

神経系と関連する遺伝子を探る為に、
発現変動が認められた69遺伝子について文献検索 (PubMed使用)

自閉症との関連が示唆される *Cntnap2* (別名 *Nrxn4*) 遺伝子に着目した

7) 自閉症患者での変異が報告され (Alarcon Mら、*Am J Hum Genet* 82: 150-159, 2008)、また遺伝子欠失マウスが自閉症と似た行動異常を示す (Penagarikano Oら、*Cell* 147: 235-246, 2011)、*Cntnap2* (contactin associated protein-like 2) の発現減少 (高・中・低用量)

39

Absence of CNTNAP2 Leads to Epilepsy, Neuronal Migration Abnormalities, and Core Autism-Related Deficits

Olga Peñagarikano,^{1,2,3} Brett S. Abrahams,^{2,3,6} Edward I. Herman,^{2,7} Kellen D. Winden,^{1,2} Amos Gdalyahu,⁴ Hongmei Dong,² Lisa I. Sonnenblick,² Robin Gruver,⁴ Joel Almajano,² Anatol Bragin,² Peyman Golshani,² Joshua T. Trachtenberg,⁴ Eilior Peles,⁵ and Daniel H. Geschwind^{1,2,3,*}

Cell 147, 235-246, September 30, 2011 ©2011 Elsevier Inc.

SUMMARY

Although many genes predisposing to autism spectrum disorders (ASD) have been identified, the biological mechanism(s) remain unclear. Mouse models based on human disease-causing mutations provide the potential for understanding gene function and novel treatment development. Here, we characterize a mouse knockout of the *Cntnap2* gene, which is strongly associated with ASD and allied neurodevelopmental disorders. *Cntnap2*^{-/-} mice show deficits in the three core ASD behavioral domains, as well as hyperactivity and epileptic seizures, as have been reported in humans with *CNTNAP2* mutations. Neuropathological and physiological analyses of these mice before the onset of seizures reveal neuronal migration abnormalities, reduced number of interneurons, and abnormal neuronal network activity. In addition, treatment with the FDA-approved drug risperidone ameliorates the targeted repetitive behaviors in the mutant mice. These data demonstrate a functional role for *CNTNAP2* in brain development and provide a new tool for mechanistic and therapeutic research in ASD.

神経-グリア相互作用に関係するニューレキシン (Neurexin) スーパーファミリーに属する神経系での膜貫通蛋白質。

有髄神経でのランビエの絞輪の周辺部 (juxtaparanode) において、K⁺チャンネルを密集・局在化させる機能を有する。

しかし、髄鞘化 (ミエリン化) する以前の胎生期にも発現しており、また autism spectrum disorder (ASD) (自閉症障害) との関連を示唆する報告が増えている事を考慮すると、神経初期発生において別の機能を有しているものと考えられる。

Cntnap2-/- autism model

Pamela Feliciano,
Nature Genetics 43: 1053, 2011 (research highlights).

CNTNAP2遺伝子は、autism spectrum disorder (ASD) (自閉症障害) 及びcortical dysplasia—focal epilepsy (CFDE) syndrome (皮質異形成—部分てんかん症候群) に関連している (seizures, language regression, intellectual disability, hyperactivity and autism)

Daniel GeschwindらはこのKOマウスを作製し(Cell 147, 235–246, 2011)解析したところ、

6ヶ月例以降で自発的な発作、脳梁 (corpus callosum) での異所性の神経、及び神経細胞移動の異常というCFDEの患者と同様な症状を認め、また行動学的にも児動物が苦悩を母動物に伝える手段と考えられる、隔離による超音波発生が、より少なくなり、juvenile play testでも他の児マウスと過ごす時間が短くなることを確認している。

FDAに承認されている非定型抗精神病薬であり、自閉症に適用されているリスペリドン(リスパダール)は、このKOマウスにおける社会行動以外の表現型に効果を示した。

このことから著者らは、このKOマウスがASDの治療に際し、新しいツールとして重要だろうとしている。

ASDの中核 (core) 症状 :

- 1) 言語の発達障害(コミュニケーション障害) [deficits in language development]
- 2) 対人関係の障害(社会性の障害) [deficits in social interaction]
- 3) こだわり行動/固執性(イマジネーション障害) [repetitive behavior/ restricted interests]

Cntnap2遺伝子 :

この遺伝子のアミノ酸のコドンを終止コドンにする変異であるナンセンス突然変異 (Nonsense mutation) が存在し、劣性形質としてcortical dysplasia—focal epilepsy (CFDE) syndrome (皮質異形成—部分てんかん症候群) を引き起す事が報告されている (Straussら、2006) 。

発現 : ISH : 成熟期では多くの部位、大脳皮質、海馬、小脳、線条体、嗅覚路。胎生期でも同様 (ウェスタンでは胎生14日で蛋白を検出) 。

KOマウス (体重、増殖曲線は野生型と同様) :

CFDEの主な症状は、海馬でのアストログリア増殖症と関連する考えられている、てんかん発作。→KOマウスでも6ヶ月齢以上で自発性の発作が認められた。

海馬での肉眼所見は認められないが、parvalbumin陽性介在神経 (=GABA駆動性介在ニューロンに) の減少が認められ、GFAPのシグナル強度が増加している事から星状膠細胞症と考えられた。

生後14日齢から成熟期にわたり、脳梁に異所性に神経細胞が認められた (NeuN染色) 。

42

(続き)

大脳皮質での神経細胞移動の異常がK0マウスで認められた(皮質上層部の分子マーカーCUX1、深層部の分子マーカーFOXP2で抗体染色)。CUX1陽性細胞が深層部で認められた。FOXP2陽性細胞は野生型と同様。BrdU取り込み実験でも確認できた。

PVALB陽性神経がK0マウスの海馬や線条体で減少⇒GABA介在神経の発達にCntnap2遺伝子が寄与。

ASDのクライテリアは分子生物学的・組織学的ではなく、行動学的指標からであったので、行動試験を検討。[Silvermanら、Nat Rev Neurosci 11: 490-502, 2010]

オープンフィールドでK0マウスは自発運動量が顕著に増加。協調運動をみるローターロッドではK0マウスの方が良好(他のモデルマウスでも同様な結果)。明暗往来では変化無し。ホットプレートテストではK0マウスの方が感受性が高かった。聴覚驚愕反射とプレパルス抑制を検討したところ変化は認められず、嗅覚テストでも変化が認められなかった。空間連想記憶(Morris water maze)でも変化は認められなかった。

→正常な不安関連行動、空間記憶、感覚・運動統合を示す。

43

(続き)

Cntnap2遺伝子:

■固執性(Perseveration)を検討する為に、T Maze Spontaneous Alternationテストを検討した結果、K0マウスにて、変化なしというものが顕著に増加。グルーミングする時間がK0マウスで約3倍増加。

■児動物が苦悩を母動物に伝える手段と考えられる、隔離による超音波発生(発声)が、K0マウスにてより少なくない。また見慣れないマウスを生後21日目にペアとし社会行動を検討(juvenile play test)したところ、K0マウスでは、より短い時間しかコンタクトをとらなかった。Three chambers社会性テストでもK0マウスで低下。巣造り行動もK0マウスで低下していた。

ASDの中核(core)症状:

- 1) 言語の発達障害(コミュニケーション障害) [deficits in language development]
- 2) 対人関係の障害(社会性の障害) [deficits in social interaction]
- 3) こだわり行動/固執性(イマジネーション障害) [repetitive behavior/ restricted interests]

→ Cntnap2遺伝子欠失マウスにおいて皆認められると報告

44

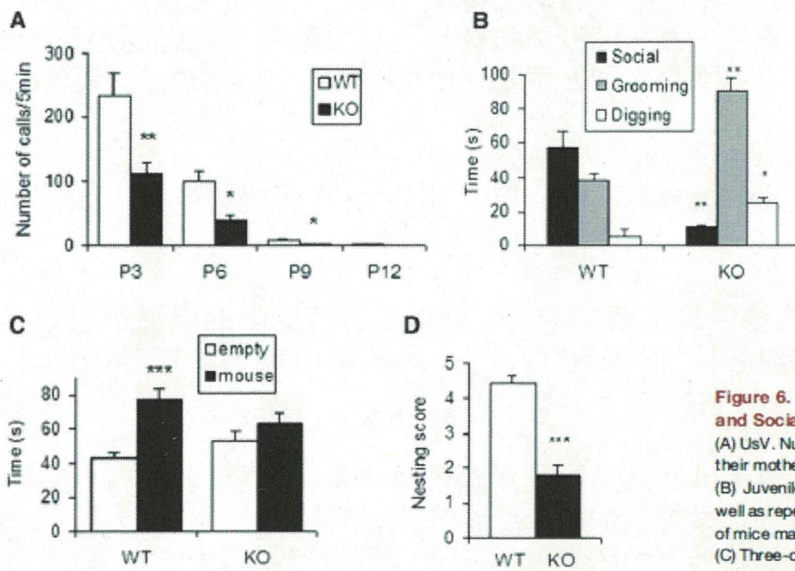


Figure 6. *Cntnap2*^{-/-} Mice Show Communication and Social Behavior Abnormalities

(A) UsV. Number of calls from pups when separated from their mother at P3, P6, P9, and P12 (5 min). (B) Juvenile play. Time involved in social interaction, as well as repetitive behaviors (grooming and digging) in pairs of mice matched in genotype and sex at age P21 (10 min). (C) Three-chamber social interaction test. Time interacting with either an unfamiliar mouse or an inanimate object (empty cup) in 10 min. (D) Nesting behavior. The nesting score represents the amount of nesting material used after a 16 hr period (1, poor; 5, good).

n = 10 mice/genotype. Data are presented as mean ± SEM. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. See also Figure S5.

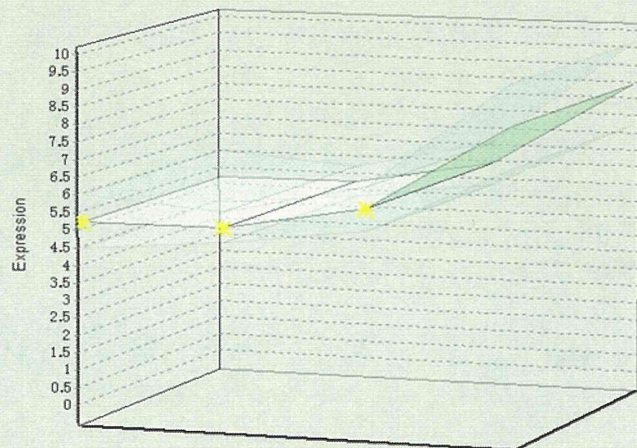
低用量のBPA周産期暴露後、
成熟期マウスの海馬において
=暴露期間中ではなく暴露後
時間を経た海馬において

欠失マウスが自閉症と似た行
動異常を示す*Cntnap2*遺伝子
の発現の用量依存的な減少が
認められた

→低用量のBPAの周産期暴露
により自閉症が誘発される可
能性が示唆された

Cntnap2
1437782_at

1437782_at
Cntnap2
BE651445



contactin associated protein-like 2

海馬において発現変動が認められた Cntnap2遺伝子を含む69遺伝子が、
 同じシグナルネットワークを共有しているか否か
 転写開始点上流に共通した結合配列は存在？（同じネットワーク？）

共通した配列があれば同一のネットワークである可能性が高い

...



*in silico*でのプロモーター解析

市販のGenomatixを利用

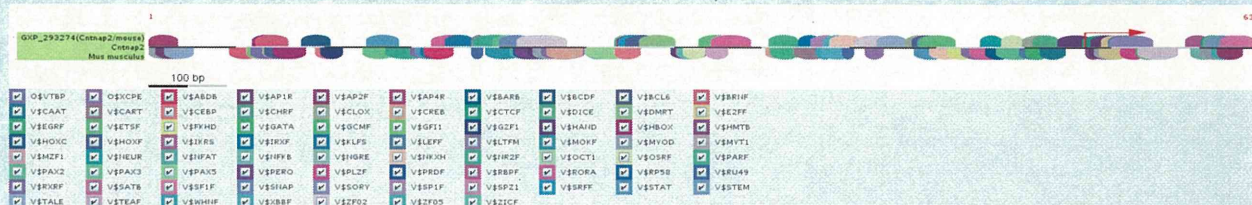
遺伝子名及び発現変動が明確な遺伝子数：49
 [発現増加：10、発現減少：39]

海馬

by Dr Igarashi, K

Genomatix

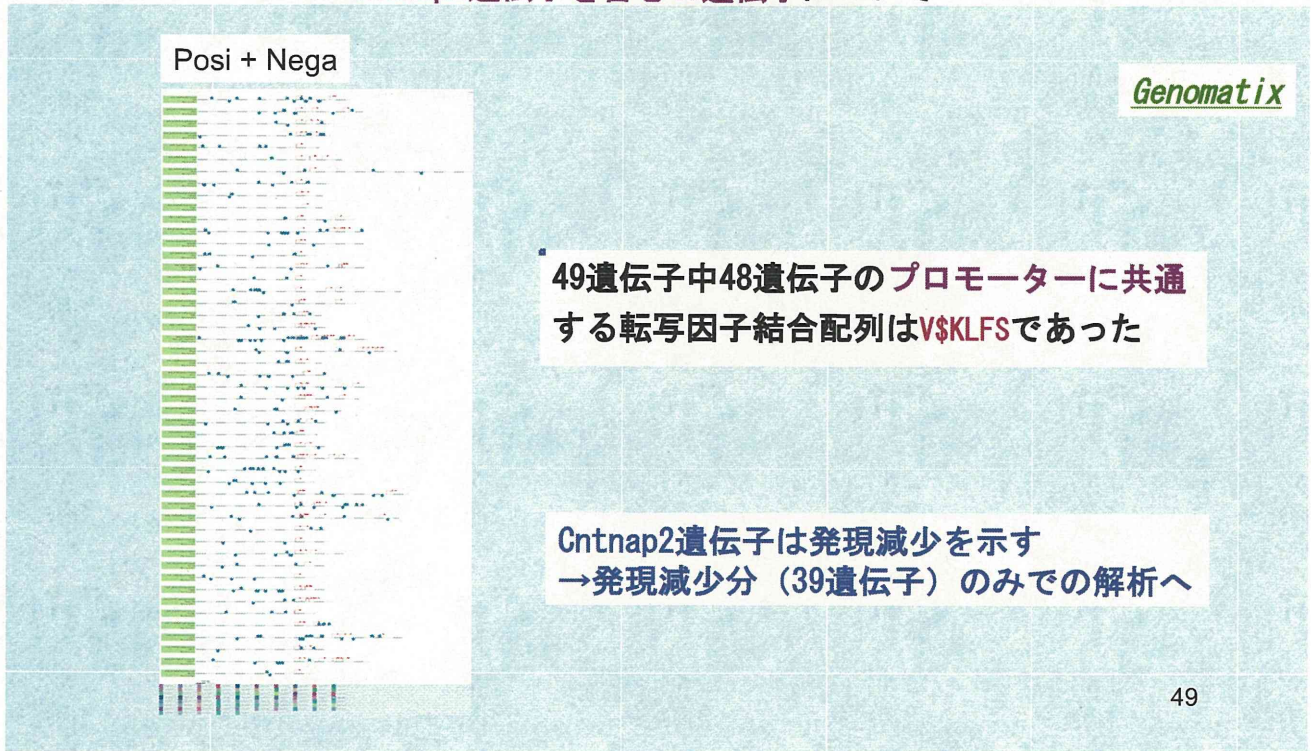
Cntnap2遺伝子の転写開始点上流に、
 ERの結合配列 (ERE) は認められなかった



海馬

by Dr Igarashi, K

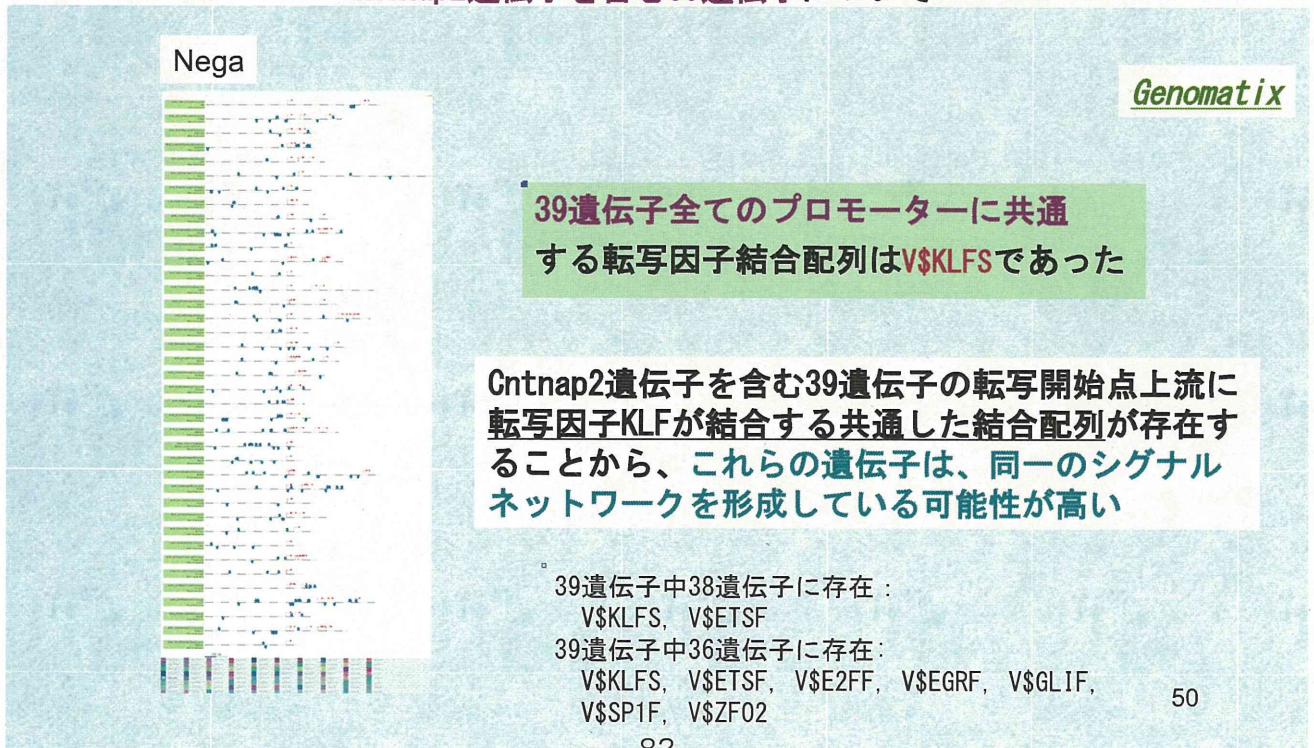
一周産期に「BPA」を投与し、成熟後の海馬において発現変動を示した
Cntnap2遺伝子を含む49遺伝子について



海馬

by Dr Igarashi, K

一周産期に「BPA」を投与し、成熟後の海馬において発現減少を示した
Cntnap2遺伝子を含む39遺伝子について



発現減少を示したCntnap2遺伝子を含む39遺伝子

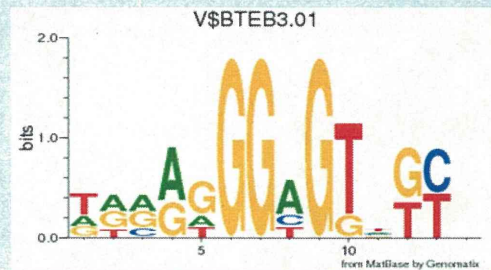
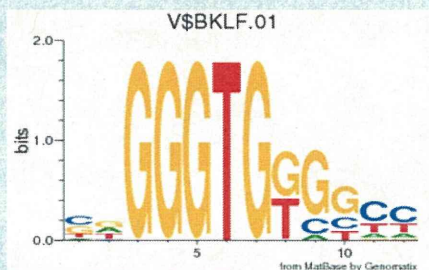
Abr、Aifm3、Ankrd29、Ankrd45、Arc、Atm、Bcl2、Camkk1、Cntnap2、Crim1、Ece2、Foxp4、Gadd45b、Gja1、Gtf3c2、Hdac4、Hes5、Isoc1、Kif5c、Lnp、Msi2、Mtap4、Nedd8、Nr4a1、Olfml2b、Pik3r4、Poldip3、Prkag1、Prrc1、Rab3ip、Rab40c、Raph1、Rgnef、Rnf26、Rnf41、Rspry1、Sdhd、Sin3b、Sirpa、Slc7a4、Ssh1、Tiparp、Tmem168、Txnrd1、Txnrd2、Uck2、Wdr46、Zfp179、Zfp334

51

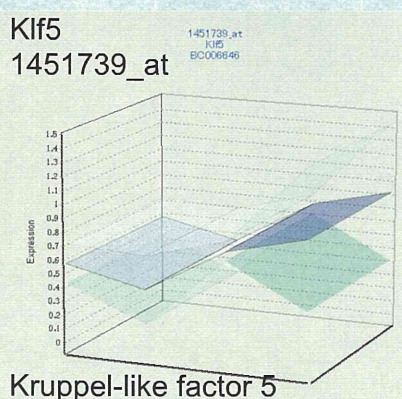
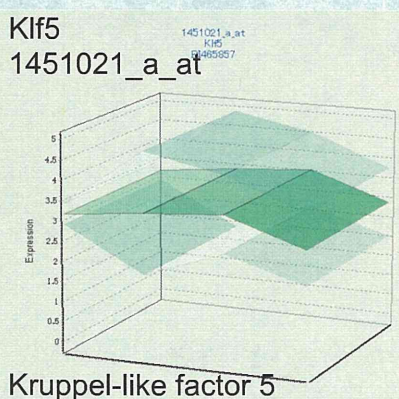
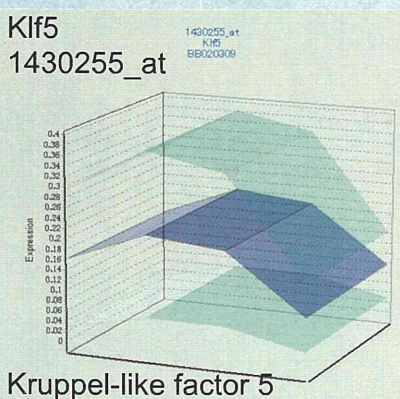
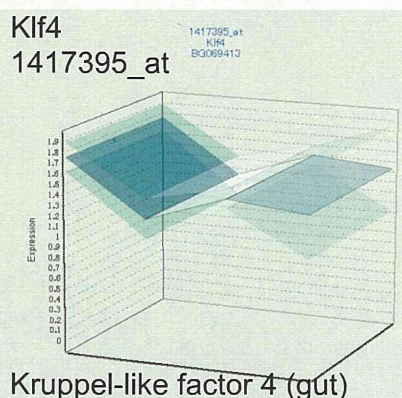
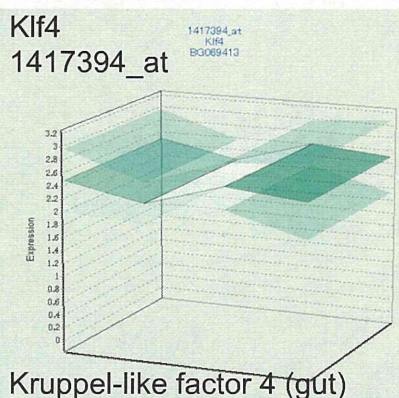
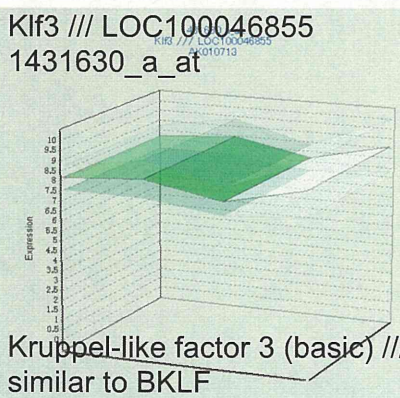
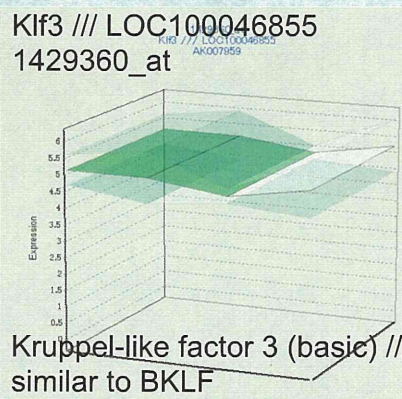
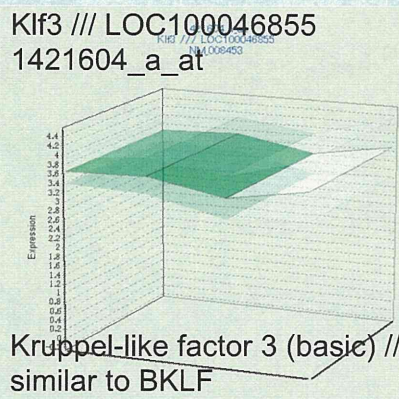
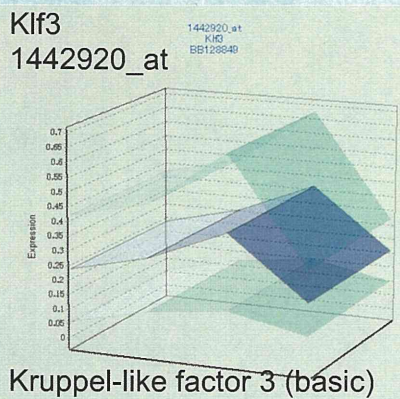
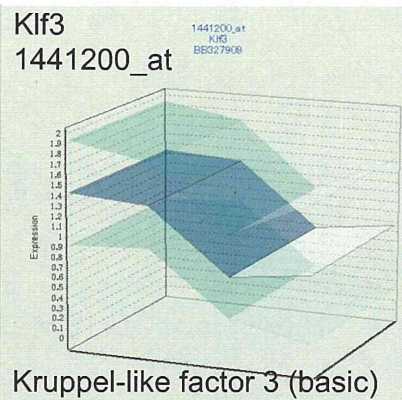
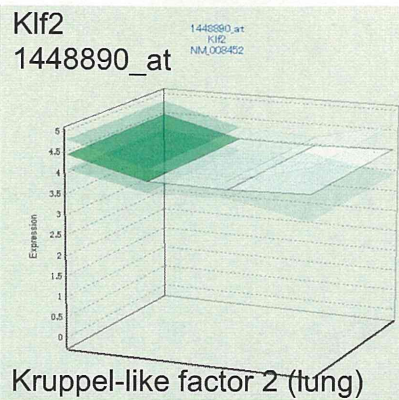
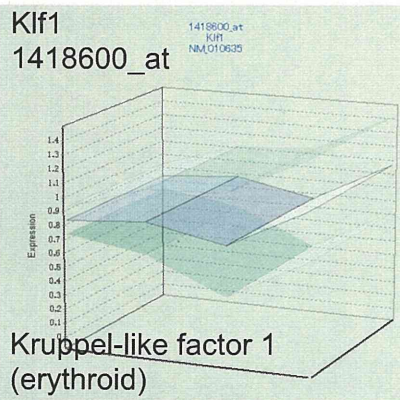
V\$KLFS

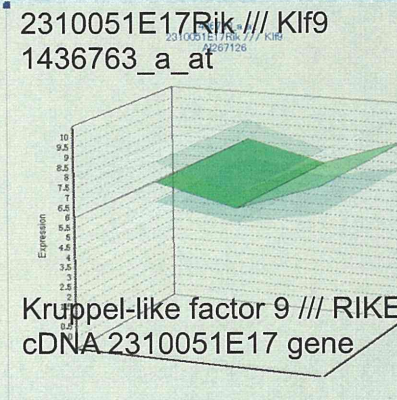
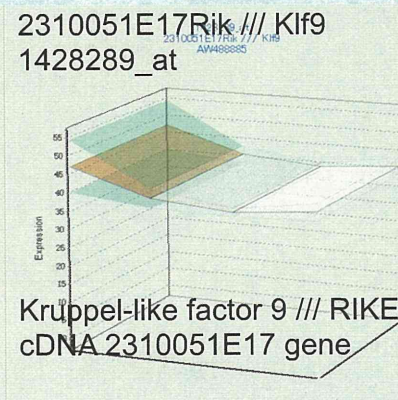
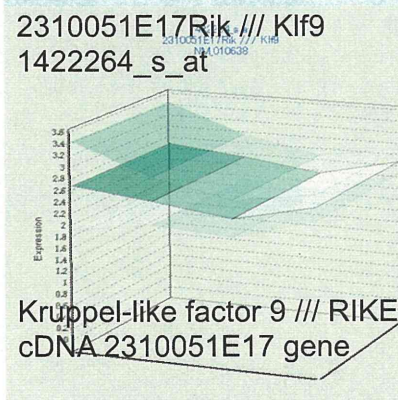
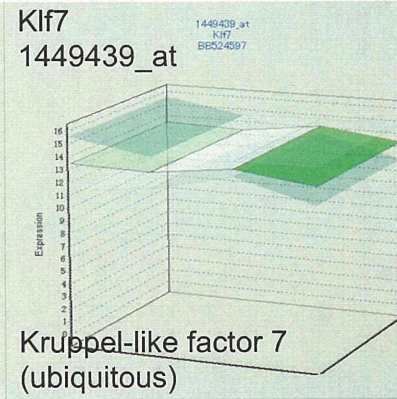
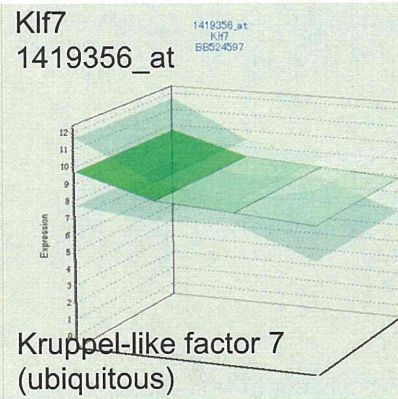
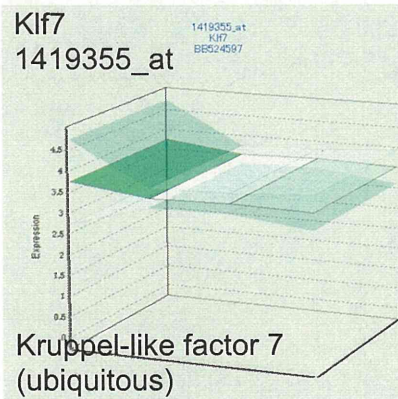
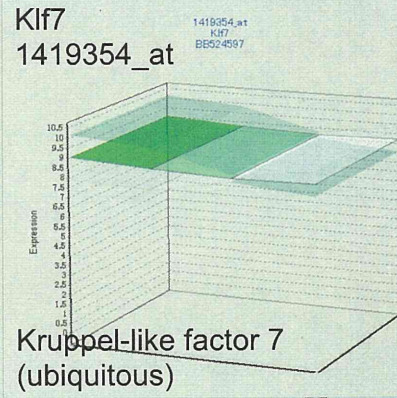
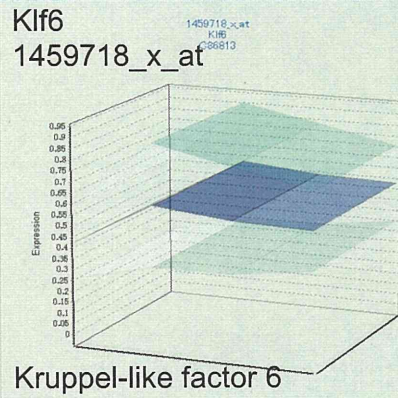
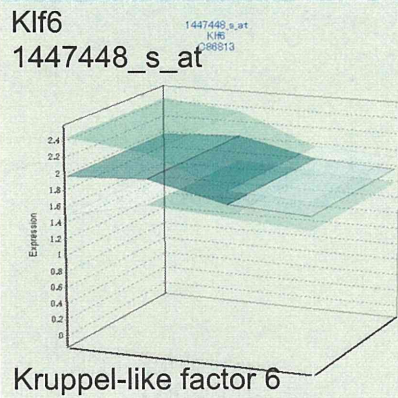
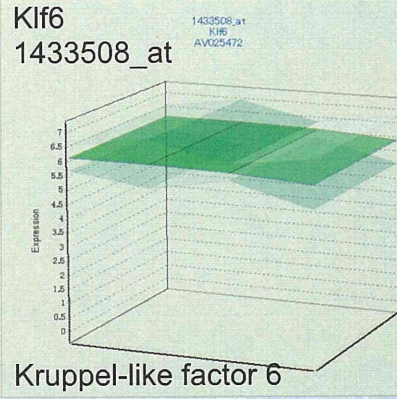
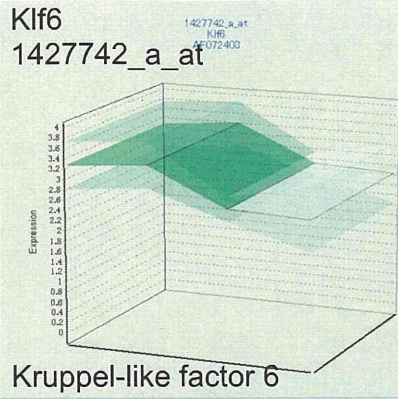
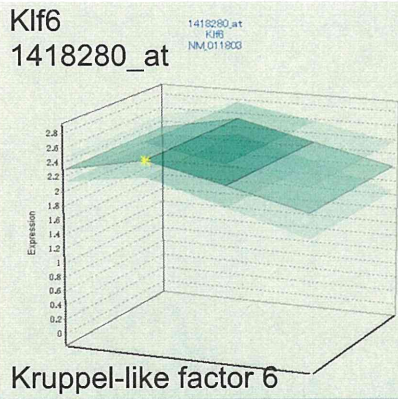
Krüppel like transcription factors

Kif1, Kif2, Kif3, Kif4, Kif6, Kif7, Kif8,
Kif9, Kif12, Kif13, Kif15

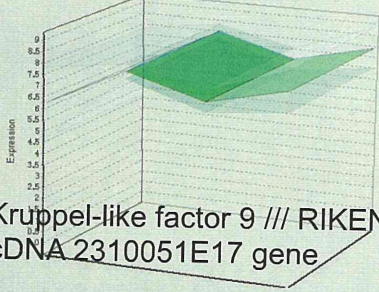


- これらの遺伝子の発現変動は？
- これらの遺伝子と情動認知行動異常との関連をPubMed検索



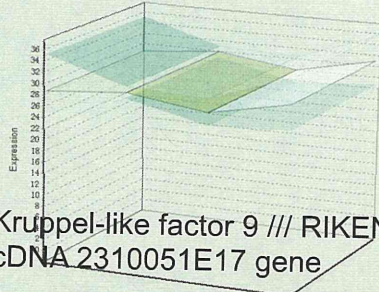


2310051E17Rik /// Klf9
1436952_at



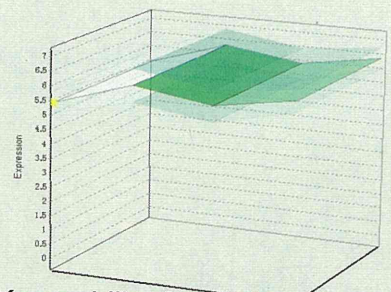
Kruppel-like factor 9 /// RIKEN
cDNA 2310051E17 gene

2310051E17Rik /// Klf9
1456341_a_at



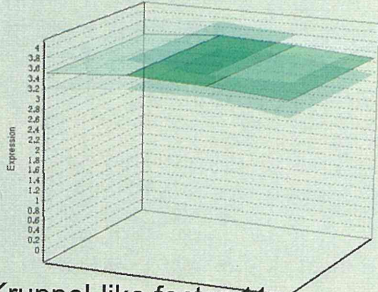
Kruppel-like factor 9 /// RIKEN
cDNA 2310051E17 gene

Klf10
1416029_at



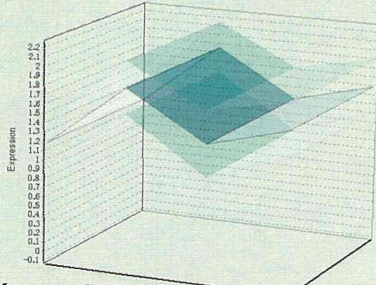
Kruppel-like factor 10

Klf11
1437241_at



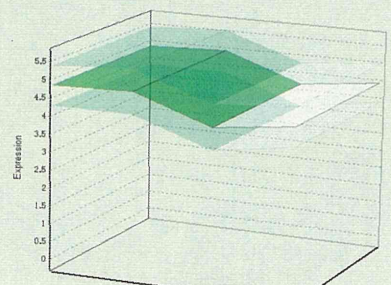
Kruppel-like factor 11

Klf12
1422227_at



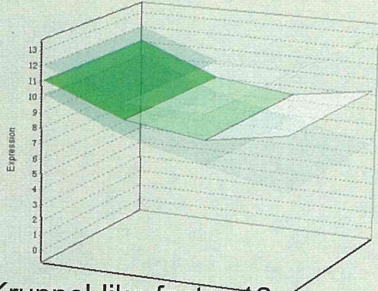
Kruppel-like factor 12

Klf12
1439846_at



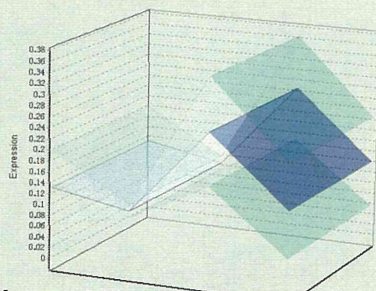
Kruppel-like factor 12

Klf12
1439847_s_at



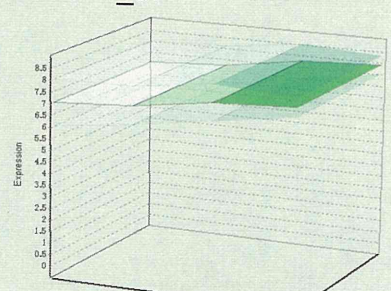
Kruppel-like factor 12

Klf12
1441040_at



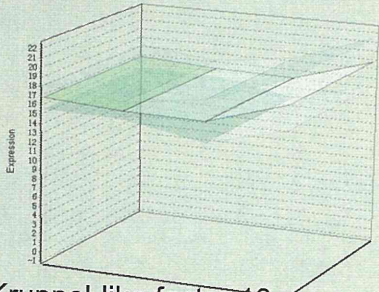
Kruppel-like factor 12

Klf12
1455521_at



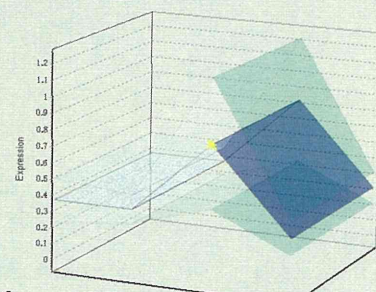
Kruppel-like factor 12

Klf13
1432543_a_at



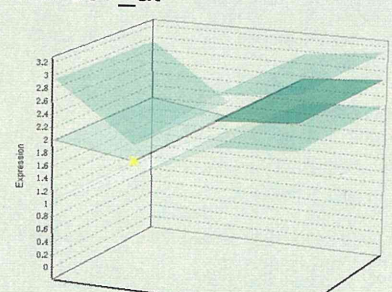
Kruppel-like factor 13

Klf13
1456030_at

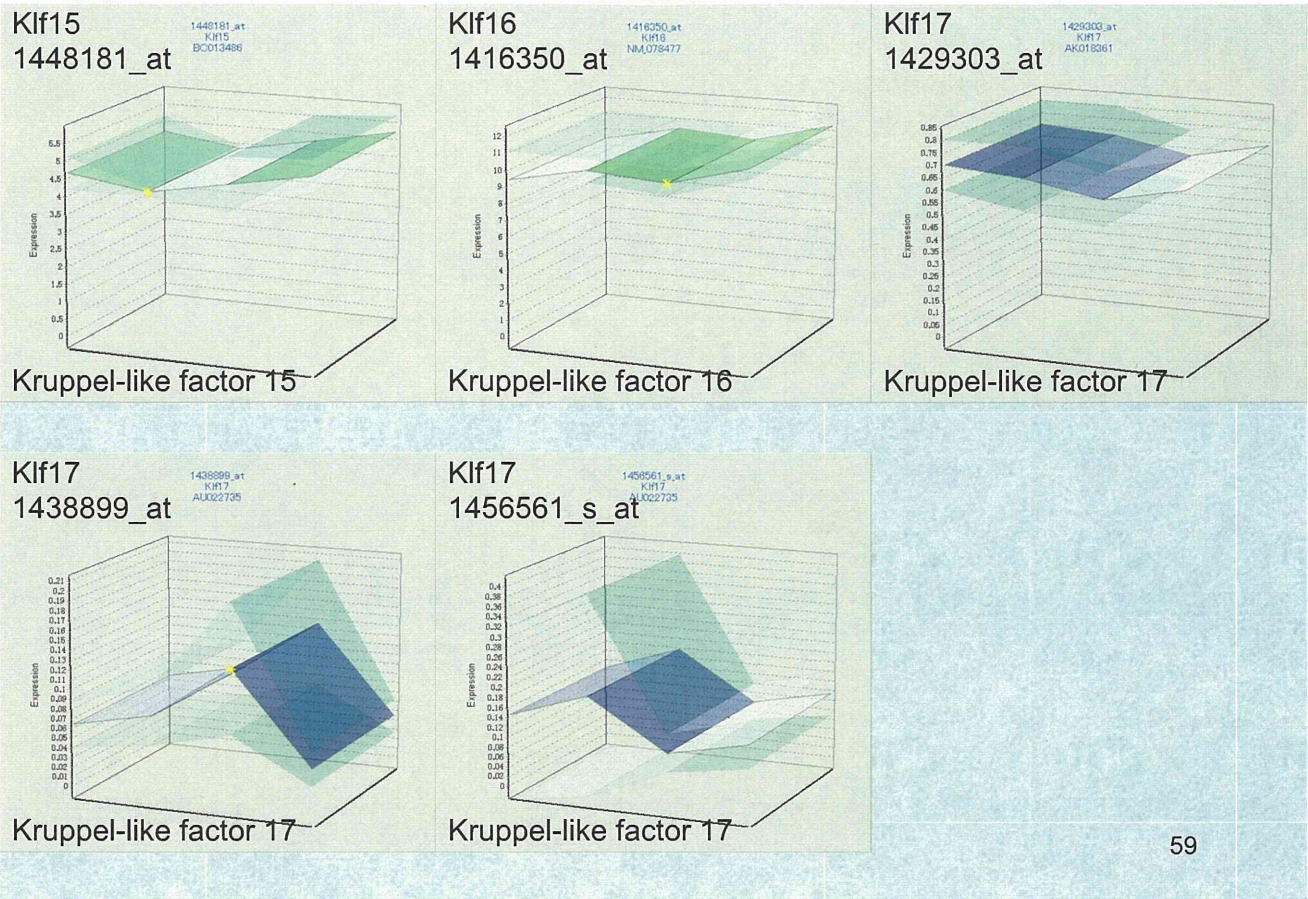


Kruppel-like factor 13

Klf14
1457397_at



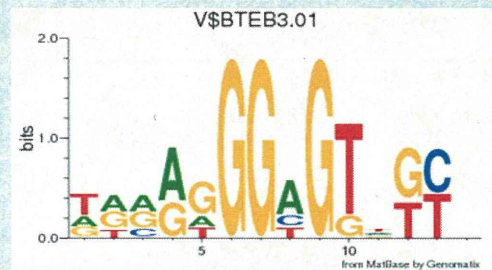
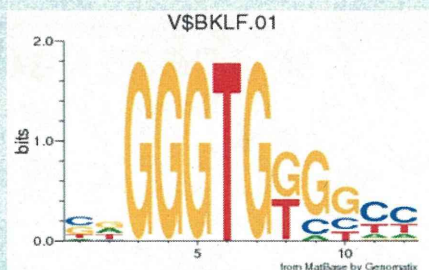
Kruppel-like factor 14



V\$KLFS

Kruppel like transcription factors

Klf1, Klf2, Klf3, Klf4, Klf6, Klf7, Klf8,
 Klf9, Klf12, Klf13, Klf15



→ これらの遺伝子と情動認知行動異常との関連をPubMed検索

Krüppel-Like Factor 9 Is Necessary for Late-Phase Neuronal Maturation in the Developing Dentate Gyrus and during Adult Hippocampal Neurogenesis

Scobie KN et al, J Neurosci 29: 9875-9887, 2009

Kimberly N. Scobie,^{1,2} Benjamin J. Hall,⁶ Scott A. Wilke,⁶ Kristen C. Klemenhagen,^{1,2} Yoshiaki Fujii-Kuriyama,⁷ Anirvan Ghosh,⁶ René Hen,^{1,2,3,4} and Amar Sahay^{1,3,4}
 Departments of ¹Neuroscience and Psychiatry and ²Pharmacology, Columbia University, ³Division of Integrative Neuroscience, ⁴New York State Psychiatric Institute, New York, New York 10032, ⁵Department of Cell and Molecular Biology and the Neuroscience Program, Tulane University, New Orleans, Louisiana 70118, ⁶Section of Neurobiology, Division of Biological Sciences, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093, and ⁷Tsukuba Advanced Alliance Research Center, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan

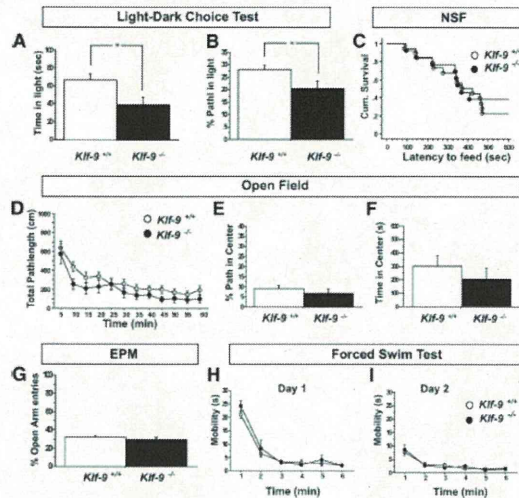


Figure 9. *Klf9*-null mice exhibit normal behavior in multiple tests for anxiety-like and depression-like behavior, except in the light/dark test. A–H, Behavior of adult *Klf9*^{+/+} and *Klf9*^{-/-} mice in tests for anxiety-like (A–C) and depression-like behavior

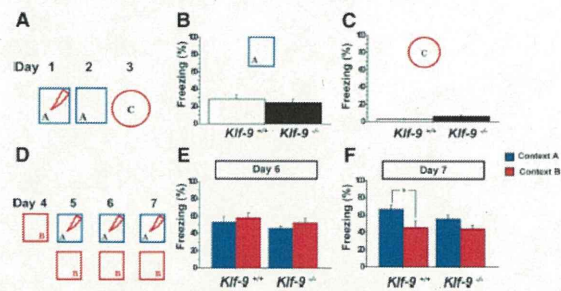


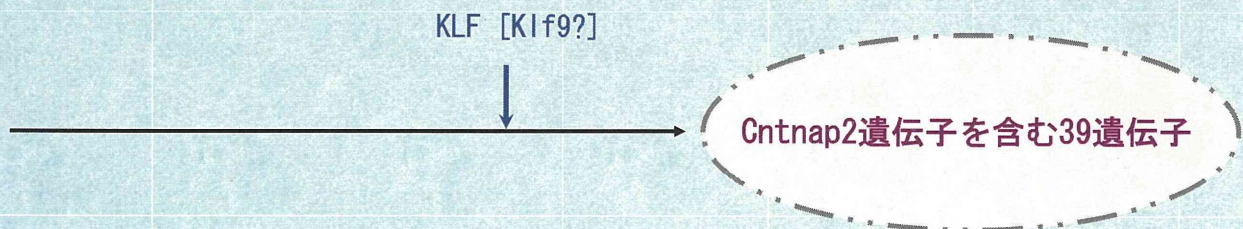
Figure 10. *Klf9*-null mice are impaired in contextual fear discrimination learning. A–C, *Klf9*^{-/-} and *Klf9*^{+/+} mice exhibit comparable levels of contextual fear conditioning. A, Mice were trained in context A and tested 24 h later in context A. On day 3,

- ・ Klf9は、幼若期の（海馬体の）歯状回の発達、及び成熟期の海馬での神経新生に関与する
- ・ Klf9欠失マウスでは、不安関連行動の増加及び空間記憶の障害が認められる

*in silico*でのプロモーター解析のまとめ

周産期に「BPA」を投与し、成熟後の海馬において発現減少を示した *Cntnap2*遺伝子を含む39遺伝子についての局所ネットワークの描出 [海馬]

同一のシグナルネットワークである可能性がある



まとめ

本分担研究の目的

網羅的遺伝子発現変動解析によって「情動認知行動異常に至る分子メカニズム」を明らかにする事
→ Percellome法による網羅的遺伝子発現変動解析

- ・被験物質：ビスフェノールA (BPA) : ER結合性化学物質。合成樹脂からの溶出が報告
- ・周産期暴露 (妊娠期から離乳期までの妊娠マウスへの飲水投与) 後の成熟期マウスの海馬における網羅的遺伝子発現変動解析

→目視により、生物学的な変動を示すと考えられる**69遺伝子**

→特定のシグナルネットワークは見いだされなかった

→文献検索により、欠失マウスが自閉症と似た行動異常を示すCntnap2遺伝子(用量依存的な発現の減少)→低用量のBPAの周産期暴露により自閉症が誘発される可能性

→*In silico*でのプロモーター解析によりこの69遺伝子のうち、Cntnap2遺伝子を含む発現減少が認められた39遺伝子: 39遺伝子全ての転写開始点上流に共通して転写因子KLFの結合配列が存在

⇒これらの遺伝子が同一のシグナルネットワークである事が示唆され、この発現制御にKLFファミリー(KLF9?)が関与する可能性がある。

→今後、特にこのCntnap2分子が関係するシグナルネットワークに着目した検討により、BPA暴露によるERを介した遅発性神経毒性の誘発分子機序に迫れるものと考えられる。

先行研究での網羅的遺伝子発現変動解析

65

目的：化学物質による遅発性の情動認知行動毒性の分子基盤を明らかにする

まとめ 1

1) トリアゾラム(1 mg/kg)経口投与により、幼若期投与群では、成熟期ならびに胎生期投与群と異なり、情動認知行動異常が誘発される

2) トリアゾラム(0, 0.1, 0.3, 1.0 mg/kg)投与後、経時的(2, 4, 8, 24時間後)に採取した、幼若期の海馬サンプルを用いた網羅的遺伝子発現変動解析:

2-A) **発現増加分:**

- ・ 生物学的に発現増加が示唆されたもの: **194 ps**
- ・ 現時点で、アポトーシスや酸化ストレスを含め、有害影響に関する遺伝子・シグナルネットワークは認められなかった。

2-B) **発現減少分:**

- ・ 生物学的に発現増加が示唆されたもの: **97 ps**
- ・ **神経伝達に関連する遺伝子**として、GABA-A受容体であるGabbr3、**BDNF受容体であるNtrk2**、KチャンネルであるKcnn1、Kcna1 及びKcnn2 遺伝子、及び、
■ シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持を司る「マスタースイッチ」として機能する転写因子**Npas4遺伝子**

目的：化学物質による遅発性の情動認知行動毒性の分子基盤を明らかにする まとめ2

3) 「トリアゾラム」、「イボテン酸」共に、幼若期投与の際、

- ・遅発性の学習記憶異常が認められた。
- ・Npas4及びBdnf遺伝子の発現減少が認められた

■両化合物投与に共通して、発現減少が認められたNpas4を含む遺伝子リスト
= 14 ps [13遺伝子]

⇒ このほとんどが「トリアゾラム」、「イボテン酸」共に Npas4の場合と同様な発現パターンを示した

⇒ Npas4と同じ局所シグナルネットワークである可能性が高い [発見]

★共通して発現減少した13遺伝子には、転写開始点上流に共通した結合配列が存在した [13遺伝子全てのプロモーターに共通: V\$EVSF; 12遺伝子のプロモーターに共通: 8種、O\$VTBP、V\$EGRF、V\$KLFS、V\$MAZF、V\$MZF1、V\$NR2F、V\$ZF02、V\$EVSF]

= 「遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク」

である可能性がある

転写因子Npas4は、シナプスの興奮と抑制の恒常的バランス維持に働く「マスタースイッチ」:

Npas4は200個以上の活動依存的遺伝子の発現を制御しており、この働きにより、GABA介在性シナプスの数を制御する

Editor's Summary
30 October 2008

Balance of mind

A fine balance between the numbers of excitatory and inhibitory synapses must be maintained for neuronal circuits to function. The intracellular molecular signalling pathways involved in activity-dependent formation of synapses, particularly inhibitory ones, are largely unknown. A new study has identified the transcription factor **Npas4** as a 'master switch' acting in brain cells to maintain the homeostatic balance between synaptic excitation and inhibition, a balance that is thought to be disrupted in neurologic disorders such as autism, epilepsy and schizophrenia. Npas4 acts by regulating the expression of more than 200 activity-dependent genes, which in turn control the number of GABA-mediated synapses that form excitatory neurons

Article:

Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4
Yingxi Lin, Brenda L. Bloodgood, Jessica L. Hauser, Ariya D. Lapan, Alex C. Koon, Tae-Kyung Kim, Linda S. Hu, Athar N. Malik & Michael E. Greenberg
doi:10.1038/nature07319

解析のストラテジー

「トリアゾラム」、「イボテン酸」共に、幼若期投与の際、

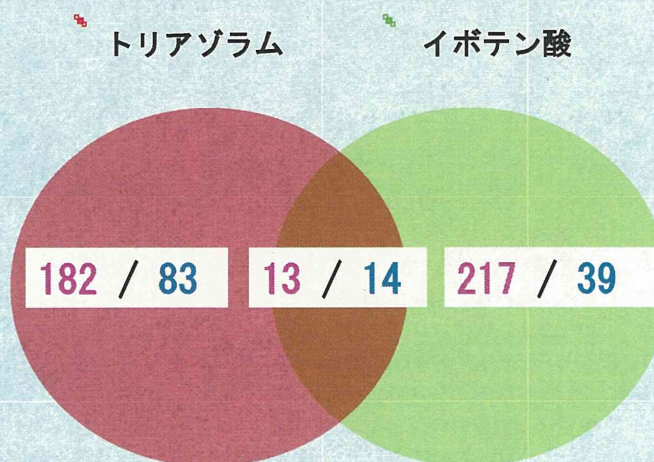
- ・ 遅発性の学習記憶異常が認められた。
- ・ Npas4及びBdnf遺伝子の発現減少が認められた

両化学物質を幼若期投与した際に、共通して発現減少が認められたNpas4、Bdnfを含む遺伝子リスト：

「遅発性の情動認知行動異常を誘発するシグナルネットワーク」である可能性がある

69

幼若期のマウスに、トリアゾラム及びイボテン酸を
単回経口投与した際の、
海馬における変動した遺伝子数の比較[増加 / 減少]



海馬において発現が増加/減少した遺伝子(プローブセット: PS)数

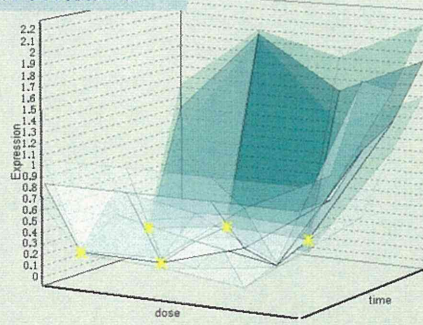
70

Npas4

neuronal PAS
domain protein
4

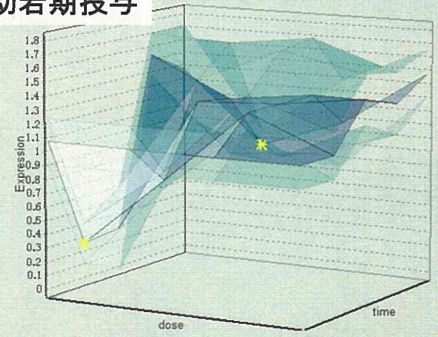
トリアゾラム 幼若期投与

459372_at



イボテン酸 幼若期投与

1459372_at



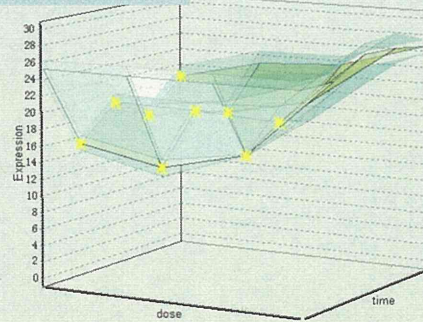
71

Dusp6

dual specificity
phosphatase 6

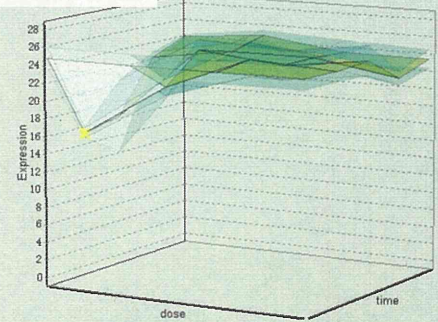
トリアゾラム 幼若期投与

415834_at



イボテン酸 幼若期投与

1415834_at

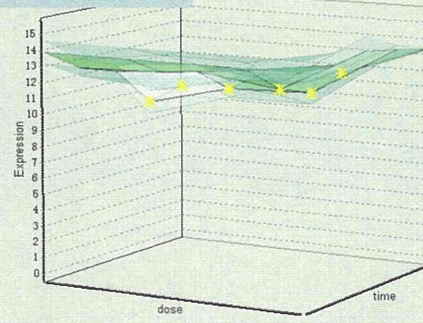


Rgs2

regulator of G-
protein signaling
2

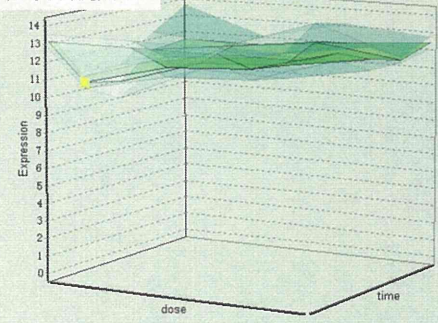
トリアゾラム 幼若期投与

419247_at



イボテン酸 幼若期投与

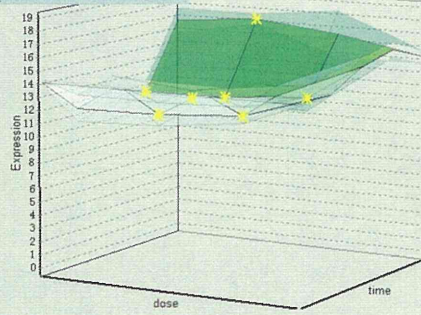
1419247_at



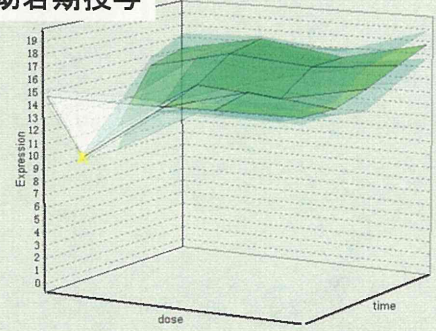
Spry2

sprouty homolog
2 (Drosophila)

トリアゾラム
幼若期投与 436584_at



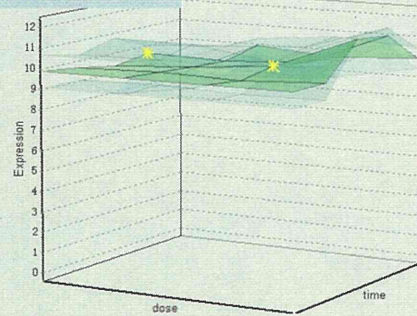
イボテン酸
幼若期投与 1436584_at



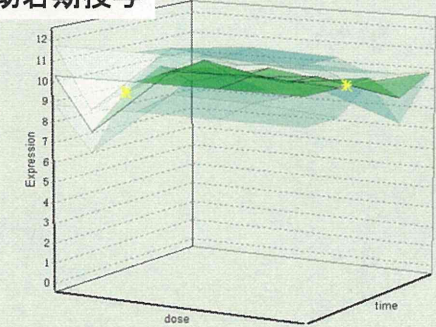
Mycn

v-myc
myelocytomatosi
s viral related
oncogene,
neuroblastoma
derived (avian)

トリアゾラム
幼若期投与 417155_at



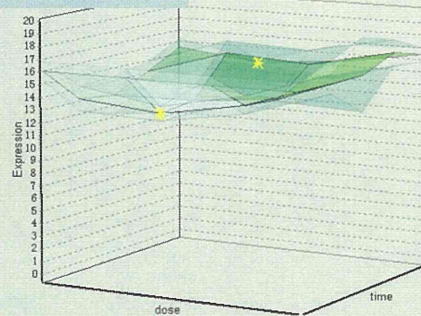
イボテン酸
幼若期投与 1417155_at



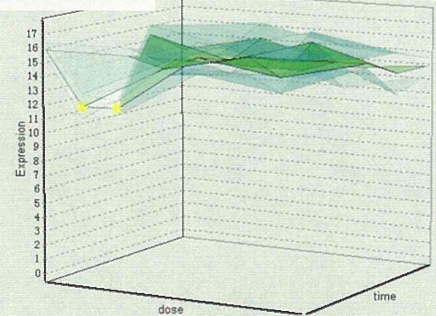
Flrt2

fibronectin
leucine rich
transmembrane
protein 2

トリアゾラム
幼若期投与 438702_at



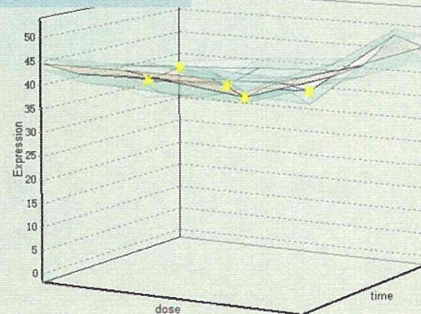
イボテン酸
幼若期投与 1438702_at



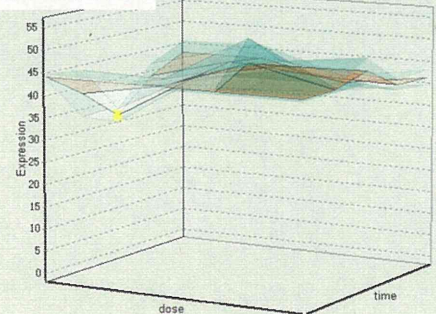
Rgs4

regulator of G-
protein signaling
4

トリアゾラム
幼若期投与 416288_at



イボテン酸
幼若期投与 1416288_at

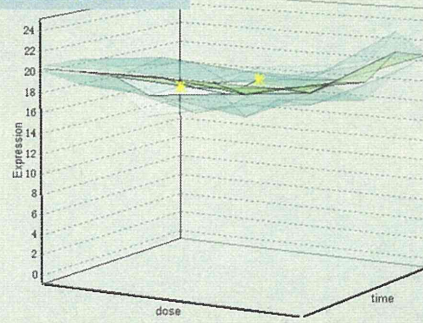


Rgs4

regulator of G-protein signaling
4

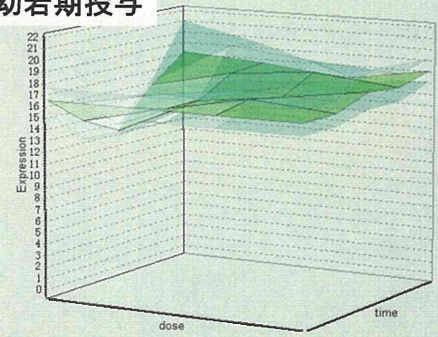
トリアゾラム 幼若期投与

448285_at



イボテン酸 幼若期投与

1448285_at



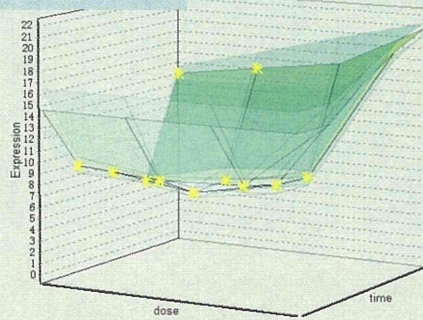
Nr4a1

nuclear receptor
subfamily 4,
group A, member
1

= nerve Growth
factor IB
(NGFIB)

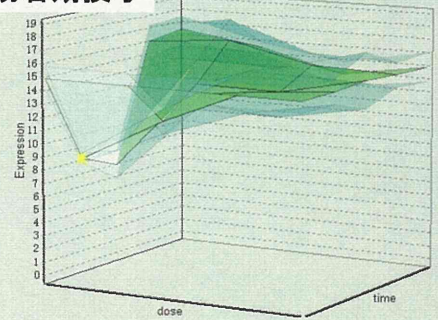
トリアゾラム 幼若期投与

418505_at



イボテン酸 幼若期投与

1418505_at

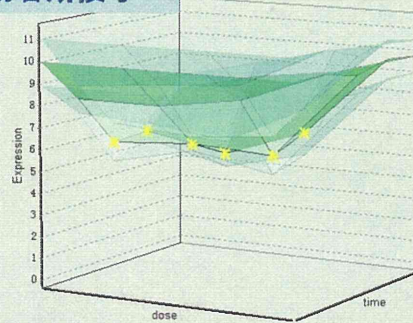


Egr4

early growth
response 4
Bdnfの標的

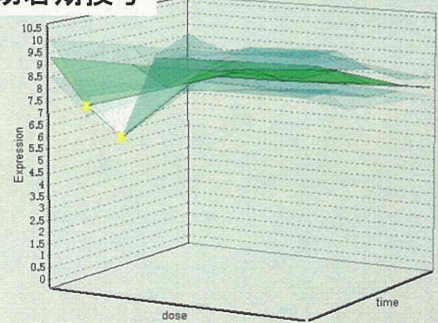
トリアゾラム 幼若期投与

449977_at



イボテン酸 幼若期投与

1449977_at

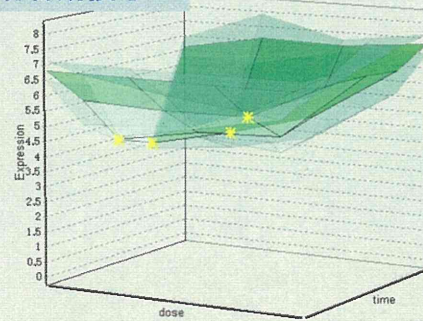


Junb

Jun-B oncogene

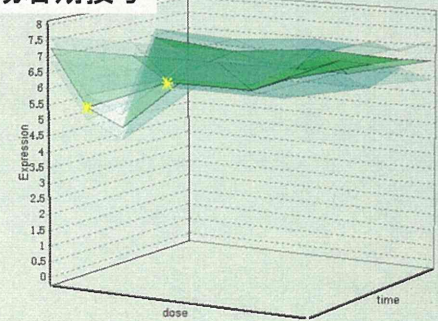
トリアゾラム 幼若期投与

415899_at



イボテン酸 幼若期投与

1415899_at

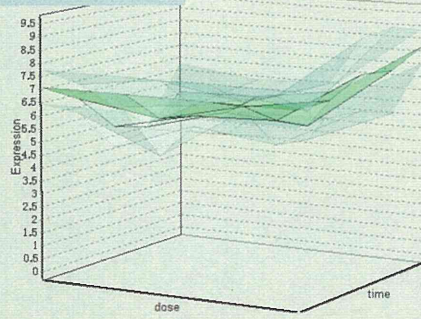


Ptgs2

prostaglandin-endoperoxide synthase 2

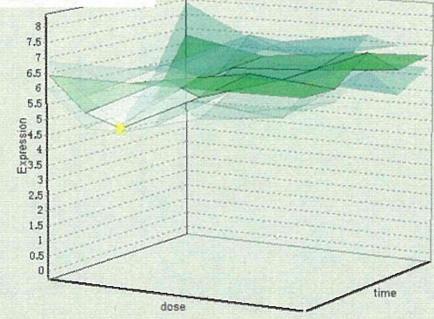
トリアゾラム 幼若期投与

417262_at



イボテン酸 幼若期投与

1417262_at

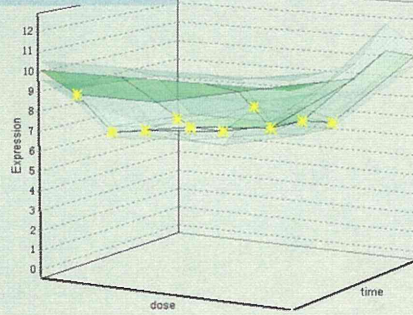


Bdnf

brain derived neurotrophic factor
Npas4の標的

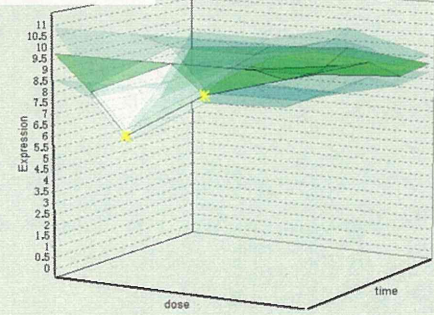
トリアゾラム 幼若期投与

122168_a.at



イボテン酸 幼若期投与

1422168_a.at

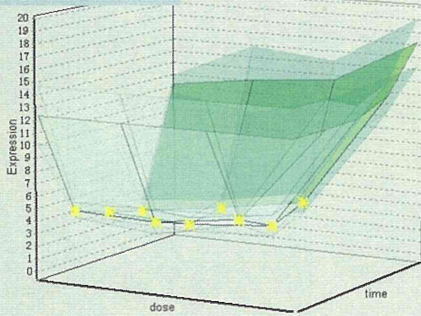


Arc

activity regulated cytoskeletal-associated protein

トリアゾラム 幼若期投与

1418687_at



イボテン酸 幼若期投与

1418687_at

