

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06901

研究課題名(和文) 自閉症性差形成メカニズム「性ステロイド仮説」を自閉症モデルマウスを用いて検証する

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism causing sex differences in ASD

研究代表者

金子 律子(大谷律子)(Ohtani-Kaneko, Ritsuko)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：00161183

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)：ヒト自閉症に類似した「社会性の低下」と「感覚異常」を持ち、これらに雄優位の特徴を持つ自閉症モデルマウス(Collapsin mediator protein 4欠損(KO)マウス)を用いて、自閉症症状に雌雄差を生じるメカニズムについて、「性ステロイド仮説」を中心に検証を行った。まず自閉症表現型の早期検出法の検討を行った。母子間コミュニケーションの指標である超音波発声パターン解析により、生後1週間で野生型とKOマウスの雌雄差検出を可能にした。その後のステロイド暴露実験は個体差が激しく有意な影響を明らかにできなかったが、トランスクリプトーム解析により発現にKOマウスで雌雄差のある遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症には出現頻度や症状に性差が存在する。自閉症男児患者のwhole-exome sequencing解析により、Crmp4遺伝子の1塩基置換のみを持つ事例を見出した。さらにCrmp4欠損(KO)マウスには雌雄差のある社会性行動の低下や感覚異常が現れること、KOや点変異により樹状突起形成が異常になることを報告した。今回は自閉症発症の早期検証に使える超音波発声パターン分類報告や、トランスクリプトーム解析による雌雄差形成候補遺伝子を報告した。KOマウスのこれらの知見は、自閉症発症や雌雄差形成メカニズムに繋がる重要な情報であり、自閉症研究や予防法開発にとって重要なものとして社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：Suitable models to analyze sex differences in ASD pathogenesis remain insufficient. In this study, we performed experiments using autism model mice (Collapsin mediator protein 4 deficiency (KO) mice) that have characteristics of "impaired sociality" and "sensory abnormalities" in a male-predominant manner. We recorded isolation-induced ultrasonic vocalizations (USVs) emitted from wild-type (WT) and KO littermates, classified USVs into 10 types, and compared the number of USVs in each type by genotypes and sex. We found male KO mice exhibited a reduction in the total number of USVs and most of those USV types. We therefore got a suitable ASD animal model and tool for assessing sex-based communication deficits during the early postnatal period. Although the results obtained from steroid exposure experiments were severely different among individuals and could not reveal significant effects, transcriptome analysis revealed genes with differences in expression between sexes in KO mice.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉症 雌雄差 Crmp4欠損マウス 超音波発声 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

自閉症(自閉症スペクトラム障害, ASD)には、出現頻度や症状に性差が存在することが知られている。また2013年以降、米国精神医学会のASD診断基準(DSM-5)では、社会性の低下や強い拘り等に加え、感覚異常が加えられた。本課題研究者は、whole-exome sequencing解析により、自閉症男児患者にCollapsin Response Mediator Protein 4 (CRMP4)遺伝子の1塩基置換のみを持つ事例を見出した。またこれに関連して、*Crmp4*の同じ部位の同様の点変異や遺伝子欠損が起こす様々なphenotypeを下のように明らかにしつつあった。

CRMP4について(研究当初の背景): Collapsin response mediator proteins (CRMPs)は、軸索の反発因子・セマフォリン3Aの細胞内シグナル伝達分子として最初に同定されたタンパク質である(Goshima et al., 1995)。神経回路の発達に関与することが示されている(Arimura & Kaibuchi, 2007; Yamashita & Goshima, 2012)。また5つのサブタイプ(CRMP1~5)が見つかっており、CRMP1欠損(-KO)マウスは空間学習や記憶の障害を持つなど、欠損マウスの表現型が当時次第に明らかになっていった。

CRMP4は、マウスの性的二型神経核での性差形成タンパク質をプロテオミクス解析により網羅的に検索した本課題研究者の研究(課題名「脳の性差発現機構の解明」,特定領域研究,2007-2008)の中で、性差形成に関与する候補タンパク質として見つかった。その後、*in situ* hybridization法によりマウス各齢・各脳部位でのCRMP4 mRNA発現や*Crmp4*-KOマウスで起こる層構造やニューロンの形態異常を報告した。CRMP4遺伝子変異を持つ自閉症男児患者の発見以来、自閉症との関係で*Crmp4*-KOマウスの様々な行動実験や感覚実験を行った。それにより*Crmp4*-KOマウスの社会性行動の低下や感覚異常(嗅覚や温度感覚)、単一匂い刺激に対する興奮性の異常(Fos陽性細胞分布異常)遺伝子発現異常(GABAやGluRに関連する遺伝子に顕著な発現異常)など様々なphenotypeを見出し、それらの多くに性差が存在することを明らかにした(Tsutiya et al., 2017など)。

自閉症の性差について: 精神疾患の診断・統計マニュアルDSM-5では、自閉症スペクトラム障害(Autism Spectrum Disorders: ASD)は、「社会的コミュニケーションと社会的相互作用の障害」「限定された、あるいは、反復した行動・興味・活動」の2つを主症状とする発達障害である。またDSM-5では、DSM-4では診断基準に入っていなかった「感覚刺激に対する過敏さや鈍感さ」が新たに加えられた。また自閉症には男女差があり、男児が診断される確率は女児の2~16倍(報告により異なる)とされる。またその症状にも男女差が見られることが知られている(National autistic society, USA)。

自閉症の性差をめぐる「性ステロイド仮説」について: 生殖機能に関連する脳の性分化(性周期を持つ雌の脳と、持たない雄の脳への分化など)を含め、周生期に雄の精巣から分泌されるテストステロンが脳の性差に大きく影響をすることは、げっ歯類を中心に哺乳類一般に古くから良く知られている(Gorski et al., 1978)。自閉症が男児に多い点については、胎児期のテストステロンが関与する(fetal testosterone theory, 性ステロイド仮説)、X染色体が関与する(X chromosome theory)、Y染色体が関与する(Y chromosome theory)などの仮説が出されている。性ステロイド仮説(総説, Pfaff et al., 2011)は、上述のように周生期のテストステロン(あるいはテストステロンが脳内で変換されたエストロジオール)が脳の性分化を左右するこ

とが広く知られている、妊娠時の母体血中テストステロン濃度と子供の自閉症症状の程度との関連がヒトで複数報告されている (Auyeung et al., 2010 など) こと等から支持されている。しかしヒトでの証明は困難であり、また自閉症モデルマウスには性差が顕著であるものが極めて少ないため、「性ステロイド仮説」が検証できていないのが状況であった。

2. 研究の目的

自閉症の発症頻度や症状に明瞭な性差が存在し、そのメカニズムとして「性ステロイド仮説 (fetal testosterone theory)」が提唱されていることは、前述した通りである。自閉症の原因遺伝子とされるものは 100 以上報告されている。しかし、性差が明瞭な自閉症モデルマウスがない、あるいは、性差に注目して調べられた自閉症モデルマウスが殆どいないため、仮説の検証がこれまで出来ていなかった。今回、自閉症様 phenotype に雌雄差がある自閉症モデルマウス (*Crmp4*-KO マウス) を用いて、雌雄差形成に性ステロイドホルモンが関与している可能性について調べることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

【実験項目 1】

通常、自閉症の行動テストは 6 週以降に Three chamber test や Social test を実施する。しかしそれではマウスが 6 週になるまで待たなくてはならない。そこでもっと早期に自閉症様 phenotype を調べられないか、検討した。

既に使用したことのある親から分離した際に仔マウスが発声する超音波発声 (USVs) を生後 7 日にレコーディングし、 Avisoft SASLab を用いて、超音波の解析を行い、発声パターンから 10 種類に分類し、一定時間でそれぞれのタイプの超音波発声の回数を記録した。そして、野生型および *Crmp4*-KO マウスの雌雄について、それぞれのタイプの発声回数の平均を統計的に比較した (Shiono et al., 2022)。

【実験項目 2】

ステロイド仮説の検証のために、メス *Crmp4*-KO マウスが出生前後のテストステロン (T) またはビスフェノール A (BPA) 投与により、オス *Crmp4*-KO マウスに類似した自閉症様異常を示すようになるか調べる実験を実施した。投与方法としては、T については皮下注射、BPA については嗜好物であるクッキーに添付して食べさせる方法を選択した。また対照群としては、T 投与については、溶剤のみを皮下注射、BPA についても溶剤のみをクッキーに浸み込ませて食べさせた。

生後 7 日目に、親から分離した際に仔マウスが発生する超音波発声を記録し、上記と同様に解析し、野生型および *Crmp4*-KO マウス雌雄間での総発声数、10 種類に分類した超音波発声パターン毎の回数や頻度を比較した。

【実験項目 3】(トランスクリプトーム解析)

サンプルには *Crmp4*-KO マウス及び WT マウス(生後 1 日)の雄の嗅球を用いた。雄の嗅球 (n=3) を用い Strand-specific mRNA-Seq (NovaSeq 6000 システム, ユーロフィンジェノミクス株式会社に委託) で解析した。ASD リスク遺伝子との対応を行った。つまり、トランスクリプトーム解析結果から *Crmp4*-KO マウス嗅球で変動のあった遺伝子と直近で報告された ASD リスク遺伝子 (Satterstrom et al., 2020) が一致した遺伝子を抽出した。さらに、トランスクリプトーム解析で変動のあった遺伝子と ASD リスク遺伝子が一致した遺伝子のうち、トランスクリプトーム

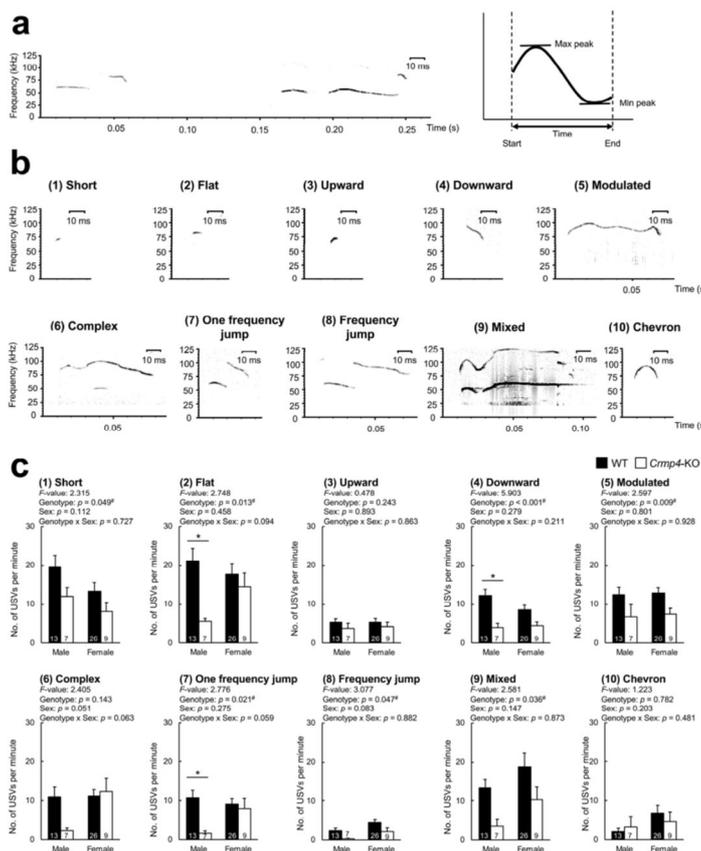
解析で LogCPM 2.3 以上の遺伝子について、雌雄野生型および雌雄 *Crmp4*-K0 マウスサンプル(嗅球、PD1) についてリアルタイム PCR で検証した。また *Tbr1* に着目し、その下流の遺伝子であり ASD や他の精神疾患に関連する *Reln* についても検証した。

4. 研究成果

【実験項目 1】

まず雌雄の野生型と雌雄の *Crmp4*-K0 マウスについて、巣から分離した際に発生する超音波発声 (USVs) の総数を計測した。その結果 7 日齢の野生型雌雄と雌の *Crmp4*-K0 マウスに比べ、同日齢の雄の *Crmp4*-K0 マウスでは USVs の発声回数が有意に減少することが示された。

次に、USVs の発声パターンを計測し、それぞれのタイプごとの発声回数について、上記と同様に 4 群 (野生型および *Crmp4*-K0 マウスの雌雄) で平均回数の比較を統計的に比較した (Two-way Anova followed by Tukey 's post-hoc test)。その結果を次頁の図(1)に示す。これらの解析結果から、10 パターンの USVs のうち、3 つ (Flat、Downward、One frequency jump) については、鳴き声の総数と同様に、雌雄の野生型や雌の *Crmp4*-K0 マウスに比べて、雄の *Crmp4*-K0 マウスではこれらのパターンの鳴き回数が有意に減少することが分かった。また、それら 3 パターンに加えて、10 パターンのうち 4 パターン (Short、Complex、Frequency jump、Mixed) では、統計的有意差とはならなかったものの、雄の鳴き声の減少が認められた。また Modulated では雌雄とも *Crmp4*-K0 マウスでは野生型より鳴き回数が減少する傾向が見られた。以上の結果から、生後 7 日目には *Crmp4*-K0 マウスの雄に既に自閉症様 phenotype が出現しており、USVs を指標として早期に自閉症発症を調べることが示された。



図(1) 超音波発声 (USVs) の実際の波形(a)、10 タイプに波形を分類 (b) 野生型および *Crmp4* 欠損マウスでのそれぞれのタイプの平均発声回数(c) (Shiono et al., 2022)

【実験項目 2】

本実験実施期間中に、コロナ感染拡大が始まり、実験が完全にストップした。ホルモン投与や行動解析など一切の実験が出来なかった。実験が再開時にまずジェノタイピングによりマウスの遺伝子型を決めることから再開せざるを得ず、本実験再開までに時間を要した。

本実験は ASD 発症の雌雄差に関するステロイド仮説の検証のために、妊娠マウスに対してステロイドホルモン (T) あるいは内分泌かく乱物質 (BPA) を投与し、ASD 発症頻度を超音波発声解析から調査する実験である。実験再開後、当初は T を妊娠メスマウス注射で投与し超音波発声を出生後 7 日に記録したが、この方法では *Crmp4*-K0 マウス仔の出生率が非常に低下してしまった。そこで、T より効果弱い BPA をマウスの好物であるクッキーに混ぜて食べさせるというストレスや作用が穏やかな方法に変更して実験した。生後 7 日目に、親から分離した際に仔マウスが発声する USVs の記録を行った。そして、10 タイプに鳴き声を分類後、それぞれの回数を計測した。しかしこの投与方法により生まれた仔マウスの遺伝子型を調べたところ、*Crmp4*-K0 マウスの出生率が極端に低くなり N 数を確保することが困難であった。さらに、超音波発声の総発声数、および 10 種類に分類した超音波発声パターン毎の回数や頻度について、個体差が非常に激しかったため、個体レベルの解析が困難であった。

T および BPA 暴露実験は、超音波発声の個体差が激しくまた *Crmp4*-K0 マウスの出生率が著しく低下してしまった。そのため、これらの暴露が自閉症様症状に及ぼす影響を明らかにすることが出来なかった。出生率が低下した原因は当初は注射によるストレスと考えたが、クッキーに BPA を浸み込ませて与えた場合にも出生率が低下したため、ストレス以外の原因があることが示唆される。ステロイドや BPA が何故 *Crmp4*-K0 マウスの出生率を低下させたのか、今後検討する必要がある。

【実験項目 3】

まずオスの野生型マウスと *Crmp4*-K0 マウスに由来する嗅球の PD1 での遺伝子発現を比較した。以前の論文 (Satterstrom et al., 2020) で ASD リスク遺伝子候補として報告されている 102 の遺伝子について、トランスクリプトーム結果のヒートマップを作成した。

さらに、マウス PD1 嗅球トランスクリプトームで有意に変動した ASD リスク遺伝子および *Reln* 遺伝子に対してリアルタイム PCR を行い、雌雄の野生型および *Crmp4*-K0 マウスで発現量を比較した。この際、レファレンス遺伝子にはいずれも *-actin* を用いた。その結果、雄 *Crmp4*-K0 マウスでは *Tbr1* および *Reln* 遺伝子の発現量に野生型雄と比較して有意な増加が認められた。‘The Pathophysiological Link Between Reelin and Autism: Overview and New Insights, (Scala et al., 2022) で纏められているように、リーリンは自閉症との関連が最近多数報告されている遺伝子の 1 つである。そこで現在、*Crmp4* 欠損が雄でリーリンの発現量を増加させるメカニズムやリーリン発現増加が自閉症症状やニューロンの発達に及ぼす影響について引き続き調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 金子（大谷）律子	4. 巻 59
2. 論文標題 自閉症スペクトラム症（ASD）モデル動物（CRMP4欠損マウス）研究から明らかになったこと	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 行動科学	6. 最初と最後の頁 57-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Shiono S, Tsutiya A, Ohtani-Kaneko R.	4. 巻 12
2. 論文標題 Early detection of male-predominant phenotypes in the pattern of ultrasonic vocalizations emitted by autism spectrum disorder model (Crmp4-knockout) mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sci.	6. 最初と最後の頁 666 (9 pages)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci12050666.	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 Oda A, Inoue S, Kaneko R, Narita Y, Shiono S, Kaneko T, Tseng YC, Ohtani-Kaneko R.	4. 巻 12
2. 論文標題 Involvement of IGF-1R-PI3K-AKT-mTOR pathway in increased number of GnRH3 neurons during androgen-induced sex reversal of the brain in female tilapia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2350 (14 pages)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06384-4.	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩野鈴佳、比嘉彩香、佐藤健二郎、大谷 金子律子
2. 発表標題 自閉症モデルマウス（Crmp4欠損マウス）と野生型マウス嗅球のトランスクリプトーム解析による遺伝子発現比較
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩野鈴佳、比嘉彩香、佐藤健二郎、大谷 金子律子
2. 発表標題 ASDモデルマウス (Crmp4-KO) の仔の嗅球におけるASD関連遺伝子の発現
3. 学会等名 第74回日本動物学会関東支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 比嘉彩香、塩野鈴佳、佐藤健二郎、大谷-金子律子
2. 発表標題 自閉症患者で見つかったCRMP4の点変異が引き起こす樹状突起形成異常メカニズムの解明
3. 学会等名 第74回日本動物学会関東支部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金子(大谷)律子
2. 発表標題 自閉症スペクトラム障害と感覚異常：動物実験による神経科学・行動科学の知見から、乳幼児、児童を対象とした行動科学・認知科学の知見までを振り返るー
3. 学会等名 日本心理学会 シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 比嘉彩香、吉津葵、塩野鈴佳、大谷-金子律子
2. 発表標題 Collapsin Response Mediator Protein4 (CRMP4) がPC12細胞の樹状突起形成に及ぼす影響
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 塩野鈴佳、古屋夏海、土屋貴大、大谷-金子律子
2. 発表標題 野生型と自閉症モデル仔マウス (Crmp4 欠損仔マウス) 間で見られた超音波発声パターンの違い
3. 学会等名 日本動物学会第91回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤健二郎、塩野鈴佳、土屋貴大、大谷-金子律子
2. 発表標題 自閉症モデルマウス (Crmp4欠損マウス) のトランスクリプトーム解析と 既知のASDリスク遺伝子との対応とリアルタイムPCRでの雌雄差検討
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堺澤 聡子, 加山 遥都, 比嘉 彩香, 佐藤 健二郎, 金子-大谷 律子
2. 発表標題 自閉症患者で見つかった CRMP4の点変異が 細胞骨格タンパク質との結合に及ぼす影響
3. 学会等名 第75回日本動物学会関東支部会
4. 発表年 2023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
---------	---------