

## . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業（精神障害分野）  
総括研究報告書

自閉性障害における遺伝子変異がもたらすシナプス機能障害と  
小胞体ストレス誘導 についての研究

研究代表者 神保 恵理子  
自治医科大学・医学部・講師

研究要旨

自閉性障害は、脳発達障害である。近年、病態と遺伝性についての関与について少しずつ明らかにされようとしているものの、未だ分子病態が十分に把握されておらず、治療法の確立がされていない。これまで発症に強く関連する遺伝子として、Neurologin3、Neurologin4、Neurexin、Shank3、CADM1などのシナプス関連タンパクの遺伝子異常が報告されており、シナプス機能不全が自閉性障害の病態基盤である可能性が示唆される。本研究では、遺伝子変異を起因とする機能不全によるLoss-of-function、また変異によるGain-of-functionが病態に関わっている可能性について、機能シナプスに關与する*Cadm1*に着目し、検討を行ってきた。Loss-of-functionとしては、*Cadm1*ノックアウトマウスを用いた実験により、不安行動の増大、社会性の欠如、コミュニケーション障害が見られた。Gain-of-functionとしては、*CADM1*変異遺伝子導入細胞の解析の結果により、小胞体ストレスの誘導が示唆された。本年度は、*CADM1*変異が個体に及ぼす影響について作製した変異ノックインマウスを用いた解析を行い、限局的な行動を含む自閉性障害様の行動を示すことを明らかにした。また、患者リンパ芽球を用いた小胞体ストレスの解析では、変異遺伝子により小胞体ストレスを誘発しやすいことを見出した。

A. 研究目的

自閉性障害は、その社会行動性、コミュニケーションの欠如という特徴を持ち、その頻度は、88人に1人との報告があり、近年社会的な大きな問題となっている。しかしながら、分子病態が把握されておらず、現在の治療は、基本的には対処療法に留まり、療育や行動療法が中心となっている。

その原因は発達期の脳は、多様な要因に脆弱性を持ち遺伝的要因と環境要因の双方が影響し、病態解明が困難であり、バイオマーカーが決まらず、成人(家族を含む)の診断が困難な点に起因する。

近年の病因候補遺伝子解析では、強い関連を示すものにシナプス結合や機能に関する遺伝子が多く報告されていることから、主要病体はシナプス

形成・機能不全と考えられている。

細胞が正常に機能するには、遺伝情報に従って合成されたタンパク質が正しい高次構造を獲得するフォールディングが必要である。様々な化学的、物理的、遺伝的因子に起因する異常タンパク質(unfolded protein)が小胞体に蓄積した場合、細胞の正常機能の妨げとなるため、それを回避するために、細胞自体が持つ小胞体品質管理機構である小胞体ストレス応答(UPR: unfolded protein response)を用いて対応する。しかしながら、小胞体内に過度の不良タンパク質が蓄積しUPRでは対処できなくなったとき、細胞が受ける小胞体ストレスによって変化が起こされる。GABA受容体などのシナプスへの膜輸送を障害する。

本研究は、患者細胞、モデルマウスを用いて、自閉性障害に見出された遺伝子変異産物(神経接着蛋白CADM1)が誘導するCADM1変異タンパク質が誘導する小胞体ストレスシグナルにより、UPRが引き起こすシナプス機能タンパク質の膜輸送障害と自閉性障害統一的病態との関係を明らかにすることを目的とする。

かつて神経変性疾患である遺伝性家族性パーキンソン病などの少数の疾患の分子病態の解明が疾患の解明に大いに役立ったように、自閉性障害患者群の一部ではあっても単一遺伝子の変異で説明できる遺伝子変異データの集積が自閉性障害の統一的病態解明の飛躍的理解につながるものと考えられる。すでに遺伝子変異が確定した症例を中心に、遺伝子変異産物による小胞体ストレスに注目することで、自閉性障害における遺伝的要因と環境的要因の相互作用を解析するものであり、本研究により自閉性障害におけるシナプス機能障害との関係が明らかにされることが期待される。

本研究は、治療戦略構築の研究の突破口につながる研究であると考えており、自閉性障害患者の社会的不適応に対する治療法の開発は医療費、治療費を減額するだけでなく、患者本人自身の社会生活の改善、また患者に関わる社会的な問題およ

び家庭の問題の改善が見込まれる。厚生行政に貢献するのみならず、人間の個々の生活、日本の労働力を向上する点においても大いに貢献することが期待される。

## B. 研究方法

### 1) 細胞培養

COS細胞およびC2C5細胞は、37 5.0%CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。トランスフェクションはリン酸カルシウム法、あるいはlipofectamine 2000を用いて行った。

ヘテロに持つ自閉性障害家系からインフォームドコンセントにより得られた血液からリンパ球を分離した。さらにリンパ球にEBウィルスを添加し、培養細胞株を樹立し、リンパ芽球とした。リンパ芽球は、通常抗生物質ストレプトマイシン、および10%非動物血清入りRPMI培地で継代し、小胞体ストレス実験に用いる際は抗生物質未添加培地にまき直し、翌日まで37 5.0%CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養後、小胞体ストレス誘導試薬であるツニカマイシンやサプシガルジンの有無で、一定時間経過後に細胞を回収した。

### 2) 神経細胞の培養

マウス胎児の脳から海馬を採取した後、高グルコースDMEM溶液に入れ、終濃度0.25 % になるようトリプシンを加えて37 で15 分インキュベートした後、900rpmで5分間遠心分離を行った後、上清を取り除き、Hanks solutionを5 ml加え、1~2分静置後、上清を取り除き、Hanks solutionを5 ml加えて(3回繰り返し)、ピペティング $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>、神経細胞用培養液を0.3ml/well入れ、3週間程度37 5.0%CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養後、トランスフェクションを行った後、免疫染色法を行った。

### 3) リアルタイムPCR

リンパ芽球から、Rneasy mini kitを用いてtotal RNAを抽出した。、RNAにランダムヘキ

サマープライマーにてアニーリングした後、dNTP、DTT、緩衝液、逆転写酵素を加え混合し、37℃ 2時間反応させたのち、95℃ 5分で反応を停止させ、cDNA合成した。

得られたcDNAに対し、小胞体ストレスマーカーであるCHOP (TaqMan Gene Expression Assays)プローブおよびコントロールプローブGAPDを用い、リアルタイムPCR定量 (Applied Biosystems 7500 fast real-time PCR system) を行った。リンパ芽球におけるCHOPの発現量の変化を観察した。

#### 4) 免疫染色法

細胞を終濃度2%パラホルムアルデヒドを含むPBSにて固定後、PBSで洗浄した後、ブロッキングとして1%ヤギ血清および0.5%スキムミルクを含むPBS溶液を用い室温で一時間置いた。一次抗体に小胞体関連マーカーを4℃で一昼夜反応させ、さらに二次抗体としてFITCあるいはテキサスレッド標識抗イムノグロブリン抗体を加え、37℃一時間反応後PBSで希釈した後グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

#### 5) イムノブロット分析

組織および細胞を回収し、PBSで2回洗浄し遠心分離後、上清を捨て沈殿した細胞を50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail(Sigma)にて細胞を可溶化し回収した後、蛋白質量をBradford法にて測定した。得られた上清をSDS-アクリルアミドゲルにて泳動した。ニトロセルロースフィルターに転写し、一次抗体で反応させた後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識イムノグロブリンを用い、BCIPおよびNBTを含む発色液で反応させた。

#### 6) 行動解析法

##### 6-1) Open Field Test

マウスを正方形の field(60 × 60 × 40cm、60luxの照明下)に滞在させ、新規環境での活動

量や不安様行動について10分間測定した。

##### 6-2)light-dark transition

暗い箱と明るい箱(60 × 60 × 30cm、照明100lux)をマウスが5分間行き来できるように連結させた装置を用い、暗い箱にマウスを入れ、測定を開始した。マウスは暗い方を好むが、通常は探索行動をするので明るい箱の方にも行くが、不安の強いマウスは暗い箱にいたることが多く、明るい箱に行く回数や明るい箱での滞在時間が少ない傾向を示す。これによってマウスの不安様行動を測定した。

##### 6-3)elevated plus-maze test

マウスが壁際を好むという性質を利用して、壁の無い道(open-arm、25 × 5cm)と壁の無い道(enclosed-arm、25 × 5cm)を探索させ、滞在時間、回数、行動を観察した。なお、壁は15cmの高さ、照明は60luxを採用した

##### 6-4)social interaction test

29×18×12cmの箱の中に同群の2匹の雄マウスを入れて赤色光下で2日間観察し、社会性相互作用について測定した。

##### 6-5)Hand-scored behaviors in social interaction test

2匹のマウスを5分間テストケージに移動させ、カテゴリー別に(社会的でない探索行動、approaching(近寄る)、crawling(這いずる)、sleeping(相手と共に寝る)、sniffing(相手のにおいを嗅ぐ)、following(相手の後を追う)、grooming(相手の毛づくろいをする)、fighting(攻撃行動))時間を測定した。

##### 6-6)social memory/recognition test (Social investing behavior)

低い位置にいくつかの穴の開いた透明なアクリル製円筒をケージの中央に置いた。雄マウスは個々のケージに移動させ、二時間置いた後、卵巣摘出した雌マウスを5分間円筒に入れ、その後移す作業を3回繰り返し、15分間のインターバルをとり、3回目までと4回目で異なっ

た雌マウスを入れ、新たな侵入者を調べるのに費やす時間を測定した。

#### 6-7)Rotarod test

直径3cmの回転する棒の上にマウスをのせて徐々に速度を上げ、マウスが落下するまでの時間を測定する。回転する棒の上にマウスをのせて徐々に速度を上げ（5分間に4回転～40回転まで）、マウスが落下するまでの時間を測定した。

#### 6-8)Foot print test

30 cmの壁のある50cmの廊下と10cmの廊下を3回添って歩くように練習させ後、4回目の前に足にインクをつけて紙上を歩かせ、歩幅・後肢の幅を測定した。

#### 6-9)Buried food pellet test

食べ物をケージの隅の5cm深いところに埋め、18時間絶食状態のマウスをケージの中央に放ち、食べ物を見つけ出す時間を測定した。

#### 6-10)Grip strength test

マウス前肢をばねに付け、体を引き寄せる力を測定した。

#### 6-11)tail immersion hot plate test

熱刺激としてプロジェクターランプによる輻射熱をマウスやラットの尾に与え、尾を払いのけるなどの逃避反応を起こすまでの時間を測定した。

#### 6-12)Tail suspension test

マウスの尾にテープを貼り付け、そのテープに穴を開けて懸垂用のフックに掛け、6分間の無動であった時間(無動化時間)を計測した。

### 7) 実験動物(マウス)の飼育およびPCR法による遺伝子型の検定

マウスは、温度 $23.0\pm 2$ 度、湿度 $50\%\pm 10\%$ の室内にて飼育した。

Cadm1ノックインマウスについては、作出されたF1ヘテロミュータントマウス同士を交配した後、C57BL/6Jと8世代交配継代した。

遺伝型を調べるために、尾部組織を採取し、SDS

およびプロテアーゼK溶液に溶解し、フェノール/クロロフォルム抽出、エタノール沈殿により、DNAを得た。DNAは、PCRを行い、遺伝子型の検定を行った。DNA抽出法は、採取したマウス尾に対して40 $\mu$ lの滅菌水を加えた後、95度10分加熱し、プロテイナーゼK(終濃度2mg/ml)を10 $\mu$ l加えた後55度で120分、さらに95度10分加熱し、DNA抽出物とした。PCR反応液として、DNA溶液2 $\mu$ l、1 $\times$ buffer、0.25mM dNTP、2.5mM MgCl<sub>2</sub>、primer (Forward primer: 5'-ATGTATTTTCACAGGA ATTTGTTTGATG-3'、Reverse primer: 5'-TGTGAATGCACATCTTCATGTTG-3') 1pmol、滅菌水 合計15 $\mu$ lになるように調整し、PCR反応(95度3分1サイクル、94度30秒58度30秒72度30秒35サイクル、72度7分1サイクル)を行った。

#### (倫理面への配慮)

あらかじめ当該研究機関である自治医科大学の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に手続を行った後、研究を行った。

本邦自閉性障害児(3-15歳)のシナプス関連遺伝子群の変異解析に用いる末梢血液細胞は、自治医科大学において、自閉症の原因遺伝子解析を課題として、研究倫理委員会の承諾を得て、実施された。人体から採取された試料等を用いる場合は、文書により説明し、文書による同意(研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意、インフォームド・コンセント)を得た検体に対して実験を行った(承認番号 11-25)。

組換えDNA実験に関しては、所属施設での承認を受け指針に従う。取扱い者は組換えDNA実験および微生物の取り扱いの技術を持ち合わせ、内容に関しても熟知しており、適切な対応を行

った(承認番号 11-157)。

マウスを用いた動物実験は、施設にて設定されている動物取り扱いマニュアルに沿って行った。マウス各組織の採取のための麻酔およびやむを得ず施行した安楽死に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、筋肉弛緩剤であるネンプタル麻酔下あるいは二酸化炭素充満させた箱内で無痛下において二度と覚醒しないように行い、苦痛の無いように動物に対する倫理面での十分な配慮をした(動物実験承認番号 12-176)。

### C. 研究結果

これまで、Cell Death Disease (平成22年度受理：2010年)には、自閉性障害の患者に見出したCADM1の変異、またBourgeronらが発見したNeurologin-3(R451C)変異で小胞体ストレスが誘導されたことを報告した。BBRCおよびPLOS ONE(平成22年度受理：2010、平成23年度受理：2012)では、Cadm1ノックアウトマウスが、行動異常、Social Communicationの異常を示し、また自閉性障害の特徴の1つでもあるコミュニケーション障害に対応する超音波音声によるコミュニケーション異常を示したことを発表した。これらのことから、シナプス機能不全が自閉性障害の病態基盤である可能性を示した。

本年度では、シナプスにおけるCadm1複合体形成と機能について、これまで解析を行ってきたCadm1ノックアウトマウスではなく、自閉性患者により近い変異を導入したCadm1変異(Y251S)ノックインマウスについて解析することが研究の進展につながると考え、解析を実施した。

Cadm1はホモフィリックな結合をし、シナプス前膜で、C末端のPDZ結合領域を介してCASKと結合し膜輸送される。一方、シナプス後膜ではNLGNがPSD95に結合し膜輸送されるのに対し、Cadm1が結合するScaffold 蛋白や受容体についてはこれまで不明であったが、本研究においてCadm1

がPSD95に結合せず、Multi-PDZ domain protein 1 (Mupp1)に結合することを明らかにした(平成24年度受理：JNC, 2012)(図1)。

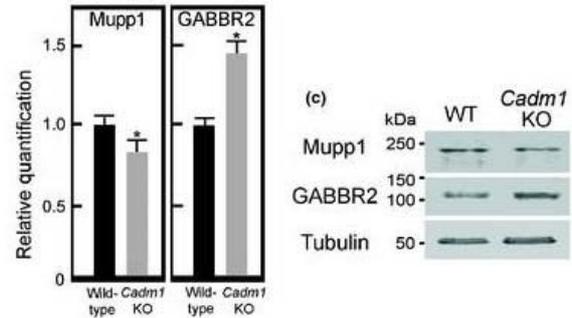


図1 Cadm1ノックアウトマウスにおけるMupp1GABA receptor B2の変動

Mupp1は13個のPDZを有し、PDZ13でSynGAPやGABBR2とPDZ10ではセロトニン受容体(5-HT<sub>2R</sub>)に結合する(平成23年度受理：PLOS ONE, 2012)。また、Cadm1ノックアウトマウスではグルタミン酸作動性神経のマーカーの発現が減少したことから、興奮性のシナプスの関与が示唆され、Mupp1を介した複合体形成が、興奮性と抑制性シナプスのバランスの変化に重要な役割を果たしていると考えられる。種々の受容体と結合できるMupp1を介して形成するCadm1複合体に、変化が生じることがASDの分子病態に関与していると考えられる。

Cadm1ノックインマウスの解析では、まず仔の遺伝型比率は201匹調べたところ、WT：ヘテロ：ホモ = 52:102:47となり、約1:2:1の結果となった。また、胎内致死や発達過程における死亡率は、変異型により違いは観察されなかった。したがって、生死に遺伝子変異が影響していないと考えられる。

マウスの神経組織、生理学および行動解析における解析を行った。行動解析では、Cadm1ノックアウトマウスで見られなかった常動性の行動が現れた。これらのことから、Loss-of-functionのみ



図2. Cadm1 変異ノックインマウスの常同性行動

ならず、変異によるGain-of-functionが病態に関与する可能性がさらに高まった。Cadm1変異ノックインマウスの初代海馬神経細胞は、デンドライトの伸長が抑制されていたことから、変異蛋白によるシナプス障害が起こっていることが示唆された。

また、変異CADM1を発現する患者由来の細胞における小胞体ストレス応答に対する感受性に着目し、遺伝子変異による小胞体ストレス誘導をリンパ芽球で検出可能な系を確立した。ASD患者家系のリンパ芽球に、小胞体ストレス試薬であるツニカマイシン(TM)を存在下または存在無しで、小胞体ストレスマーカーであるCHOPの発現を経時的に観察し、小胞体ストレスの変化を解析した。その結果、変異を持つ者(Y251S)は、変異を持たない者に比べ、CHOPの値が常に高かった。なお、コントロール遺伝子プローブGAPDによる検出値を相対的に扱った。さらにTM存在下では、変異を持つ者(Y251S)はCHOP上昇のピークが約1時間早期に出現し、小胞体ストレスに対する感受性が高いことを示した。内在性の変異CADM1が、小胞体ストレスに関与していることが明らかとなった(2013, 投稿中)

ASDに見出された遺伝子変異産物であるCADM1蛋白による機能障害(Loss-of-function)と小胞体ストレス(Gain-of-function)としてのシナプス機能障害との関係を明らかにした。

#### D. 考察

遺伝子変異による機能障害(Loss-of-function)に加え、変異蛋白が誘導する小胞体ストレス(Gain-of-function)によるシナプス受容体複合体の機能障害がASDの分子病態に関与していると考えられる。

本研究は候補遺伝子の一つであるCadm1を解析することにより、道筋をつけるものであり、方向性が示されたと思われる。

遺伝子変異産物による小胞体ストレスに注目することで自閉性障害における遺伝的要因と環境的要因の相互作用を解明するものであり、本研究に

よりASDにおけるシナプス機能障害との関係の解明に貢献した。

本研究を足掛かりとして、今後さらなる分子病態解明および治療法開発研究により、1%以上ともいわれるASD患者の社会的不適応の改善が望まれる。

#### E. 結論

Cadm1ノックアウトマウスによりCadm1がコミュニケーション障害、社会性、不安行動に関わっていること、またCadm1変異が神経細胞のシナプスに障害を及ぼすことが明らかとなった。さらに、CADM1の変異を導入したノックインマウス(個体)を用いた実験により、ノックアウトマウスの行動にはなく、より自閉性障害に近い常動性の行動が表れた。これらのことから、Loss-of-functionだけではなく、変異によるGain-of-functionが病態に関わっているとの結論に達した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

Fujita E(藤田恵理子)およびJimbo EF(神保恵理子は同一人物)。藤田は旧姓。

##### 1) 論文発表

1. [Fujita E](#), Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. A complex of synaptic adhesion molecule CADM1, a molecule related to autism spectrum disorder, with MUPP1 in the cerebellum. *J Neurochem.* 2012;123(5):886-894
2. [Fujita E](#), Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. Cadm1 at synapses on the dendrites of Purkinje cells is involved in mouse ultrasonic vocalization activity. *PLOS ONE*, 2012;7(1):e30151.

## 2) 学会発表

1. Kojima K, Yamagata T, Saito M, Matsumoto A, Jimbo EF, Momoi MY,: Secretin receptor and the associated molecular processes relevant to autism spectrum disorder . American Society of Human Genetics (ASHG) 62nd annual meeting, San Francisco, USA, November 6-10, 2012.
2. Matsumoto A, Yamagata T, Nozaki Y, Jimbo E, Momoi MY. 12q21 deletion syndrome with intellectual disability and facial dysmorphism. American Society of Human Genetics (ASHG) 62nd annual meeting, San Francisco, November 6-10, 2012.
3. 小島華林、松本歩、楊志亮、神保恵理子、山形崇倫、桃井眞里子: CADM1 遺伝子変異をもつ自閉性障害患者のリンパ芽球を用いた小胞体ストレス感受性についての検討. 日本人類遺伝学会第 57 回大会、2012 年 10 月 26 日、東京
4. 神保恵理子、小島華林、田辺裕子、山形崇倫、桃井眞里子、桃井隆: 自閉性障害に関与するシナプス接着因子 Cadm1 と Multiple PDZ domain protein(Mupp1)の関与、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋

## H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
- 3.その他  
なし