

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)

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

平成22年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 神保 恵理子

平成25(2013)年 3月

目 次

I . 総合研究報告

(研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況、健康危険情報を含む)

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

自治医科大学 神保恵理子----- 1

. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 8

. 総合研究報告

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）
総合研究報告書

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

脳発達障害である自閉性障害は、社会的な大きな問題であり、治療法の確立が緊急な課題であるものの、分子病態が未だ十分に把握されていなかった。発症には遺伝的要因が強く関与し、病因候補遺伝子解析が世界中で行われ、強い関連を示すものには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。これまで我々は、自閉性障害患者に、機能シナプスに関与するCADM1の2つの変異(H246N, Y251S)を見出している。本研究は、CADM1のLoss-of-function、またCADM1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検討した。CADM1の欠損による機能障害の解析については、ノックアウトマウスを用いて行った。その結果、Cadm1ノックアウトマウスは、不安、攻撃性などの行動異常、社会的コミュニケーションの異常を示した。マウス幼少仔と母の間で交わされるコミュニケーション(超音波音声)の測定では、音声コミュニケーションにも異常があることが明らかとなり、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た。また、変異CADM1による機能障害の解析について初代培養神経細胞を用いた遺伝子発現導入系の解析において行ったところ、変異CADM1タンパクによる小胞体ストレスの誘導が見られた。さらに、作製したCadm1変異ノックインマウスにおいて、ノックアウトマウスでは観察されなかった自閉性障害の特徴的な症状(限定的な行動)が表れた。これらのことから、Loss-of-functionだけでなく、変異によるGain-of-functionが自閉性障害の分子病態に関わっている可能性が高いと考えられた。

A．研究目的

脳発達障害である自閉性障害は子供の約1%近くを占めており、その社会行動性、コミュニケーションの欠如は社会的な大きな問題であり、治療法の確立が緊急な課題である。しかしながら、疾患解明が遅れているのが現状であり、その主な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、分子病態が把握されていない点にある。

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。変異タンパクは、小胞体ストレスセンサーを介してCHOP、ATF4などの様々なUPR(Unfolded protein response)を誘導し、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、自閉性障害関連変異タンパクの機能障害だけではなく、変異タンパクが誘導する小胞体ストレスに着目した点に独創性があり、患者細胞、モデルマウスを用いて、CADM1 変異タンパクが誘導する小胞体ストレスシグナルにより引き起こされる UPR が与えるシナプス機能タンパクの膜輸送障害と、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。

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、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。

また、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、最終的に、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や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期待される。

B. 研究方法

1) 細胞培養

COS 細胞、C2C5 細胞およびリンパ芽球は、37 5.0%CO₂ で培養した。

2) 神経細胞の培養

マウス胎児海馬を採取し、トリプシンにて細胞を分散した後、1×10⁵ cells/cm² になるように神経細胞用培養液を、37 5.0%CO₂ で培養後、免疫染色法を行った。

3) 免疫染色法

細胞または、マウス組織を 2~4%パラホルムアルデヒド含有 PBS にて固定した。1%ヤギ血清および 0.5%スキムミルク含む PBS 溶液でブロッキングし、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、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。

4) イムノプロット分析

組織および細胞を回収し、50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton

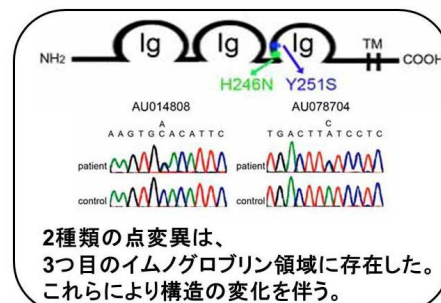


図1 自閉性障害に見出された Cadm1の変異

X-100, protease inhibitor cocktail(Sigma)にて細胞を可溶化し回収した。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、二次抗体(アルカリフォスファターゼ標識イムノグロブリン)を反応させ、BCIP および NBT を含む発色液で検出した。

5) 行動解析法

Open Field Test, light-dark transition, elevated plus-maze test, social interaction test, Hand-scored behaviors in social interaction test, social memory/recognition test (Social investing behavior), Rotarod test, Foot print test, Buried food pellet test, Grip strength test, tail immersion hot plate test, Tail suspension test) を実施した。

6) 実験動物 (ノックインマウス) の作製

標的遺伝子のゲノム BAC クローンの探索、および取得。

Red/ET テクノロジーを利用した CADM1 遺伝子ターゲティングベクター RecBAC 発現ベクターの構築。高純度 RecBAC 発現ベクター液の調製。

ES細胞への CADM1 遺伝子ターゲティングベクターの導入と G418 耐性株の樹立。G418 耐性 ES 細胞株サザンスクリーニング。

ES 細胞株の凍結保存、ジェノタイピング、およびカリオタイピング。

キメラマウス、F1 ヘテロミュータントマウスの作製。

以上により、得られた F1 ヘテロミュータントマウス同士を交配し、実験に用いた。

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

Cadm1 遺伝子改変マウスは、温度 23.0±2

度、湿度 50% ± 10% の室内にて飼育した。1 mm 程度の尾を採取し DNA を抽出後、PCR を行い、遺伝子型を検定した。

(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. D. 研究結果及び考察

自治医科大学小児科学講座および国立精神・神経センター疾病研究第五部が発見した RA175 (別名 SynCAM1、現在 *Cadm1* に統一) は神経細胞に特異的に発現するイムノグロブリンスーパーファミリーに属する神経接着蛋白であり (Fujita et al., 1998; 2001; 2003; 2005)、Neurologin や Neurexin と同様に C 末端に PDZ 結合領域を持ち、機能シナプスを形成する。

ヒト自閉性障害は言語障害を伴い、Social interaction や communication 異常が知られている。これまで遺伝性自閉性障害患者の 1% が Neurologin の変異を持つことが報告されている。自治医科大学小児科学講座では遺伝性自閉性患者 (米国自閉症協会) 200 人の *CADM1* 遺伝子の変異解析により、言語障害を伴う 2 人の男子患者とその家族に H246N、Y251S の変異を発見し、これらの変異は *Cadm1* のイムノグロブリン領域の N 端から 3 番目に存在することを報告した (図 1、Fujita co-first author et al., 2008)。

小胞体は変異を原因とする折りたたみ異常の蛋白質を分解除去する品質管理機構、すなわち UPR (Unfolded protein response) を誘導する機構を有している。

これまで、自閉性障害の患者とその家族に見出した *CADM1* の 2 つの変異 (H246N、Y251S) により、小胞体ストレスが誘導され、*Cadm1* 変異を発現させた神経細胞は、デンドライトの伸長が抑制されており、*Cadm1* 変異タンパク質はシナプスマーカーと共局在する割合が少なかった。このことからシナプス障害が起こっていることが示唆された (平成 22 年度受理: Cell Death Disease 2010) (図 2)。また Bourgeron らが発見した自閉性障害患者由来 Neurologin-3 (R451C) 変異についても同様に、小胞体ストレスが誘導され、CHOP の発現増大が観察された (平成 22 年度受理: Cell Death Disease 2010)。これらのことから、シナプス障害が起こっていることが示唆される。

自閉性障害と *Cadm1* の関与を調べるために、*Cadm1* ノックアウトマウスの行動学的解析を行った。Open field tests、light-dark




Types* (8 DIV**)	WT	Y251S
正常神経細胞 long dendrites, >1000 μm 	63.6 ± 6.0%	9.1 ± 1.8%
伸長短め 断片的 short dendrites, <1000 μm 	27.3 ± 2.6%	36.4 ± 3.5%
伸長なし no dendrites, <100 μm 	9.1 ± 0.8%	54.5 ± 4.3%

図2 *Cadm1*の変異が及ぼす神経細胞への影響

transition、elevated plus-maze tests 法を用い、不安関与行動などについて検討したところ、まず Open field tests ではノックアウトマウスは野生型と比べて、中央にいる時間が短く、light-dark tests では明るい箱にとどまる時間が少なかった。活動距離は両者でほぼ同じことから、Cadm1 ノックアウトマウスは不安行動傾向にあることが示された。このことから、Cadm1 ノックアウトマウスはある環境において不安行動を示すと考えられる。

また、マウス間の直接的行動解析の結果、Cadm1 ノックアウトマウスは野生型と比較して、多動で他マウスとの接触時間が短かった。ファイティングに費やす時間はノックアウトマウスの方が多かった。これらの結果から、ノックアウトマウスはより積極的な行動を引き起こすことが明らかになった。social memory/recognition tests を用いた Social investing behavior の解析では、ノックアウトマウスは親近感を形成することが難しいことが明らかになった。

トレーニング後の試験ではマウスが落下するまでの時間が野生型と比較して短いという結果であった。このことから、ノックアウトマウスは運動機能の不器用さが見られ、これは自閉性障害患者でたびたび見られる症状とも似ている。小脳の機能と関係がある可能性を示唆した。

以上のことから、Cadm1 ノックアウトマウスは、行動異常、Social Communication の異常を示し、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(平成 22 年度受理：BBRC 2010) (図 3)。Cadm1 ノック

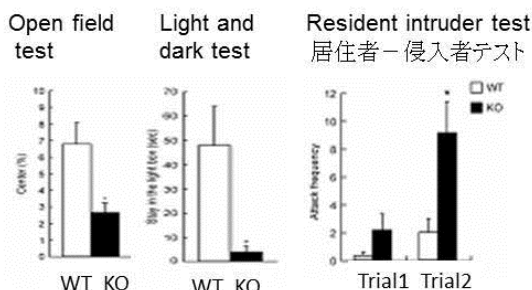


図3 Cadm1欠損マウスの不安行動および攻撃性行動の増大

アウトマウスは、不安、攻撃性などの行動異常、社会的コミュニケーションの異常を示したものの、このマウスは自閉性障害の特徴的

な症状(限定的な行動)は観察されなかった。これらのことから、Loss-of-function 以外に、変異による Gain-of-function が病態に関わっている可能性が高いと考えられる。

さらに、Cadm1 ノックアウトマウスを用いて自閉性障害の特徴の1つであるコミュニケーション障害について検討したところ、Cadm1 ノックアウトマウスは言語障害のモデルマウス Foxp2(R552H)変異ノックインマウスと同様に、超音波音声によるコミュニケーションの異常と小脳の発達障害を示した。Cadm1 は分子層のプルキンエ細胞の樹状突起の端に発現しており、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である vesicular glutamate transporter 1 (vGluT1)の発現が減少した。この現象は、Foxp2KI マウスと同じであり、Cadm1 の発現している小脳(プルキンエ細胞)が超音波音声に関与していることを示唆した(平成 23 年度受理：PLOS ONE 2012)。

Cadm1 ノックアウトマウスは、異常行動だけでなく、超音波音声によるコミュニケーションの異常も示し、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唆した。すなわち、Cadm1 機能シナプスはマウス USV(ヒト言語)神経回路のシナプス形成に関与している可能性が考えられる(図 4)。

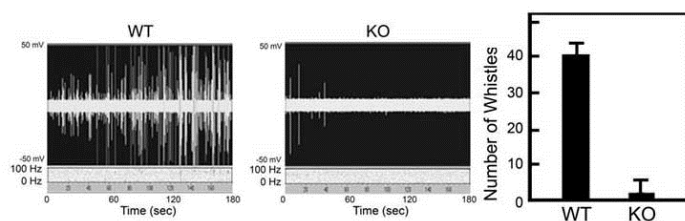


図4 Cadm1欠損マウスの超音波音声障害

また、CADM1 と同様に C 端に PDZ 結合領域を持つシナプス蛋白 CNTNAP2 が、Foxp2(言語障害を持つ KE 家系で変異が見出されている)に関与している超音波音声コミュニケーションに関わっていることを明らかにした(平成 23 年度投稿受理：Fujita et al., Neurosci. Lett. 2012)。

Cadm1 ノックアウトマウスとは異なり、自閉性患者により近い 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、マウスを作製し、

解析を実施した。

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では、 dendro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て CHOP 値が常に高かった。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)

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 5)。

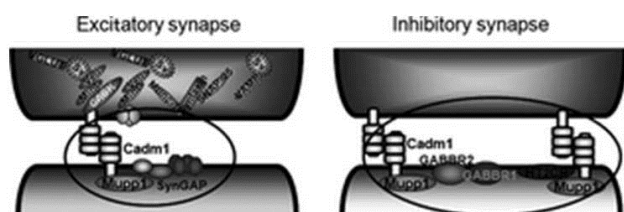


図5 Cadm1結合複合体(Cadm1-Mupp1-GABBR2)モデル

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_{2R}) に結合する(平成 23 年度受理:PLOS ONE,2012)。このように、Cadm1 は Mupp1 を介して種々の受容体と複合体を形成しており、複合体の形成機能障害が ASD の分子病態に関与していると考えられる。

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輸送障害が ASD の分子病態に関与していると考えられる。

E. 結論

CADM1 の 2 つの変異(H246N, Y251S)、は、小胞体ストレスを誘導し、神経細胞の dendroライトの伸長を抑制し、シナプス障害が誘導したことを明らかにした。また Cadm1 ノックアウトマウスの超音波音声を測定することで Cadm1 のコミュニケーション障害への関与を示唆した。しかしながら Cadm1 ノックアウトマウスでは十分に自閉性障害を説明できないため、Loss-of-function 以外に、変異による Gain-of-function が病態に関わっている可能性が高いと考えられた。

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.
3. [Fujita E](#), Tanabe Y, Momoi MY, Momoi T. Cntnap2 expression in the cerebellum of

- Foxp2(R552H) mice, with a mutation related to speech-language disorder. *Neurosci Lett.* 2012;506(2):277-280.
4. Maekawa M, Ito C, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Fujita E, Momoi T, Toshimori K. Localisation of RA175 (Cadm1), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, in the mouse testis, and analysis of male infertility in the RA175-deficient mouse. *Andrologia.* 2011;43(3):180-188.
 5. Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T. Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396 (3): 703-708.
 6. Fujita E, Dai H, Tanabe Y, Zhiling Y, Yamagata T, Miyakawa T, Tanokura M, Momoi MY, Momoi T. Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, CADM1. *Cell Death Dis.* 2010; 1: e47.
- 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、桃井真里子: 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 24 日-26 日、東京
 4. 神保恵理子、小島華林、田辺裕子、山形崇倫、桃井真里子、桃井隆: 自閉性障害に關与するシナプス接着因子 Cadm1 と Multiple PDZ domain protein(Mupp1) の關与、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋
 5. 藤田恵理子、山形崇倫、桃井真里子; 自閉性障害患者に見出された変異蛋白による小胞体ストレスと分子病態との關係、第 53 回日本小児神経科学学会総会、2011 年 5 月 27 日、横浜
 6. 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子; 自閉性障害候補遺伝子 CADM1 ノックアウトマウスにおける超音波音声、第 34 回日本神経科学大会年会、2011 年 9 月 15 日、横浜
 7. 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子; Catnap2 expression in the cerebellum of the Foxp2(R552H) mice, with mutation related to the speech-language disorder、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、横浜
 8. Tanabe Y、Fujiwara Y、Fujita E、Kasahara T、Yuasa S、Momoi T; The temporal expression and cytoplasmic localization of the novel Foxp2 isoform lacking forkhead domain in the developing Purkinje cells, BMB2010(第 33 回日本分子生物学会大会、第 83 回日本生化学会大会合同大会)、2010 年 12 月 8 日、神戸
 9. 藤田恵理子、代紅梅、田辺裕子、Yu Zhiling、山形崇倫、宮川拓也、田野倉優、桃井真里子、桃井隆、自閉性障害における Cadm1 遺伝子変異に誘導される小胞体ストレス、Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会合同大会)、2010 年 9 月 2 日、神戸。
- 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

. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

Fujita Eは、神保恵理子の旧姓および名を示す。

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujita, E., Tanabe, Y., Imhof, B.A., Momoi, M.Y., Momoi T.	A complex of synaptic adhesion molecule CADM1, a molecule related to autism spectrum disorder, with MUPP1 in the cerebellum.	J Neurochem	123	886-894	2012
Fujita, E., Tanabe, Y., Imhof, B.A., Momoi, M.Y., Momoi T.	Cadm1 at synapses on the dendrites of Purkinje cells is involved in mouse ultrasonic vocalization activity.	PLoS ONE	7	e30151	2012
Fujita, E., Tanabe, Y., Momoi, M.Y., Momoi, T.	Cntnap2 expression in the cerebellum of Foxp2(R552H) mice, with a mutation related to speech-language disorder.	Neurosci Lett.	506	277-280	2012
Maekawa, M., Ito, C., Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., Fujita, E., Momoi, T., Toshimori, K.	Localisation of RA175 (Cadm1), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, in the mouse testis, and analysis of male infertility in the RA175-deficient mouse.	Andrologia	43	180~188	2011

Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T.	Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice.	Biochem Biophys Res Commun.	396	703-708.	2010
Fujita E, Dai H, Tanabe Y, Zhiling Y, Yamagata T, Miyakawa T, Tanokura M, Momoi MY, Momoi T.	Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, CADM1.	Cell Death Dis.	1	e47	2010