

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06905

研究課題名（和文）シナプス接着分子LRFN2の発達障害発症機序の解明

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of Neurodevelopmental Disorders mediated by the Synapse Adhesion Molecule LRFN2

研究代表者

守村 直子（MORIMURA, NAOKO）

滋賀医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：00349044

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：興奮性シナプスの構造・機能を制御するシナプス接着分子LRFN2は、ノックアウトマウスにおいてヒト自閉症様・統合失調症様の行動異常とシナプス異常が認められている。本研究課題では、霊長類脳における発達障害発症メカニズムを検証するために、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術によるLRFN2ノックアウトカニクイザルの作製に着手した。また、正常カニクイザルの発達脳における構造や軸索走行について明らかにするため、核磁気共鳴画像（MRI）解析および拡散テンソル画像（DTI）解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症や統合失調症などの発達障害とシナプス接着分子の関連性を示す研究報告の蓄積から、近年、シナプス異常と発達障害の因果関係が支持されている。マウス（齧歯類）を用いた研究から多くの発見が見出されている一方で、ヒト（霊長類）との脳構造や機能における進化的な差が大きいため治療法に結びかない現状がある。興奮性シナプスの制御に関わり、かつ自閉症や統合失調症の患者に変異が認められているLRFN2遺伝子欠損非ヒト霊長類サルが作出されることにより、基礎知見と臨床応用を結ぶ橋渡しができるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：LRFN2, a synaptic adhesion molecule that regulates the structure and function of excitatory synapses, has been shown to cause human autistic-like and schizophrenic-like behavioral and synaptic abnormalities in knockout mice. In this research project, we started to develop LRFN2 knockout crab-eating macaques by CRISPR/Cas9 genome editing technology in order to examine the mechanism of neurodevelopmental disorders in the primate brain. In addition, nuclear magnetic resonance imaging (MRI) and diffusion tensor imaging (DTI) were performed to elucidate the structure and axon running in the developing brain of the normal crab-eating macaque.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス接着分子 発達障害 非ヒト霊長類

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

適切な脳機能を司る神経回路形成にはシナプス接着分子を含めたシナプス分子群の役割が重要である。ここ数年シナプス分子が自閉症などの脳発達障害の関連遺伝子となる報告が急増した。これにより『シナプス異常と発達障害』の因果関係が学術的にも社会一般にも広く知られてきている (Forrest MP et al. *Nat. Rev. Neurosci.* 2018)。その一方で、マウスとヒト脳構造・機能、および神経回路には進化的な差が大きいため、ヒト脳病態に即した発達障害発症の分子メカニズムは依然不明のままであり、このことが発達障害に対する創薬・治療法に辿り着けない大きな要因の一つになっている。

膜貫通型分子をコードするシナプス接着分子 LRFN2 (SALM1 と知られる) は、足場タンパク質 PSD-95 と直接結合してシナプス後肥厚サイズを規定する役割と、NMDA 受容体および AMPA 受容体と分子複合体を形成してポストシナプスへの集積および細胞表面発現を制御する役割をもつ (Morimura et al. 2007, 2006; Wang et al. *J. Neurosci.* 2006; Ko et al. *Neuron* 2006; Mah et al. *J. Neurosci.* 2010; review in *Nat. Rev. Neurosci.* 2007; *Protein Cell* 2014; *Curr. Opin. Neurobiol.* 2017, 2011)。Lrfn2 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* 研究から、Lrfn2 は海馬のシナプス構造およびシナプス可塑性を制御すること、海馬依存的な記憶・学習を制御すること、社会的ひきこもりや情報処理機能の指標となるプレパルス抑制に異常がみられヒト自閉症様行動・統合失調症様行動を呈することが分かった。加えてヒト LRFN2 ゲノム上の一塩基変異型が自閉症患者および統合失調症患者に存在し、機能的結合分子 PSD-95 との結合量を低下させる変異体であることを示した (Morimura et al. *Nat. Commun.* 2017)。また作業記憶特異的な異常を示す学習障害有症家系で LRFN2 遺伝子座のマイクロデリションが見つかり (Thevenon et al. *Eur. J. Hum. Genet.* 2016) 受刑者を対象にした全ゲノム関連解析 (GWAS) では LRFN2 と反社会性人格障害との関連性が示唆されている (Rautiainen et al. *Trans. Psychiatry* 2016)。これらを踏まえると、LRFN2 の役割は、齧歯類に限らず霊長類の高次脳機能に影響を及ぼす発達障害発症の分子メカニズムに深く寄与しているものと推察される。

近年の非ヒト霊長類実験動物『サル』の遺伝子操作技術と個体レベル解析は、マーモセット (新世界ザル) のみならずカニクイザル (旧世界ザル・マカク属) でも可能になっている (Zhang W et al. *Nature* 2018; Chen et al. *Cell* 2017; Liu Z et al. *Nature* 2016; Seita et al. *Sci. Rep.* 2016)。カニクイザルはヒトに近い大脳皮質を持っていることから、発達障害モデルとなる LRFN2 遺伝子改変カニクイザルの作出に成功すれば、LRFN2 を介する発達障害発症分子メカニズムの解明や、臨床応用可能な分子標的治療の実現化、さらには障害モデルサルを用いた前臨床試験が可能になるであろう。また、MRI および fMRI の脳画像診断技術の進展により、ヒト発達障害患者の脳構造変化や機能異常に関する情報が蓄積している。LRFN2 欠失によって観察されたカニクイザル脳構造変化はそのままヒト患者情報とすり合わせることも可能になる。

以上のことから本研究は、研究領域の前進につながることを予想される遺伝子改変カニクイザルを作出することで、発達障害の分子メカニズム解明に貢献できるものと思われる。

2. 研究の目的

LRFN2 (SALM1) は興奮性シナプスの構造・機能を制御するシナプス接着分子である。遺伝子欠損マウスでは海馬依存的な記憶学習力の向上、社会的ひきこもり、プレパルス抑制障害、輪回しへの異常固執などヒト発達障害に酷似した行動表現型が認められ、また同時に、自閉症および統合失調症患者に特有な一塩基変異多型を同定した (Morimura et al. *Nat. Commun.* 2017)。しかしながら、マウス脳における Lrfn2 の分子機能をヒト脳に置き換えて解釈することは難しく、結果的に、シナプス接着分子 LRFN2 のヒト脳機能における役割や発達障害発症のメカニズム解明には結びついていない。本研究では、ヒト脳構造・機能に近縁で遺伝子操作の可能な非ヒト霊長類カニクイザルを用いてマウス知見をヒトへ外挿できる橋渡し研究を展開し、創薬・新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9 ゲノム編集による LRFN2 遺伝子欠損カニクイザル (LRFN2 ノックアウトサル) の作出

所属機関所有の各産地のカニクイザルからゲノムを抽出し、LRFN2 遺伝子のシークエンス解析を行なって産地間特有の SNP 変異を検証した。同定した LRFN2 遺伝子配列を基にして CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>) による CRISPR/Cas9 の標的配列を決定し、pCAG-EGxxFP と px330 発現ベクターを用いて各ターゲット遺伝子とそれに対応したガイド RNA 配列の実質的な切断活性を HEK293T 細胞で検証した [single-strand annealing assay (SSA アッセイ)]。切断活性を反映した EGFP 蛍光発現の程度は顕微鏡観察と FACS 解析で評価した。

(2) カニクイザル標準発達脳 MRI および DTI 解析

出生直後から成体までの脳標本を収集し、3T MRI 装置 (Siemens 社製) および 4.7T MRI 装置 (Burkar 社製) を使用して MRI 画像 (T1, T2 画像) および拡散強調画像 (DWI) を取得し

た。DWI データはコンピュータ解析を進め、拡散テンソル法によるトラクトグラフィ（DTI）を抽出できるような撮像条件を検証し、サル脳構造に関するデータ収集を行った。

4 . 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 ゲノム編集による LRFN2 遺伝子欠損カニクイザル（LRFN2 ノックアウトサル）の作出

各産地のカニクイザル LRFN2 遺伝子のシーケンス解析を行なった結果、産地間特有の SNP 変異が複数確認された。カニクイザル LRFN2 遺伝子エクソン 2 は ATG コドンおよびタンパク質コード領域のほぼ全てが含まれており、イントロン 1 からイントロン 2 で産地間の変異塩基がない領域に絞り CRISPR/Cas9 の標的配列を選定して 4 種の px330-gRNA を作製した。SSA アッセイにてエクソン 2 の開始コドン欠失効果が高い gRNA のペアが選定できており、サル受精卵での確認を進めている。

(2) カニクイザル標準発達脳 MRI および DTI 解析

出生直後から成体までの約 20 個の固定脳標本を収集した。3T および 4.7T MR 装置でそれぞれ MRI 画像（T1, T2 画像）および DWI 画像取得のための至適サンプル保定と撮像条件を決定することができた。最若齢で生後 2 日齢の DTI 解析を行うことができた。

< 引用文献 >

Forrest MP, et al. Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci* 19(4):215-234 (2018). doi: 10.1038/nrn.2018.16.

Morimura N, et al. Lrnf2/SALM1, a synaptic leucine-rich repeat-containing transmembrane protein regulates synapse formation and function. *Neurosci Res* 58 S44 (2007).

Morimura N, et al. Comparative analysis of structure, expression and PSD95-binding capacity of Lrnf, a novel family of neuronal transmembrane proteins. *Gene* 380(2):72-83 (2006). doi: 10.1016/j.gene.2006.05.014.

Wang CY, et al. A novel family of adhesion-like molecules that interacts with the NMDA receptor. *J Neurosci* 26(8):2174-83 (2006). doi: 10.1523/JNEUROSCI.3799-05.2006.

Ko J, et al. SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of excitatory synapses. *Neuron* 50(2):233-45 (2006). doi: 10.1016/j.neuron.2006.04.005.

Mah W, et al. Selected SALM (synaptic adhesion-like molecule) family proteins regulate synapse formation. *J Neurosci* 30(16):5559-68 (2010). doi: 10.1523/JNEUROSCI.4839-09.

Morimura N, et al. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrnf2/SALM1-deficient mice. *Nat Commun* 12;8:15800 (2017). doi: 10.1038/ncomms15800.

Thevenon J, et al. Heterozygous deletion of the LRFN2 gene is associated with working memory deficits. *Eur J Hum Genet* 24(6):911-8 (2016). doi: 10.1038/ejhg.2015.221.

Rautiainen MR, et al. Genome-wide association study of antisocial personality disorder. *Transl Psychiatry* 6(9):e883 (2016). doi: 10.1038/tp.2016.155.

Zhang W, et al. SIRT6 deficiency results in developmental retardation in cynomolgus monkeys. *Nature* 560(7720):661-665 (2018). doi: 10.1038/s41586-018-0437-z.

Chen Y, et al. Modeling Rett Syndrome Using TALEN-Edited MECP2 Mutant Cynomolgus Monkeys. *Cell* 169(5):945-955.e10 (2017). doi: 10.1016/j.cell.2017.04.035.

Liu Z, et al. Autism-like behaviours and germline transmission in transgenic monkeys overexpressing MeCP2. *Nature* 530(7588):98-102 (2016). doi: 10.1038/nature16533.

Seita Y, et al. Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body. *Sci Rep*. 6:24868 (2016). doi: 10.1038/srep24868.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oura Seiya, Noda Taichi, Morimura Naoko, Hitoshi Seiji, Nishimasu Hiroshi, Nagai Yoshitaka, Nureki Osamu, Ikawa Masahito	4. 巻 4
2. 論文標題 Precise CAG repeat contraction in a Huntington's Disease mouse model is enabled by gene editing with SpCas9-NG	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02304-w	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 Ichise Misato, Sakoori Kazuto, Katayama Kei-ichi, Morimura Naoko, Yamada Kazuyuki, Ozawa Hiroki, Matsunaga Hayato, Hatayama Minoru, Aruga Jun	4. 巻 15
2. 論文標題 Leucine-Rich Repeats and Transmembrane Domain 2 Controls Protein Sorting in the Striatal Projection System and Its Deficiency Causes Disturbances in Motor Responses and Monoamine Dynamics	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2022.856315	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 NAOKO MORIMURA, HIROKI YASUDA, KAZUHIKO YAMAGUCHI, KEI-ICHI KATAYAMA, NAOKO H. TOMIOKA, KAZUYUKI YAMADA, SEIJI HITOSHI, TAKEO YOSHIKAWA, JUN ARUGA.
2. 発表標題 Autism-like behaviors and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrln2/SALM1-deficient mice.
3. 学会等名 The 10th IBRO World Congress of Neuroscience IBRO2019
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------