作製し(Fujita E et al.,2006)、*Cadml* 機能を解析してきた (Fujita E et al., 2006 ; 2007; Takayanagi Y et al.,2010)。自閉性障害患者とその家族に、CADM1 の 2 つの異なる点変異 (H246N, Y251S) を見出した (Zhiling Y et al., 2008)。 *Cadml*-KO マウスは、自閉性障害の特徴である不安の増大などの感情障害を示し、ヒト言語障害変異を導入した *Foxp2*-変異導入(ノックイン:KI)マウス (Fujita et al.,2008)と同様に生物言語に対応するマウス母子間の超音波音声の障害や Social Communication の異常を示した(Fujita E et al., PLoS One, 2012; Neurosci.lett. 2012)。 *Cadml*-KO マウスでは、*Neuroligin3*-KO マウスと同じように、自閉性障害の他の特徴を示さない。 *Neuroligin3* 変異導入(KI)マウスでは、KO マウスの表現系の他に不安の低下等を示すという報告がされており(Chadman KK. et al., 2008)、欠損と変異ではフェノタイプが多少なりとも異なる可能性を示唆している。また、In vitro 神経細胞培養系における遺伝子

導入法を用いた細胞生物学、生化学的解析では、変異 *Cadml* 蛋白質はメタロプロテアーゼに感受性が高く、その切断断片が小胞体に蓄積されることにより小胞体ストレスを誘導することが明らかにしてきた (Tanabe Y.,2008; Zhiling Y, Fujita E et al., 2008; Fujita E et al.,2010)。

こうした結果から、変異 CADM1 蛋白質自体の機能障害(loss-of-function)の他に、変異蛋白質による Gain-of-function との協調により自閉性障害を誘導する可能性を考えた(Momoi T et al., 2009; Fujita E et al., 2010)。しかしながら、In vitro 培養系では、過剰発現によるアーティファクトにより、変異蛋白質の蓄積を誘導する可能性も完全に否定できないことから実際の生体に近づける方法の開発及び解析が必要と考えられた。

また、結節性硬化症 (Tuberous sclerosis complex,TSC) に、全身の様々な組織に良性の腫瘍や先天性の病変の表現と共にてんかんや知的障害が見られる場合があり、自閉的な症状もかなり高頻度で観察されることから、自閉性障害との関連が示唆されている。原因遺伝子 TSC-1、TSC-2 の小胞体ストレス関与についての報告もあり (Ozcan U et al., Mol Cell. 2008) *Cadml* とのシグナル伝達との接点が推測される。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの結果や国内外の報告に基づき、自閉性障害の分子病態を明らかにするために、これまで見出してきた候補遺伝子のひとつである CADM1 を取り上げ、*Cadml*-KO マウスだけではなく、作製した *Cadml* 変異導入マウス、*Cadml* プロモーター誘導性蛍光蛋白質 GFP を発現させた遺伝子改変マウスを用いて、*Cadml*C 末端の PDZ 結合領域を介する複合体(シナプス受容体、チャンネル)の形成及び輸送を可視化して変異の影響を解析し(図1) *Cadml* 変異が誘導するマウス脳内での小胞体ストレス及びシナプス機能蛋白質の複合体形成不全による機能障害と複合体の膜輸送障害の解析を行った。また、小胞体ストレスの関与を明らかにするため、小胞体ストレスの調節機能を持つ結節性硬化症 (Tuberous sclerosis complex,TSC) の

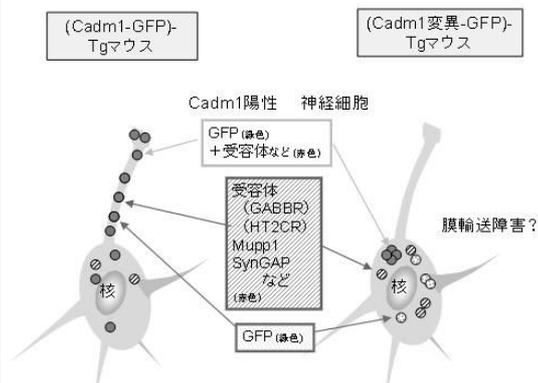


図1 Cadml変異蛋白質によるシナプス分子複合体の膜輸送障害

原因遺伝子 TSC-1/-2 の欠損マウスと交配し、変異 CADM1 による小胞体ストレスの自閉性障害への影響を考えた。

これら解析により、変異蛋白による Gain-of-function との関係解析し、CADM1 の機能障害 (Loss-of-function) との関係をも明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 動物について

Cadm1 変異導入-KI マウスの生理学的解析：行動解析を目的として *Cadm1*(Y251S)-KI マウスを 129 系から C57BL6/J 系に 10 回交配させることでバックグラウンドを移し、行動解析 (社会相互作用テストなど) を行った。

Cadm1-GFP-Tg マウスの作製：BAC クローンライブラリーの中から *Cadm1* プロモーター領域を含むものを用いて、遺伝子改変マウスを作製した。*TSC-1* 及び *TSC-2*-KO マウスについては順天堂大学小林先生からご供与いただいた。

2) *Cadm1*-GFP-Tg マウスの蛍光発現の解析：GFP の蛍光を固定などの処理を行うことなく、そのままを観察できる。脳を立体的または厚切片にて観察した。

3) CADM1 複合体の生化学的解析：Pull-down 法とイムノプロット法を用いて、CADM1 の C 端の PDZ 結合領域に結合する蛋白質、さらにそれらと複合体を形成する蛋白質を探索した。野生型 (WT) マウスと *Cadm1*(Y251S)-KI マウスの脳を用い、シナプス受容体、チャンネルについて、*Cadm1* と *Cadm1* 変異の結合に対する影響を観察した。なお、Pull-down 法には GST 融合蛋白質を用いた。解析した CADM1 複合体構成分子について、WT、*Cadm1*(Y251S)-KI マウスの脳及び神経細胞における局在を免疫染色にて解析した。

4) *Cadm1*(Y251S)-KI、*Cadm1*-KO マウスの脳から分離した神経細胞を用いた解析：樹状突起形成、シナプスにおける機能蛋白の膜輸送障害に関わる受容体 (GABA 受容体、セロトニン受容体) やシナプトフィシン、VGAT、vGluT1 など特異抗体を用いた免疫染色法で調べた。

5) GFP を用いた神経細胞及び領域の可視化：全神経細胞が *Cadm1* 陽性でなく、変異の影響が観察されない神経細胞が解析を妨げる可能性を取り除くため、*Cadm1*-GFP-Tg マウス及び *Cadm1*(Y251S)-GFP-Tg マウスの GFP 標識された CADM1 陽性神経細胞を用い、CADM1-MUPPI 複合体の局在の違いを解析した。

6) 変異 CADM1 が誘導する膜輸送障害に対する小胞体ストレスの影響の解析：結節性硬化症の原因遺伝子 *TSC-1/-2* の欠損マウス (*TSC*-KO) と *Cadm1*(Y251S)-KI の交配を行い、*Cadm1*(Y251S)-KI マウスと *Cadm1*(Y251S)-KI/*TSC-1/-2*-KO マウスの小

胞体ストレスと受容体の膜輸送障害を比較した。

7) *TSC1/-2*-KO と *Cadm1*(Y251S)-KI の交配による超音波障害の変化：Avisoft Bioacoustics 製の ultrasound 測定用機器を用いて 40-100kHz の波長を測定した。

8) *Cadm1*-GFP-Tg/*TSC*-KO マウス及び *Cadm1*(Y251S)-GFP-Tg/*TSC*-KO マウスの脳および神経細胞を用いた解析：小胞体ストレスに関する *TSC*-KO ヘテロマウスとコントロール (*Cadm1*-GFP)-Tg マウス、また (*Cadm1* 変異-GFP)-Tg を交配し、仔のマウス脳及び神経細胞を取り出し、免疫染色、イムノプロット法を用いた小胞体ストレス、蛋白質の膜輸送を検討した。

4. 研究成果

Cadm1 変異導入-KI マウス 129 系統から B57BL6 系統へのバッククロス 10 代目までの継代に約 2.5 年費やした。*Neurologin3*-KO マウスと *Neurologin3* 変異導入-KI マウスとの比較と同じように、*Cadm1*-KO マウスとの比較では、生存性の変化、顕著な異常、病的状態は示さなかった。自閉性障害との関わりがある social interaction の障害が表れたものの、大きな差は存在しなかった。また、*Cadm1*-KO マウスに見られた繁殖性の異常は、*Cadm1*-KI マウスでは見られなかった。

Cadm1 プロモーターの下流における蛍光蛋白質 GFP を発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。このマウスと *Cadm1*-KI マウスとの交配による *Cadm1* 陽性の神経細胞の可視化では、視床及び海馬領域における神経細胞の伸長に差が見られ、神経細胞の成熟に問題があることが示された。GFP 陽性神経細胞における CADM1 変異蛋白、シナプス受容体 (GABA 受容体)、シナプスマーカーである synaptophysin や Vesicular glutamate、Vesicular GABA Transporter などの変動を観察したところ、変異 *Cadm1* 蛋白の一部はシナプスに局在せず、小胞体、ゴルジ体周辺の細胞体領域に存在し、GABA 受容体、Vesicular GABA Transporter の増加や Vesicular glutamate については変化がなく、synaptophysin はやや減少していた。これは、培養細胞セルラインを用いた結果とほぼ一致しており、*Cadm1*-KI マウスの神経細胞においてシナプス障害が起きていることが示唆された。変異 CADM1 以外に、*Neurologin3* の変異 R451C は細胞体内に停留し、細胞膜、シナプスに輸送されない (Comolet D et al., 2004; Momoi T et al., 2009; Fujita E et al., 2010) ことが報告されており、機能障害には機能喪失だけでなく、機能獲得による可能性がさらに強く示唆された。

CADM1 は、シナプス前膜において CASK と結合することが知られており、Pull-down 解析により、シナプス後膜における *Cadm1* 複合体の構成分子には、multi-PDZ 蛋白であ

る MUPP1 が含まれることが明らかとなった (Fujita E. et al.,2013)。また、MUPP1 (220kDa) 全長の CADM1 が強く結合する MUPP1 の 1-5 番目の PDZ(MUPP1PDZ(1-5)) (Fujita E et al., 2013) と後半部分後半の領域 Mupp1(PDZ6-13)の PDZ 領域をリガンドとして、複合体を形成するシナプス受容体について解析したところ、複合体構成分子の存在を数種類見出した。CADM1 は MUPP1、GABBR2 や 5HTCR を含む様々なシナプス受容体と複合体を形成する可能性が示唆された (Fujita E. et al., 2013) (図 2)。しかしながら、これらの複合体構成分子の一部について免疫染色可能な抗体が存在しなかったことから、今後もひきつづき研究を行い、CADM1 変異が複合体に及ぼす影響について調べていく。

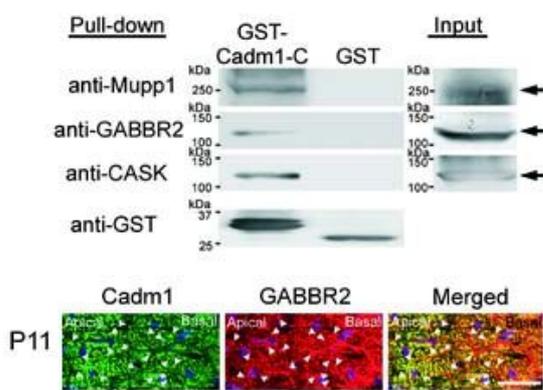


図 2. Cadm1のPDZ結合領域を介した蛋白質複合体

自閉性モデルマウスとして作成された *Cadm1* 変異導入マウスを用いた CADM1 変異における *Cadm1*-MUPP1 複合体の影響についての解析では、培養細胞系への遺伝子導入による過剰発現と異なり、CADM1 変異が及ぼす複合体形成の影響については、*in vitro* において野生型に比較し、変異型の結合が弱い傾向が表れた。

自閉性障害への小胞体ストレスの影響についての検討をするために、*Cadm1*-KI マウスと *Tsc-1/-2* を欠失した KO マウスとの交配を行い、近年自閉性障害の指標とされているマウス間の超音波音声を測定したところ、野生型に比較して *Tsc-1/-2* 欠損により超音波音声数の増加、*Cadm1*-KI が加わった場合、わずかに増加傾向にあった。このことは小胞体ストレスの関与を示す可能性がある。しかしながら、各種遺伝型の発達過程の仔マウス生後 10-15 日間の解析では、*Tsc-1/-2* マウスと *Cadm1/Tsc-1/-2* マウスに小胞体ストレスマーカーである GPR78、CHOP 等の顕著な変化は見られなかった。

本研究では、シナプス機能障害と自閉性障害の病態との関連についての研究を遂行した。本期間内での生じた課題について、今後

さらなる検討を行う。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

- 1 . Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo EF, Kojima K, Nagata K, Iwamoto S, Yamagata T. Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. *Brain Dev.* 2016;38(1):91-99. doi: 10.1016/j.braindev.2015.04.006. 査読有
- 2 . Tanabe Y, Fujita-Jimbo E, Momoi MY, Momoi T. CASPR2 forms a complex with GPR37 via MUPP1 but not with GPR37(R558Q), an autism spectrum disorder-related mutation. *J Neurochem.* 2015;134(4):783-793. doi: 10.1111/jnc.13168. 査読有
- 3 . Fujita-Jimbo E, Tanabe Y, Yu Z, Kojima K, Mori M, Li H, Iwamoto S, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T. The association of GPR85 with PSD-95-neurologin complex and autism spectrum disorder: a molecular analysis. *Mol Autism.* 2015;6:e17. doi: 10.1186/s13229-015-0012-5. 査読有
- 4 . Mizuno M, Matsumoto A, Hamada N, Ito H, Miyauchi A, Jimbo EF, Momoi MY, Tabata H, Yamagata T, Nagata K. Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders. *J Neurochem.* 2015;132(1):61-69. doi: 10.1111/jnc.12943. 査読有
- 5 . Matsumoto A, Mizuno M, Hamada N, Nozaki Y, Jimbo EF, Momoi MY, Nagata K, Yamagata T. LIN7A depletion disrupts cerebral cortex development, contributing to intellectual disability in 12q21-deletion syndrome. *PLoS One.* 2014;9(3):e92695. doi: 10.1371/journal.pone.0092695. 査読有
- 6 . Fujita-Jimbo E, Momoi T. Specific expression of FOXP2 in cerebellum improves ultrasonic vocalization in heterozygous but not in homozygous *Foxp2* (R552H) knock-in pups. *Neurosci Lett.* 2014;566:162-166. doi: 10.1016/j.neulet.2014.02.062. 査読有
- 7 . Golan N, Kartvelishvily E, Spiegel I, Salomon D, Sabanay H, Rechav K, Vainshtein A, Frechter S, Maik-Rachline G, Eshed-Eisenbach Y, Momoi T, Peles E. Genetic deletion of *Cadm4* results in myelin abnormalities resembling Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Neurosci.* 2013;33(27):10950-10961. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0571-13.2013. 査読有
- 8 . Fujita E, Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. A complex of synaptic adhesion molecule CADM1, a molecule related to autism spectrum disorder, with MUPP1 in the cerebellum. *J Neurochem.* 2012;123(5):886-894. doi: 10.1111/jnc.12022. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. 楊志亮、小島華林、神保恵理子、山形崇倫、桃井隆、桃井真里子 . 自閉性障害原因遺伝子 CADM1 に結合する足場タンパク MUPP1 の遺伝子変異解析 . 第 57 回日本小児神経学会学術集会 . 2015 年 5 月 28 日、大阪
2. Matumoto A, Inaguma Y, Nakano Y, Yang Z.L., Nakayama K, Sakamoto S, Jimbo JF, Iwamoto S, Nagata K, Yamagata T, TIMELESS mutation in a patient with autism spectrum disorder (ASD) and circadian rhythm disorder. 第 57 回日本小児神経学会学術集会 . 2015 年 5 月 28 日、大阪
3. 神保恵理子、桃井隆 . The Foxp2 promoter-mediated mcherry-visualized thalamocortical pathway and its alteration in the Foxp2(R552H)-KI mice. 第 38 回第 35 回日本神経科学会 . 2015 年 7 月 30 日、神戸
4. 神保恵理子、桃井真里子 . 発達障害はいつ形成されるか？先天性？後天性？あるいは両方か～発症及び病態修飾のメカニズムについて(発達障害における遺伝性要因(先天的素因)について)～ . 第 56 回日本小児神経学会学術集会(招待講演). 2014 年 5 月 30 日、静岡
5. 神保恵理子、インホフベアト、桃井隆 . JAM 欠損マウスにおける超音波障害と自閉性障害 . 第 37 回日本分子生物学会年会 . 2014 年 11 月 27 日、横浜
6. Jimbo E, Tanabe Y, Momoi T. Trappc5, a constituent of TRAPP complex, is up-regulated in cerebellum expressing FOXP2 and involved in synaptogenesis. 第 37 回日本神経科学大会 . 2014 年 9 月 13 日、横浜
7. 楊志亮、小島華林、神保恵理子、山形崇倫、桃井隆、桃井真里子 . 自閉性障害原因遺伝子 CADM1 に結合する足場タンパク MUPP1 の遺伝子変異解析 . 第 56 回日本小児神経学会学術集会 . 2014 年 5 月 30 日、静岡
8. 小島華林、神保恵理子、松本歩、山形崇倫、桃井隆、桃井真里子 . 自閉性障害原因遺伝子変異と小胞体ストレスの関与 . 第 56 回日本小児神経学会学術集会 . 2014 年 5 月 29 日、静岡
9. 神保恵理子、ゆじりん、山形崇倫、小島華林、松本歩、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子 . 自閉性障害患者に見出した GPR85 変異についての解析 . 第 36 回日本神経科学大会 . 2013 年 6 月 22 日、京都
10. 田辺裕子、藤田恵理子、桃井隆 . マウス脳における自閉性障害に関係する Cadm1 と Cntnap2 分子複合体の解析 . 第 36 回日本神経科学大会 . 2013 年 6 月 21 日、京都

11. 神保恵理子、小島華林、田辺裕子、山形崇倫、桃井真里子、桃井隆 . 自閉性障害に関与するシナプス接着因子 Cadm1 と Multiple PDZ domain protein(Mupp1)の関与 . 第 35 回日本神経科学大会 . 2012 年 9 月 18 日～2012 年 9 月 21 日、名古屋
12. 小島華林、松本歩、楊志亮、神保恵理子、山形崇倫、桃井真里子 . CADM1 遺伝子変異をもつ自閉性障害患者のリンパ球を用いた小胞体ストレス感受性についての検討 . 日本人類遺伝学会第 57 回大会 . 2012 年 10 月 24 日～2012 年 10 月 26 日、東京
13. Kojima K, Yamagata T, Saito M, Matsumoto A, Jimbo EF, Momoi MY. Secretin receptor and the associated molecular processes relevant to autism spectrum disorder. American Society of Human Genetics (ASHG) 62 nd annual meeting. 2012 年 11 月 6 日～2012 年 11 月 10 日、San Francisco
14. Matsumoto A., Inaguma Y, Yang Z, Nakano Y, Goto M, Nakayama K, Jimbo EF, Osaka H, Iwamoto S, Nagata K, Yamagata T. Genetic analysis for circadian rhythm abnormality in autism spectrum disorder. American Society of Human Genetics (ASHG) 62 nd annual meeting. 2012 年 10 月 7 日、Baltimore

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神保 恵理子 (JINBO Eriko)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20291651

(2)研究分担者

桃井 隆 (MOMOI Takashi)

東京医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：40143507