

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K01975

研究課題名(和文) 自閉症モデルマウスにおける律動的神経活動と伝播様式

研究課題名(英文) Spreading of rhythmic neuronal activity in ASD model mice.

研究代表者

森 琢磨 (Mori, Takuma)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：70545798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症モデルマウスであるCASKヘテロノックアウトマウスを対象として、そのシナプス機能を電気生理学的解析した。CASKヘテロノックアウトマウスの急性脳スライスからパッチクランプ記録法によってシナプス入力を計測した。その結果、興奮性シナプス入力が増加し、抑制性シナプス入力が減少していることが明らかになった。多くの自閉症モデルマウスで観察されるように、シナプスの興奮抑制バランスが攪乱されており、そのシナプス異常の分子メカニズムにはNMDA受容体の発現調節が関わるということが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症は100人あたり1人が報告されており、男性が女性のおよそ4倍の発生頻度であることから、実験動物を用いた基礎研究でもオス動物を用いた実験がほとんどであった。本研究はメス動物を用いた研究であり、発達の目覚ましい自閉症研究の知見を活用し、その適用範囲を拡大できる研究と言える。また、発達期の神経機能成熟に関わるNMDA受容体の関与を示したことは、CASK遺伝子欠損だけでなく、NMDA受容体の関わる遺伝子異常のシナプス機能異常への波及効果も期待できる。

研究成果の概要(英文)：I used CASK heterogenous knockout mice as a model animals of autism spectrum disorder and analyzed synaptic functions using electrophysiological methods. We recorded neurons in acute brain slices, including somatosensory cortex, of CASK heterogeneous knockout mice using patch clamp recording and analyzed synaptic inputs. We found that the frequency of excitatory synaptic inputs was increased and that that of inhibitory synaptic inputs was decreased in CASK heterogenous knockout mice. As reported in other ASD model mice, an imbalance of excitatory and inhibitory synaptic inputs were observed in CASK heterogeneous knockout mice and the expression of NMDA receptor 2B subunit by CASK is indicated as a molecular mechanism of the synaptic imbalance.

研究分野：神経科学

キーワード：X染色体不活性化 シナプスバランス異常 自閉症

1. 研究開始当初の背景

- (1) 自閉症を含む発達障害患者からの大規模ゲノム解析の発展によって、自閉症などの発症に関わる遺伝子が同定されてきた。そして、以前からメンデル遺伝に従って、伴性遺伝をしめすレット症候群などの自閉症患者からは、X染色体上に位置する遺伝子が同定されてきた。小脳および脳幹橋部の低形成をともなう小頭症 (Microcephaly and Cerebellar and Pontine Hypoplasia, MICPCH 症候群) は Xp11.4 に位置する CASK 遺伝子の変異が原因であることが報告された(Najm et al. Nature Genetics 2008)。MICPCH 症候群は、小頭症に加えて、発達障害様行動特性、小児てんかん、眼振をともなう先天性障害である。MICPCH 症候群はそのほとんどが女性で観察されているが、これは CASK 遺伝子が X 染色体上に位置するため、男性では 1 本しかない X 染色体上の CASK 遺伝子の変異が致死性であることが原因であると考えられていた。
- (2) 自閉症における神経生理学および行動学的研究はそのほとんどがオス動物を対象としていた。これは、自閉症の発症率に 3 : 1 程度の性差が存在することと、マウスの生理周期がマウスの行動や神経機能に大きく影響することが原因であった。加えて、CASK ノックアウトマウスのオス動物は出生後 2 4 時間以内に死亡することが報告されている(Atasoy et al. PNAS 2007)。Atasoy らは CASK ノックアウトマウスから初代培養神経細胞を調整し、電気生理学的にシナプス入力を解析した。その結果、興奮性シナプス入力が増加し、よく生成シナプス入力が低下していることが明らかになった。しかしながら、ノックアウト動物が生育しないため *in vivo* 解析がほとんど行われてこなかった。
- (3) CASK の分子機能に関する研究は、多面的に実施されてきた。CASK はキナーゼ活性をもつ CaMK ドメイン、他のタンパク質との結合を担う L27 ドメイン、PDZ ドメイン、GK ドメインなどの分子結合様式が明らかになっていた。特に、CASK はシナプス接合部に局在し、シナプスの機能成熟に関わる Neurexin と PDZ ドメインを介して結合することから、CASK ノックアウトマウスの初代培養細胞におけるシナプス入力の変化は、Neurexin を介した分子メカニズムが関わっていると想定されていたが、実験的には検証されていなかった。

2. 研究の目的

- (1) CASK ヘテロノックアウトメスマウスは、MICPCH 症候群のモデルマウスであると想定されていたが、その脳構造などの解析はほとんどなされていなかった。また、MICPCH 症候群患者で見られる、小児てんかんなどの病態がマウスでも観察されるのかは不明のままであった。本研究では、まず、ヘテロノックアウトマウスの生育を解析し、MICPCH 症候群モデル動物としての妥当性を検証することを目指した。
- (2) メスマウスは女性と同様、X 染色体不活性化というエピゲノムメカニズムがあるため、父由来と母由来の X 染色体が別々に機能し、それら細胞がモザイク状に分布することが明らかになっている。この X 染色体不活性化のために、CASK ヘテロノックアウトメスマウスでは、CASK 発現細胞と CASK 欠損細胞がモザイク状に分布していることが想定された。しかし、これら細胞の CASK 発現を明らかにする手法として、神経細胞からの single cell RT-PCR 法を確立し、電気生理記録した細胞の遺伝子プロファイルと電気生理プロファイルを同時に明らかにすることを目指した。そして、CASK 欠損によって *in vivo* でも、培養細胞と同様に、シナプスの興奮・抑制の異常が観察されるのか？を明らかにすることを目指した。

- (3) CASK 欠損によるシナプス機能異常に関わる分子メカニズムを解明することは、CASK 欠損症の治療を開発する上で必要不可欠である。CASK 欠損細胞に CASK ドメイン欠損タンパク質を強制発現させ、その電気生理機能を解析することで、シナプス機能を回復させるドメイン欠損 CASK と機能を回復できないドメイン欠損 CASK を同定することを目指した。

3. 研究の方法

- (1) CASK ヘテロノックアウトマウスの発達に伴う体重を計測し、その後灌流固定された脳の形態を比較した。CASK ヘテロノックアウトマウスは自発的なてんかん発作がそれまで観察されてこなかったため、GABA 受容体阻害薬の Pentylentetrazol (PTZ) を腹腔内に投与し、その後のてんかん発作の重症度を解析した。
- (2) CASK ヘテロノックアウトマウスから急性脳スライスを作成し、パッチクランプ法によって電気生理記録を行なった。シナプス入力もしくは活動電位を記録したあとでパッチ電極内に細胞質を吸引した。そして、細胞質を逆転写反応に用いて PCR 反応を行うことで、記録細胞内に CASK mRNA が存在するかどうかを判定した。
- (3) CASK 遺伝子を神経細胞に補完するために、子宮内エレクトロポレーション法をマウス胎児に適用した。CASK ノックダウンプラスミドベクターと CASK ドメイン欠損タンパク質発現ベクターをマウス胎児脳に導入し、遺伝子が導入された神経細胞から電気生理記録した。同様に、NMDA 受容体 2B サブユニット(GluN2B)に対する shRNA を発現する GluN2B ノックダウンベクターを子宮内エレクトロポレーションすることで、GluN2B の発現レベルがシナプス機能に与える影響を明らかにした。

4. 研究成果

- (1) CASK ヘテロノックアウトマウスは、Atasoy らが報告した通り 24 時間以内に全てが死亡した。そして生後 1 週齢の時点ですでに、体長が小さくなっており、成長に伴う体重も、野生型マウスと比較して、低体重となることが明らかになった (図 1)。CASK ノックアウトマウスに PTZ を投与し、けいれん発作を誘発し、その痙攣発作の重症度を判定した。その結果、ヘテロ欠損メスマウスでは、重症度の継時変化と最大重症スコアが野生型よりも大きかった (図 2)。以上の結果から、CASK ヘテロノックアウトマウスが、MICPCH 症候群の病態を反映するモデルマウスとして妥当であることが示唆された。

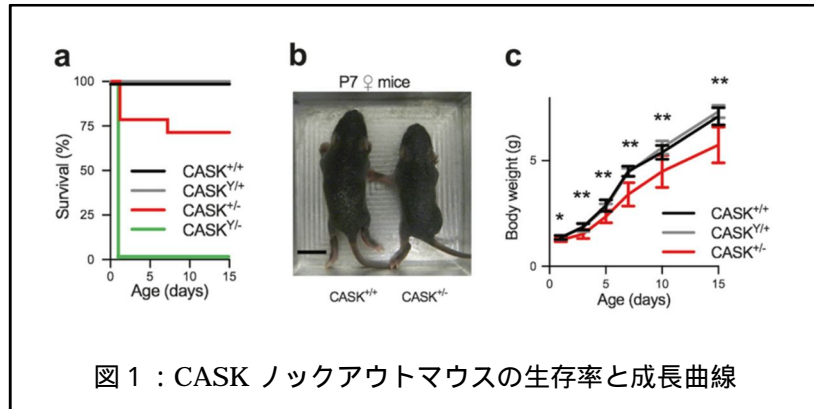


図 1 : CASK ノックアウトマウスの生存率と成長曲線

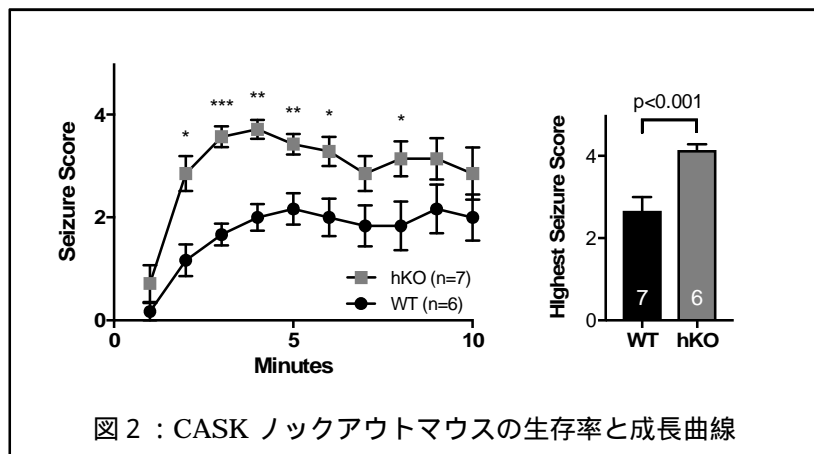


図 2 : CASK ノックアウトマウスの生存率と成長曲線

(2) CASK ヘテロノックアウトマウスの急性脳スライスを作成し、大脳新皮質 2 / 3 層の錐体細胞からパッチクランプ電気生理記録をおこなった。ナトリウムチャンネル阻害剤テトロドトキシン存在下で微小シナプス電流を

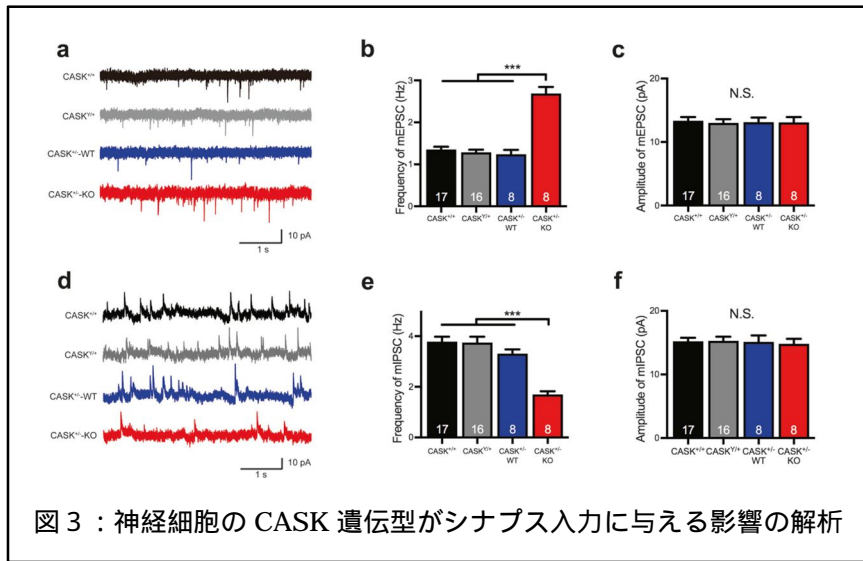


図 3 : 神経細胞の CASK 遺伝型がシナプス入力に与える影響の解析

計測し、興奮性および抑制性シナプス電流の振幅と発生頻度を解析した。その結果、CASK ヘテロノックアウトマウス脳内の CASK 発現細胞は野生型マウスと同様のシナプス入力様式を示す一方で、CASK 欠損細胞では興奮性入力が増加し、抑制性入力が増減していた(図 3)。

(3) CASK は複数の機能ドメインをもつが、CASK ノックアウトによって変化するシナプス機能に

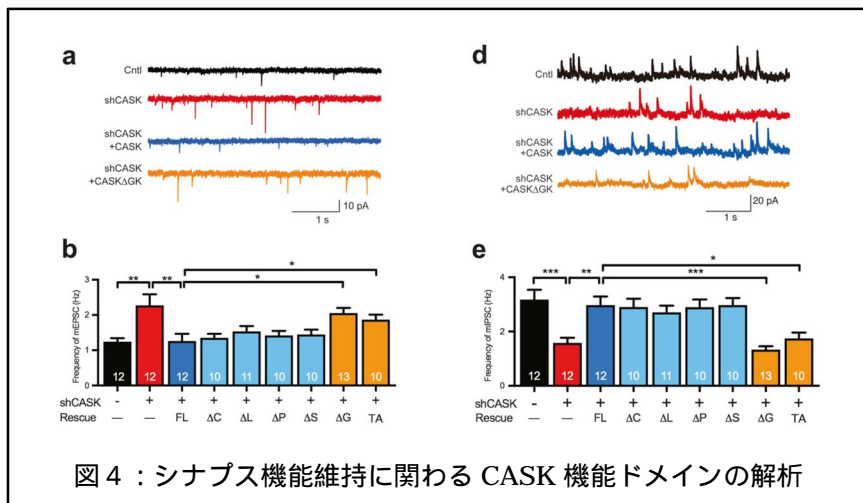


図 4 : シナプス機能維持に関わる CASK 機能ドメインの解析

関与する機能ドメインを同定することを目指した。そのために、CASK ノックダウンによるシナプス異常を回復する CASK 変異体を解析した。CASK ノックダウンによるシナプス機能異常は、GK ドメイン欠損 CASK 以外の変異体の補完によって回復することが明らかになった。このことから、CASK の GK ドメインがシナプス機能維持に必要であることが示唆された。CASK の GK ドメインは、NMDA 受容体 2B サブユニットの発現に関わることが知られていた(Huang and Hsueh, BBRC, 2009)。GluN2B ノックダウンによって、CASK ノックダウンと同様のシナプス機能異常が観察された(図 5)。最後に、CASK ノックダウン細胞に GluN2B 遺伝子を補完することで、シナプス機能が回復したことから、CASK によるシナプス機能維持には GluN2B 遺伝子発現の調節に関わることが強く示唆された。

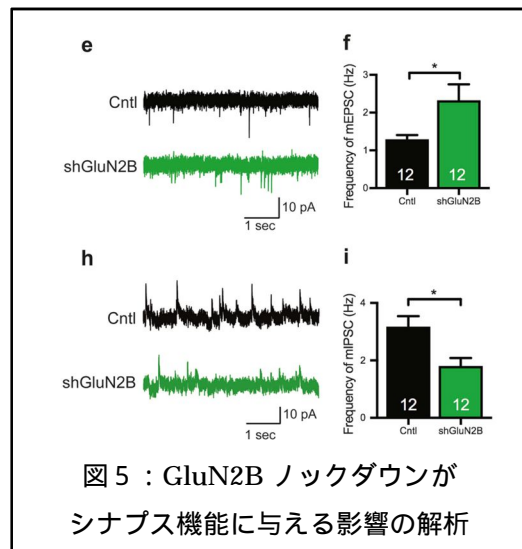


図 5 : GluN2B ノックダウンがシナプス機能に与える影響の解析

参考文献

1: Atasoy D, Schoch S, Ho A, Nadasy KA, Liu X, Zhang W, Mukherjee K, Nosyreva ED, Fernandez-Chacon R, Missler M, Kavalali ET, Südhof TC. Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 13;104(7):2525-30.

2: Huang TN, Hsueh YP. CASK point mutation regulates protein-protein interactions and NR2b promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 24;382(1):219-22.

3: Najm J, Horn D, Wimplinger I, Golden JA, Chizhikov VV, Sudi J, Christian SL, Ullmann R, Kuechler A, Haas CA, Flubacher A, Charnas LR, Uyanik G, Frank U, Klopocki E, Dobyns WB, Kutsche K. Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nat Genet*. 2008 Sep;40(9):1065-7.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Cao Xueshan, Kouyama-Suzuki Emi, Pang Bo, Kurihara Taiga, Mori Takuma, Yanagawa Toru, Shirai Yoshinori, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 533
2. 論文標題 Inhibition of DNA ligase IV enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in mouse brain neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 449 ~ 457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kurihara Taiga, Kouyama-Suzuki Emi, Satoga Michiru, Li Xue, Badawi Moataz, Thiha, Baig Deeba Noreen, Yanagawa Toru, Uemura Takeshi, Mori Takuma, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 524
2. 論文標題 DNA repair protein RAD51 enhances the CRISPR/Cas9-mediated knock-in efficiency in brain neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 621 ~ 628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Xueshan CAO, Wen QIU, Bo PANG, Mengyun ZHOU, Anuradha MEHTA, Qi GUO, Yoshinori SHIRAI, Takuma MORI, Katsuhiko TABUCHI	4. 巻 69
2. 論文標題 Inhibition of CASK Expression by Virus-mediated RNA Interference in Medial Prefrontal Cortex Affects Social Behavior in the Adult Mouse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 THE SHINSHU MEDICAL JOURNAL	6. 最初と最後の頁 45 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11441/shinshumedj.69.45	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mori Takuma, Kasem Enas A., Suzuki-Kouyama Emi, Cao Xueshan, Li Xue, Kurihara Taiga, Uemura Takeshi, Yanagawa Toru, Tabuchi Katsuhiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Deficiency of calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase disrupts the excitatory-inhibitory balance of synapses by down-regulating GluN2B	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1079 ~ 1092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-018-0338-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murabe Naoyuki, Mori Takuma, Fukuda Satoshi, Isoo Noriko, Ohno Takae, Mizukami Hiroaki, Ozawa Keiya, Yoshimura Yumiko, Sakurai Masaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Higher primate-like direct corticomotoneuronal connections are transiently formed in a juvenile subprimate mammal	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34961-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osanai Yasuyuki, Shimizu Takeshi, Mori Takuma, Hatanaka Nobuhiko, Kimori Yoshitaka, Kobayashi Kenta, Koyama Shinsuke, Yoshimura Yumiko, Nambu Atsushi, Ikenaka Kazuhiro	4. 巻 66
2. 論文標題 Length of myelin internodes of individual oligodendrocytes is controlled by microenvironment influenced by normal and input-deprived axonal activities in sensory deprived mouse models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2514 ~ 2525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------