

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14356

研究課題名(和文) 近交系マウス系統を用いた社会性の障害と回復に関わる分子基盤の研究

研究課題名(英文) Study on the molecular basis underlying the disorder and recovery of sociality in inbred mouse strains

研究代表者

古市 貞一 (FURUICHI, TEIICHI)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・教授

研究者番号：50219094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝的に均一な近交系マウスで低社会性と高社会性を示す2系統に着目し(それぞれBTBRとC57BL/6)、大脳皮質と基底核に注目したマイクロアレイによる比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、発現量の増加と減少を示す興味深い遺伝子がいくつか検出された(解析中・未発表のため、遺伝子名と発現データは未掲載とする)。また、ASDモデルマウスの一つであるCAPS2 KOマウスを用いて、同様の比較解析や行動解析を行った。小脳のアレイ解析では、開口放出関連のStx5aやSyt6の発現上昇、発達障害関連のRett症候群原因遺伝子MeCP2やオキシトシン受容体Oxtrの発現減少が検出された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed comparative transcriptomic analysis of the cerebral cortex and basal ganglia between C57BL/6 and BTBR mice that show high and low sociality, respectively. The results showed the presence of some interesting genes with increased or decreased expression levels in BTBR brain compared to C57BL/6 brain. We also identified increased expression of exocytosis-related genes Stx5a and Syt6 and decreased expression of developmental disorder-related genes Mecp2 and Oxtr in the cerebellum of CAPS2 KO mice compared to the wild type mice.

研究分野：分子神経科学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 トランスクリプトーム CAPS2 社会行動

## 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (autism spectral disorder, ASD) は、社会的コミュニケーションの障害と常同行動を特徴とする脳の発達障害である。2-3歳の幼児期に診断され、有病率は先進国や開発途上国を問わず人口の約1%にも達する。治療的な教育や対処療法以外には有効な治療法がなく根治出来ないため、患者を抱える家族への負担は重く社会的なインパクトが大きい。そのため、ASDは世界各国の国民健康上の重要課題であり、発症機序の解明と診断法と治療法の早期確立が急務となっている。ASDの病因は不明である。一卵性双生児や同胞での発病一致率が高いことから、遺伝要因が発病リスクに強くはたらく多因子疾患と考えられている。この他に非遺伝要因(環境要因やエピジェネティクス)の寄与も指摘されている。しかし、いまだにキーとなる遺伝子は同定されていない。この問題の一つは、現在のASDの診断は問診だけで客観的で科学的な根拠に乏しく、現行で診断されるASDは生物学的にはヘテロと考えられる点にある。実際に、ASDは知的障害がほとんど見られない軽度から知的障害を伴う重度まで異質性があり、てんかん・パニック・興奮・不眠などを合併するなどさまざまである。また、そもそもヒトの遺伝的背景には個人差があるため、多因子疾患の遺伝要因の解明をさらに難しくしている。

## 2. 研究の目的

自閉症スペクトラム障害は社会行動の障害を特徴とする脳の発達障害で、高い有病率と有効な治療法がないため、その病因の解明および診断法や治療法の確立が急務となっている。遺伝要因が強く寄与する多因子疾患で、患者とその家族の比較的大規模な遺伝子解析によりヒトゲノム中の遺伝子の約1%がリスクに関連すると示唆された。しかし、遺伝的多様性があるヒトの多因子疾患を明らかにすることは、他の精神疾患と同様に極めて困難である。本研究では、この問題を打開するためのモデルとして遺伝的に均一な近交系マウスで社会性が高い系統と低い系統(それぞれC57BL/6系統とBTBR系統)に着目し、2系統間の比較エクソーム解析、および低社会性系統が高社会性系統との集団生活で社会復帰をする場合の比較RNASeq解析等を行い、社会性に関する障害と回復の分子基盤の解明をめざす。

## 3. 研究の方法

(1) BTBRとC57BL/6は、それぞれ低社会性と高社会性の行動表現型を示す。これら2系から大脳皮質、海馬、線条体、間脳、中脳、小脳などを解剖して次世代シーケンサー等を用いて比較トランスクリプトーム解析を行う。BTBR単独とC57BL/6単独より得られるデータについては社会性の欠損に関する遺伝要因について、また、BTBRとC57BL/6の

混在より得られるデータについては社会性の回復や社会復帰に関する環境要因について、バイオインフォマティクス解析を行い、関連遺伝子の同定、それら遺伝子の共発現ネットワークとタンパク質間相互作用ネットワークの解析を行う。

(2) 社会性の欠損と回復のマウス脳内において、全エクソーム解析で同定される遺伝子、および既知のASD関連、不安やストレス関連の遺伝子やタンパク質の発現分布の変化を免疫組織化学や定量的RT-PCR等で脳内発現マッピングを行い、関連脳領域を明らかにする。

(3) 全データを総合して、キーとなる遺伝子、コアとなるネットワークを予測し、シナプス回路異常や社会性などの行動形質異常が明らかになっているCAPS2 KOとdex3マウスを用いて、上記の遺伝子やタンパク質の解析を適用し、共通性と相違性を明らかにする。マウスの社会性の欠損と社会復帰に関わる全エクソームデータを、ヒトの既知のASD関連遺伝子およびネットワークの理解に還元するとともに、ASDの血中診断マーカーや治療標的分子の候補がないかを検討する。

## 4. 研究成果

自閉症スペクトラム障害(ASD)は社会行動の障害を特徴とする脳の発達障害で、ゲノム中の遺伝子の約1%が発症リスクに関連すると示唆されている遺伝要因が強い多因子疾患である。高発症率と有効な治療法が無いため、病因究明が待たれている。しかし、遺伝的多様性をもつヒトの多因子疾患を明らかにすることは極めて困難である。本研究では、遺伝的に均一な近交系マウスで低社会性と高社会性を示す2系統に着目し(それぞれBTBRとC57BL/6)社会性の異なる形質および集団生活などの生育環境による部分的な社会性回復におけるトランスクリプトーム解析を行った。経費の関係で、比較エクソーム解析は断念し、大脳皮質と基底核に注目したマイクロアレイによる比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、発現量の増加と減少を示す興味深い遺伝子がいくつか検出された(解析中・未発表のため、遺伝子名と発現データは未掲載とする)。また、ASDモデルマウスの一つであるCAPS2 KOマウスを用いて、同様の比較解析や行動解析を行った。小脳のアレイ解析では、開口放出関連のStx5aやSyt6の発現上昇、発達障害関連のRett症候群原因遺伝子MeCP2やオキシトシン受容体Oxtrの発現減少が検出された。また、ストレスに対する行動と代謝生理の変化に関して解析を行い、慢性ストレス負荷時にストレスホルモンとインスリンの分泌に異常をもつことを明らかにした。

## 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 8 件)

Hayashi K, Furuya A, Sakamaki Y, Akagi T, Shinoda Y, Sadakata T, Hashikawa T, Shimizu K, Minami H, Sano Y, Nakayama M, and Furuichi T. The brain-specific RasGEF very-KIND is required for normal dendritic growth in cerebellar granule cells and proper motor coordination. *PLoS ONE* 12(3):e0173175, 2017 査読有 doi.org/10.1371/journal.pone.0173175

Sadakata, T., Shinoda, Y., Ishizaki, Y., and Furuichi, T. Analysis of gene expression in  $Ca^{2+}$ -dependent activator protein for secretion 2 (Cadps2) knockout cerebellum using GeneChip and KEGG pathways. *Neurosci. Lett.* 639: 88-93, 2017 査読有 doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.068

Yoshikawa, F., Sato, Y., Tohyama, K., Akagi, T., Furuse, T., Sadakata, T., Tanaka, M., Shinoda, Y., Hashikawa, T., Itohara, S., Sano, Y., Ghandour, SM., Wakana, S., and Furuichi, T. Mammalian-specific central myelin protein Opalin is redundant for normal myelination: structural and behavioral assessments. *PLoS ONE* 11(11): e0166732, 2016 査読有 doi.org/10.1371/journal.pone.0166732

Shinoda, Y., Nakajima, Y., Iguchi, H., Tatsumi, S., Kitaoka, M., Nakajima, M., Takahashi, T., Fujiwara, M., and Furuichi, T. Galacto-N-biose is neuroprotective against glutamate-induced excitotoxicity in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 791: 711-717, 2016 査読有 doi:10.1016/j.ejphar.2016.10.010

Shinoda, Y., Ishii, C., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Ishii, Y., Sano, Y., Iwasato, T., Itohara, S., and Furuichi, T. CAPS1 stabilizes the state of readily releasable synaptic vesicles to fusion competence at CA3-CA1 synapses in adult hippocampus. *Scientific Reports* 6:31540, 2016 査読有 doi:10.1038/srep31540

Nakajima, Y., Iguchi, H., Kamisuki, S., Sugawara, F., Furuichi, T, Shinoda, Y. Low doses of the mycotoxin citrinin protect cortical neurons against glutamate-induced excitotoxicity. *J. Toxicol. Sci.*, 41:311-319, 2016 査読有 doi: 10.2131/jts.41.311

Hosono, M., Shinoda, Y., Hirano, T., Ishizaki, Y., Furuichi, T, Sadakata, T. Interaction of  $Ca^{2+}$ -dependent activator protein for secretion 1 (CAPS1) with septin family proteins in mouse brain. *Neurosci. Lett.* 617: 232-235, 2016 査読有 doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.035

Mishima, Y., Shinoda, Y., Sadakata, T., Kojima, M., Wakana, S., and Furuichi, T. Lack of stress responses to long-term

effects of corticosterone in Caps2 knockout mice. *Scientific Reports* 5:8932, 2015 査読有 doi: 10.1038/srep08932

〔学会発表〕(計 24 件)

古市貞二. 分泌小胞関連タンパク質 CAPS 遺伝子改変マウスが示すシナプスの形態と生理の異常および社会行動障害について. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 長崎県長崎市・長崎大学坂本キャンパス. 2017 年 3 月 28 日 ~ 30 日

T. Furuichi. Databasing brain gene expression information. 4th INCF Japan Node International Workshop Advances in Neuroinformatics 2016 and 14th INCF Nodes Workshop. RIKEN Suzuki Umetaro Hall, Wako, Japan. 2016 年 5 月 28 日 ~ 5 月 29 日

T. Furuichi. Enhancing Brain Transcriptome Database by Neural Gene Ontology. 第 39 回日本神経科学大会. 神奈川県横浜市・パシフィコ横浜. 2016 年 7 月 20 日 ~ 7 月 22 日

Y. Ishii, C. Ishii, Y. Shinoda, Y. Sano, T. Furuichi. A deficiency of  $Ca^{2+}$ -dependent activator protein for secretion 1 affects hippocampal long-term potentiation. Society for Neuroscience, San Diego, CA, U.S.A., Nov. 12-16, 2016

M. Wada, M. Ide, T. Atsumi, K. Yagishita, M., Katakai, Y., Shinoda, T. Furuichi, K., Kansaku. A rubber tail task in  $Ca^{2+}$ -dependent activator protein for secretion (CAPS2) knockout mice. Society for Neuroscience, San Diego, CA, U.S.A., Nov. 12-16, 2016

A. Sato, N. Munemura, Y. Sano, Y. Shinoda, T. Sadakata, N. Morita, M. Yuzaki, T. Inoue, M. Hashimoto, H. Ohwada, H. Nishibe, Y. Yamaguchi, T. Furuichi. Brain Transcriptome Database (BrainTx). 4th INCF Japan Node International Workshop Advances in Neuroinformatics 2016 and 14th INCF Nodes Workshop, RIKEN Suzuki Umemotaro Hall, Wako, Japan, 2016 年 5 月 28 日 ~ 5 月 29 日

D. Miyamoto, H. Ikeno, Y. Okamura-Oho, Y. Okamura, N. Munemura, A. Sato, Y. Yamaguchi, R. Kanzaki, T. Furuichi. Parallelization of the registration method for ISH images into the 3D standard brain atlas. 4th INCF Japan Node International Workshop Advances in Neuroinformatics 2016 and 14th INCF Node Workshop. 2016 年 5 月 28 日 ~ 5 月 29 日

Furuichi, T. Brain development transcriptome database and developmental disorder. The 15th China-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI2015). Haeundae

Centum Hotel, Pusan, Korea. Dec. 20-22, 2015

Furuichi, T. The molecular mechanisms of brain development and disorders. INCF Neuroinformatics 2015. Pullman Cairns International, Cairns, Australia, Aug. 20~20, 2015

Furuichi, T., Shinoda, Y., Sadakata, T. Animal models of autism spectrum disorders: CAPS2 is critical for proper brain development and social behavior, International Symposium of the Center for Animal Disease Models 2015, Gakushi Kaikan, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, Jul. 21, 2015

古市貞二. 遺伝子改変動物を用いた自閉症スペクトラム障害(ASD)の基礎研究. 第1回生物学的自閉症研究会, 東京都文京区・東大薬, 2015年3月14日  
Shinoda, Y., Sato, A., Sadakata, T., Nishibe, H., Morita, N., Inoue, T., Yuzaki, M., Yamaguchi, Y. and Furuichi, T. Brain Transcriptome Database (BrainTx, formerly CDT-DB)-Profiling of spatio-temporal gene expression during postnatal development of mouse brain. Neuroinformatics 2015. Cairns, Australia. Aug. 20~22, 2015

Minami, H., Yamaga, R., Shinoda, Y., Sakimura, K., Abe, M., and Furuichi, T. Conditional knockout and optogenetic study on the involvement of the secretion-related protein CAPS1 in oxytocin-associated social and maternal behavior. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月30日

Katakai, M., Shinoda, Y., Christoph, S., and Furuichi, T. Possible involvement of the secretion-related protein CAPS2 in regulation of endogenous opioid, dynorphin secretion. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月30日

Yagishita, K., Shinoda, Y., Senba, R., and Furuichi, T. Possible involvement of CAPS2 in environmental enrichment-dependent adult neurogenesis in mouse hippocampus. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月29日

Hosaka, K., Shinoda, Y. and Furuichi, T. Expression and function of the mouse RasGEF1 family proteins. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月29日  
Sadakata, T. and Furuichi, T. Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月28日

Shinoda, Y., Ishii, C., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Itohara, S., Iwasato, T., and Furuichi, T. CAPS1 associates tethering of SVs on the synaptic plasma membrane. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月28日

Shinoda, Y., Sadakata, T., Hirase, H., and Furuichi, T. CAPS2-The positive regulation factor of BDNF secretion and the candidate gene for autism. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月13日

Katakai, M., Shinoda, Y., and Furuichi, T. Possible involvement of the secretion-related protein CAPS2 in regulation of dynorphin, one of the endogenous opioids, secretion. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月13日

21 Hosaka, K., Shinoda, Y. and Furuichi, T. Function and expression of the mouse RasGEF1 family proteins. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月13日

22 Nakajima, Y., Shinoda, Y., and Furuichi, T. Dual imaging of SVs and DCVs exocytosis. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月11日

23 Minami, H., Yamaga, R., Shinoda, Y., Sakimura, K., Abe, M., and Furuichi, T. Conditional knockout and optogenetic study on the involvement of the secretion-related protein CAPS1 in oxytocin-associated social and maternal behavior. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月11日

24 Ishii, Y., Ishii, C., Shinoda, Y., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Itohara, S., Iwasato, T., and Furuichi, T. CAPS1 stabilizes SVs docking state in hippocampal CA3-CA1 synapses. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月11日

〔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://www.lmn.bs.noda.tus.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古市 貞一 (FURUICHI, Teiichi)

東京理科大学・理工学部・教授

研究者番号：50219094

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )