

2012年12月5日

報道関係各位

自閉症モデルマウスの作製に成功

—自閉症関連の創薬に向けた利用が可能—

本研究成果のポイント

- 自閉症で発見された部分欠失型の分泌促進因子 CAPS2 を発現するマウスを作製
- 作製したマウスは自閉症で見られる行動障害を示した
- 作製したマウスは脳由来神経栄養因子の神経軸索からの分泌低下を示した
- 自閉症関連の創薬などの応用研究に利用可能

本研究成果は、米国科学アカデミー紀要『*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*』12月3日にオンライン掲載されました。

【概要】

東京理科大学理工学部の古市貞一（ふるいち ていいち）教授と群馬大学先端科学研究指導者育成ユニットの定方 哲史（さだかた てつし）助教の研究グループは、自閉症のモデルマウスの作製に成功しました。本研究の成果の一部は、独立行政法人科学技術振興機構「戦略的創造研究推進事業 CREST」によるものです。

「自閉症」は、“対人関係の障害”、“言語等によるコミュニケーションの障害”、“活動や興味の限局と同じ行動の反復”を特徴とする発達障害の一つです。障害の程度は様々ですが、人口千人当たり一人以上の割合で発症し、改善はあっても完治しないことから家族への負担が大きく、深刻な社会問題となっています。しかしながら、その発症メカニズムはわかっていません。

研究チームでは以前、自閉症患者の協力を得て、分泌促進因子 CAPS2^{*1}の遺伝子発現パターンを健常者と比較し、一部の患者において、本来稀な「選択的スプライシング^{*2}」によって111アミノ酸を欠失したCAPS2が異常に増加していることを示しました。今回、同じ亜型を発現するモデルマウスを開発し、その行動を詳しく調べると、社会行動の異常や新しい環境への適応低下などの異常を示すことがわかりました。また、部分欠失型CAPS2のタンパク質は、大脳、海馬、小脳などの神経回路で、神経軸索^{*3}での局在が著しく減少し、これにより、神経回路の発達や学習・記憶機能を調節し、精神疾患への関連も知られている脳由来神経栄養因子（BDNF）^{*4}の軸索からの分泌が異常になることも明らかになりました。この結果は、CAPS2の異常が自閉症の発症リスクに関与する可能性を強く示唆しています。

今回明らかになった部分欠失型CAPS2を発現する自閉症モデルマウスは、自閉症の発症メカニズム解明の糸口になり、創薬などの応用研究にも道を開くと期待されます。

注) *印：別紙用語解説 図：別紙添付

【背景】

「自閉症」は、三歳までに発病する精神疾患として知られ、“対人関係における障害”、“言語などによるコミュニケーションの障害”、“興味の限局（活動や興味の範囲が狭くなる）、反復的で常同的な行動（同じ行動を常に繰り返す）”を特徴とした疾患です。人口千人当たり一人、比較的軽度な症状を含めると百人当たり一人、の高い割合で発症する病気ですが、その発症メカニズムはまだ分かっていません。最近では、遺伝要因が大きく関与し、脳の発達障害によって発症すると考えられています。この病気は、改善はあっても完治しないため、家族への負担が大きく、社会的に深刻な問題となっています。また、早期からの治療的な教育や対処療法、および社会的なサポートなどによって、行動上の問題はある程度の改善が可能であり、早期診断技術の確立が求められています。

CAPS2 は、神経ペプチドホルモンや生体アミン（ドーパミンやノルエピネフリンなど）の分泌を促進する因子と考えられています。これまでに研究チームは、“CAPS2 タンパク質が脳由来神経栄養因子（BDNF）の分泌を促進する”こと、“一部の自閉症患者において CAPS2 遺伝子の選択的スプライシングに異常がある”ことなどを明らかにしてきました。BDNF は、神経ネットワークの形成に重要で、学習や記憶などの高次機能の調節に関係し、いくつかの精神疾患にも関連することが知られている重要な分泌タンパクです。

【研究内容と成果】

（1）CAPS2 遺伝子改変による自閉症モデルマウスの作製

研究チームは、ES 細胞を用いた相同組換え法を用いて、28 個のエクソンをもつ CAPS2 遺伝子のうちエクソン 3（111 アミノ酸残基をコード）を特異的に欠失させた遺伝子改変マウスを作製しました（図 1）。この変異マウスは、一部の自閉症患者で異常増加が見出された本来稀な選択的スプライシングによって産生されると考えられる、111 アミノ酸残基が短い部分欠失型 CAPS2 を発現します。このモデルマウスを解析することで、短い CAPS2 亜型は、大脳皮質、海馬、小脳皮質の神経回路において、神経軸索の投射領域にはほとんど分布せず、細胞体あるいは樹状突起にほぼ限局して存在し（図 2、3）、軸索やプレシナプスにおける BDNF の分泌が低下することが明らかになりました（図 4）。また、興奮性シナプスの形態や一部の抑制性ニューロン（神経細胞）の分化などに影響が観察されました。これらの結果から、CAPS2 はニューロンにおける軸索、樹状突起、細胞体の局所特異的な BDNF の分泌促進に必須であることが、モデルマウスで実証されました。すなわち、111 アミノ酸残基を欠失した短い CAPS2 の発現増加は、BDNF の局所分泌パターンを異常にすることが明らかとなりました。

（2）CAPS2 遺伝子改変による自閉症モデルマウスの自閉症様の行動

一部の自閉症で異常増加する部分欠失型 CAPS2 を発現する変異マウスについて、自閉症に関連する社会行動などについて解析しました。

●社会的相互作用テスト（図 5）： 同じケージで飼育したことのない 2 匹の雄マウスをテスト箱に入れ、マウスの社会的相互作用（近づいて匂いを嗅いだり、接触したりする行

動)を評価しました。CAPS2 遺伝子改変マウスは、相互作用の時間に有意な低下が見られました。また、見慣れない(初見の)マウスや慣れた(既知の)マウスに関係なく、相互作用が減少しました。このことから、変異マウスには社会的な相互作用に障害があることがわかりました。

●母性(養育)行動テスト: 母親マウスの自ら出産した仔マウスへの養育行動を調べました。変異をもつ母親マウスは子育てを放棄する割合が高く、養育行動に障害があることがわかりました。

●新奇環境への適応テスト(図6): 通常より広い飼育ケージ(オープンフィールド)内に見慣れない(新奇の)物体を設置した際に、マウスが示す探索行動や、物体への接触回数を調べました。この結果、変異マウスは新奇性の強い環境下では行動量が有意に減少し、新奇物体への接触を避ける傾向を示しました。また、高架式の十字迷路(高所に設置した十字路のうち、一方向の通路には塀があり、他方向の通路には塀がなく下が見える)にマウスを入れた時、変異マウスは、野生型マウスに比べて(不安をより感じる)塀の無い通路への侵入率が低い傾向がありました。このことから、変異マウスは新奇環境下での適応性の低下および不安行動の亢進があることがわかりました。

また、変異マウスは、日内リズム(サーカディアン・リズム)^{※5}の異常や、生後一週目における母子分離時の変異仔マウスでの超音波発声の低下も見られました。なお、変異マウスは、通常の飼育環境下での視覚、嗅覚、聴覚の基本的な感覚機能は正常でした。

以上より、今回、変異マウスの行動解析の結果から、CAPS2による分泌制御は社会行動や情動などに関係しており、短いCAPS2 亜型の発現増加は、自閉症で見られるような社会的相互作用の低下、未知の環境への適応力の低下や不安の増大などの行動障害を示すことが明らかになりました(図7)。

【今後への期待】

自閉症の分子レベルでの診断法は、現在のところ確立されていません。今回の研究結果から、CAPS2の部分欠失型の発現と、自閉症様行動の発症との関係が強く示唆されました。このことから、例えばこの部分欠失型CAPS2の発現を検出することにより、早期での自閉症リスクの診断が可能になると期待されます。このことは、根本的な治療法が無い現在、教育や対症的薬物治療などを早めに施すことができるため、自閉症が抱える社会的な問題の改善につながる可能性があります。また、この変異マウスをモデルとして使用することで、自閉症の発症や病態のメカニズムを解明する糸口となる可能性を秘めています。さらに、自閉症関連の創薬につながる応用研究にも利用が可能です。

【本件に関するお問い合わせは下記にお願いいたします】

●東京理科大学 理工学部応用生物科学科

教授 古市 貞一 (ふるいち ていいち)

TEL: 04-7124-1501(代)内3459/3445, FAX: 04-7122-9303

●群馬大学 先端科学研究指導者育成ユニット

助教 定方 哲史 (さだかた てつし)

TEL: 027-220-7968, FAX: 027-220-7909

○東京理科大学 産学官連携課

TLO 企画管理部門

TEL: 03-5228-8090 (1866), FAX: 03-5228-8091

○国立大学法人群馬大学

昭和地区事務部総務課副課長 尾内仁志

〒371-8511 前橋市昭和町三丁目 39 番 22 号

TEL: 027-220-7711, FAX: 027-220-7720

【用語解説】

※1 CAPS2

この遺伝子名のフルネームは、Ca²⁺-dependent activator protein for secretion であり、CADPS2 と表記されることもある。ヒト CAPS2 の遺伝子座は、7 番染色体上の自閉症発症との関連が疑われる感受性領域 1 (AUTS1) に存在する。CAPS ファミリーのタンパク質は、CAPS2 の他に CAPS1 があり、有芯小胞と呼ばれる大型の分泌小胞に作用して、小胞内腔に含有する神経ペプチドホルモンや生体アミン（ドーパミン、ノルエピネフリンなど）の分泌を正に調節する役目を果たすことが知られている。研究グループは、CAPS2 が BDNF を含む小胞にも結合し、その分泌を促進する役割をもつことを報告している (Sadakata et al., *J Neurosci*, 24:43-52, 2004)。また、CAPS2 ノックアウトマウスでは自閉症様の行動障害や神経回路形成の発達異常を示すことも報告している (Sadakata et al., *J. Clin. Invest.* 117:931-943, 2007 ; Sadakata et al., *J. Neurosci*, 27:2472-2482, 2007)。CAPS2 が制御する有芯小胞の分泌は、細胞極性を持つニューロンの細胞体、軸索、樹状突起といった細胞の局所で起こる。今回の研究では、CAPS2 による BDNF の分泌がどの部位で促進されるのか（軸索か、細胞体—樹状突起か）という点が重要なポイントである。

※2 選択的スプライシング

真核生物のゲノム DNA 上にある遺伝子のタンパク質をコードする配列は、タンパク質へ翻訳される暗号となるエクソン (exon) と呼ばれる複数の配列と、その間をつなぐイントロン (intron) と呼ばれる介在配列から構成される。遺伝子は、まず、エクソンとイントロンが一続きの前駆体 mRNA に転写され、それとほぼ同時にイントロンを除去してエクソン同士を連結した成熟 mRNA の産生がおこる。このイントロンを除去し前後のエクソンを再結合する反応が、スプライシングである。遺伝子や細胞によっては、スプライシング反応の際に特定のエクソンをスキップした成熟 mRNA を産生する場合があります、これによって性質の異なるタンパク質の鋳型が作られることになる。これを選択的スプライシングと呼ぶ。

※3 軸索

神経細胞体から伸びる細長い一本の神経突起で、標的神経細胞とシナプス結合で連絡をする線維である。軸索終末にはシナプス前部があり、神経伝達物質（グルタミン酸、GABA、アセチルコリンなど）を含有する多数のシナプス小胞が分布している。シナプス前部によっては、有芯小胞を含むものもある。

※4 脳由来神経栄養因子 (BDNF)

神経栄養因子ファミリーの一つである。神経回路の発達やシナプスの機能を調節する重要な作用が知られている。特に、脳に多く発現し、脳の高次機能への関与や、うつ病や自閉症などの精神疾患への関連性なども報告されている。

※5 サーカディアン・リズム

概日リズムともいう。約 24 時間の周期で繰り返す生理現象。このリズムを生む時計は、哺乳類では視交叉上核にある。自閉症患者では睡眠・覚醒リズムが乱れる傾向がある。

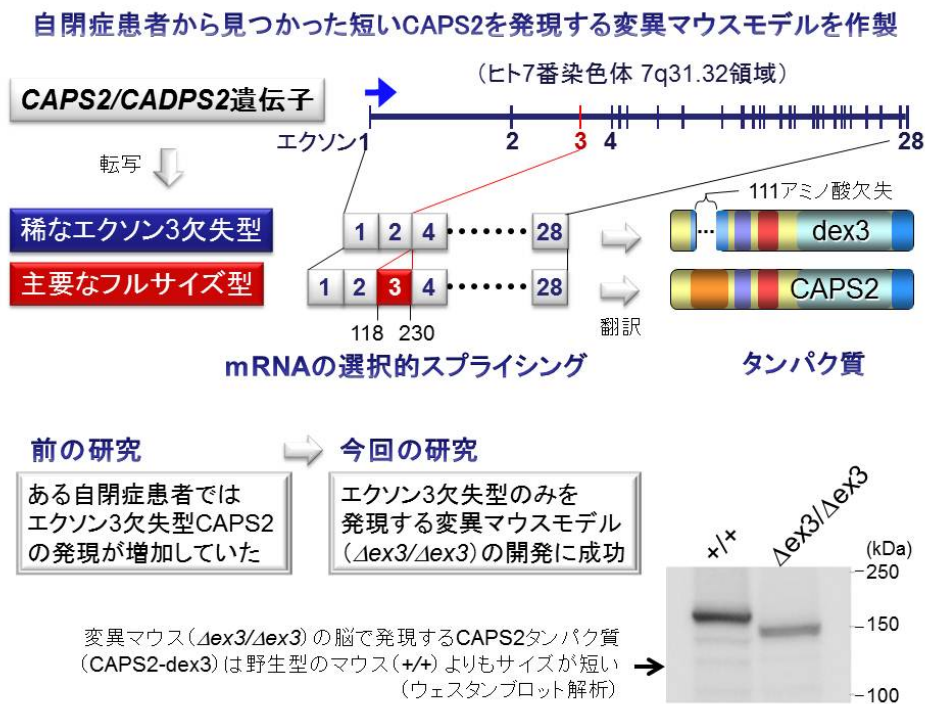


図1 CAPS2 遺伝子の構造、自閉症で見つかったエクソン 3 を欠失する選択的スプライシングと短い部分欠失型 CAPS2 の発現、エクソン 3 欠失型マウス ($\Delta\text{ex3}/\Delta\text{ex3}$) の作製

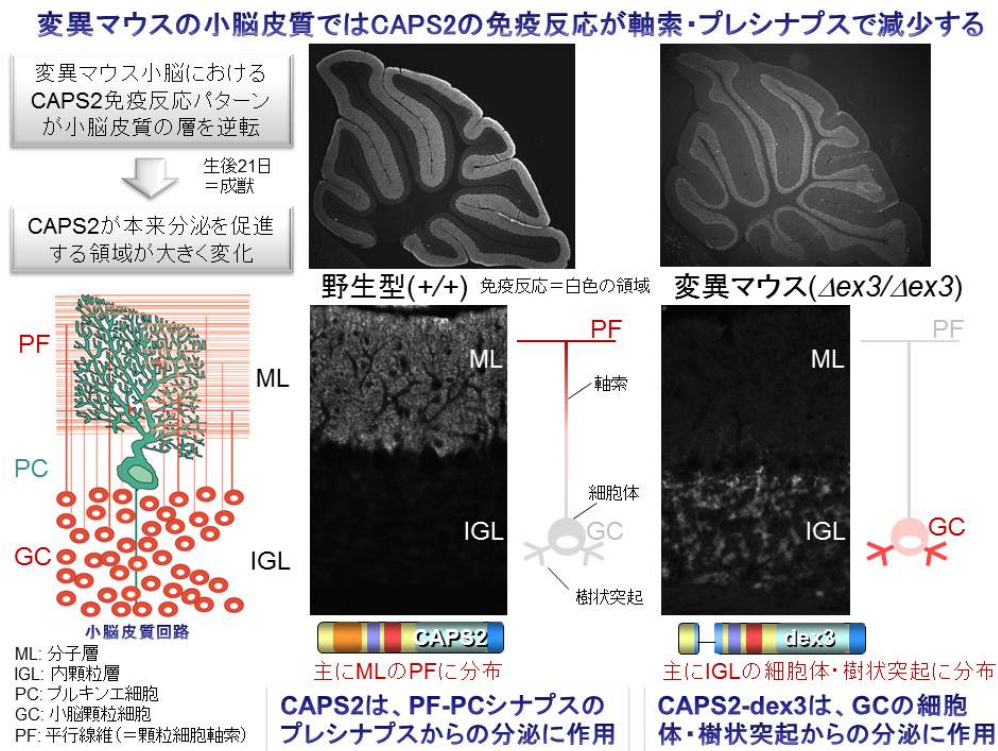
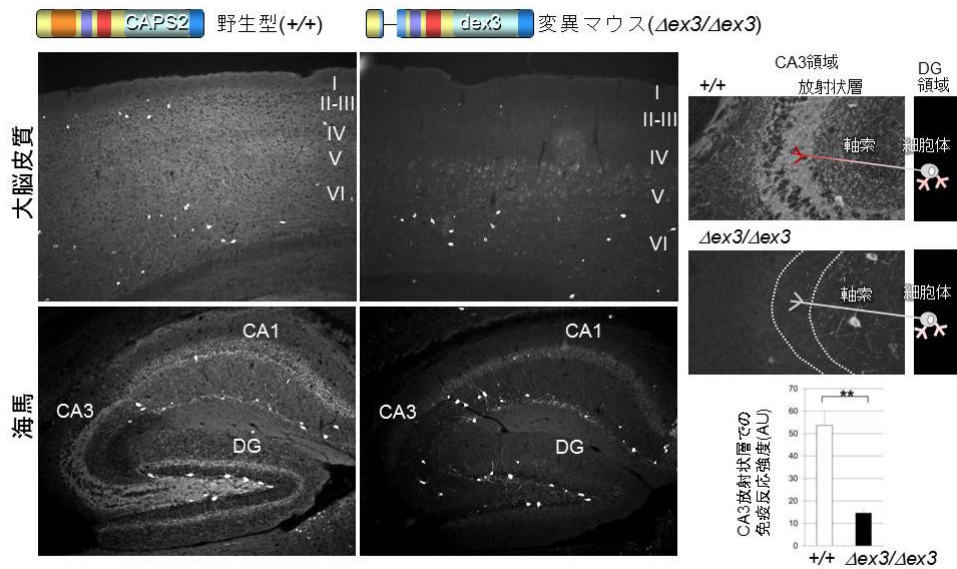


図2 小脳皮質神経回路における部分欠失型 CAPS2 の分布。野生型マウスにおいては、完全長型 CAPS2 は小脳顆粒細胞 (GC) の軸索 (平行線維、PF) のある分子層 (ML) に

分布するが、変異マウス ($\Delta ex3/\Delta ex3$) では、部分欠失型 CAPS2 は顆粒細胞の細胞体一樹状突起がある内顆粒層 (IGL) に分布して軸索のある ML にほとんど分布しない。

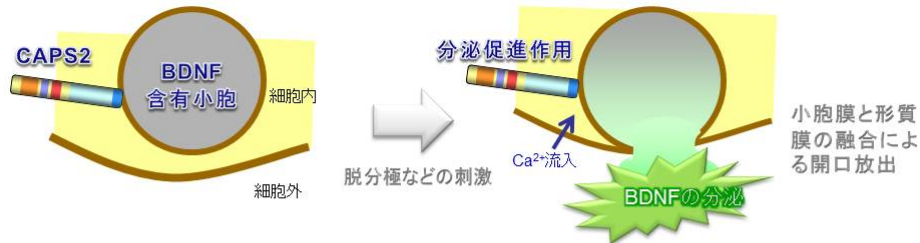
変異マウス的大脑皮質や海馬でも軸索投射領域のCAPS2免疫反応が減少する



例: 海馬歯状回(DG)の顆粒細胞の軸索(苔状線維)は、CA3領域に投射して放射状層でシナプス結合するが、変異マウスではこの領域でのCAPS2免疫反応が低下している

図 3 変異マウス ($\Delta ex3/\Delta ex3$) の大脑皮質と海馬の回路において部分欠失型 CAPS2 は軸索投射領域に分布しない。例えば、海馬の歯状回(DG)顆粒細胞の軸索投射先の CA3 錐体細胞とのシナプス部には、部分欠失型 CAPS2 はほとんど存在しない (右写真とグラフ)。

これまでの研究: CAPS2はBDNFが含まれる小胞の活動依存的な開口放出を促進する



今回の研究: 変異マウスの海馬歯状回顆粒細胞の軸索からのBDNF分泌が低下

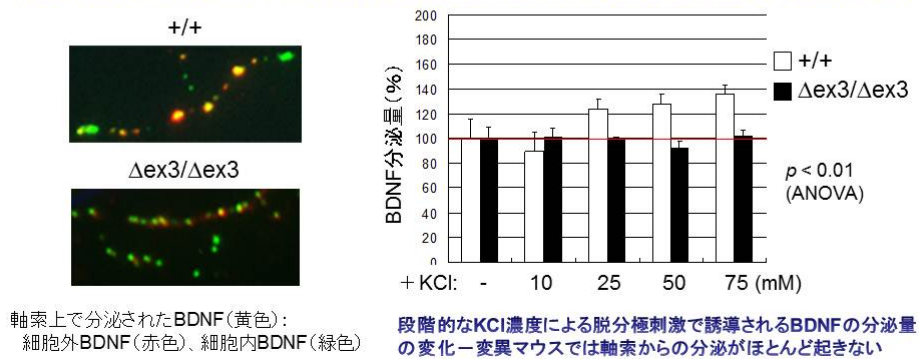


図 4 CAPS2 による有芯小胞からの BDNF 分泌促進が変異マウス ($\Delta ex3/\Delta ex3$) では減少

変異マウスは社会的なマウス個体間の相互作用が低下している

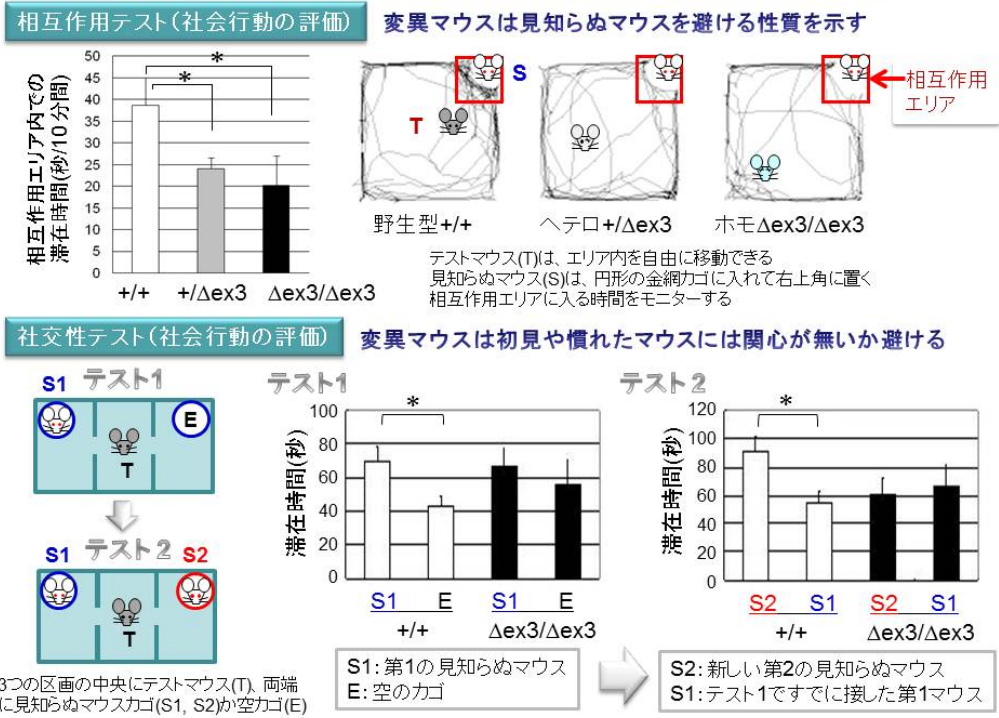


図5 変異マウス ($\Delta ex3/\Delta ex3$) はマウス個体間の社会的相互作用が減少する

変異マウスは不安が亢進している

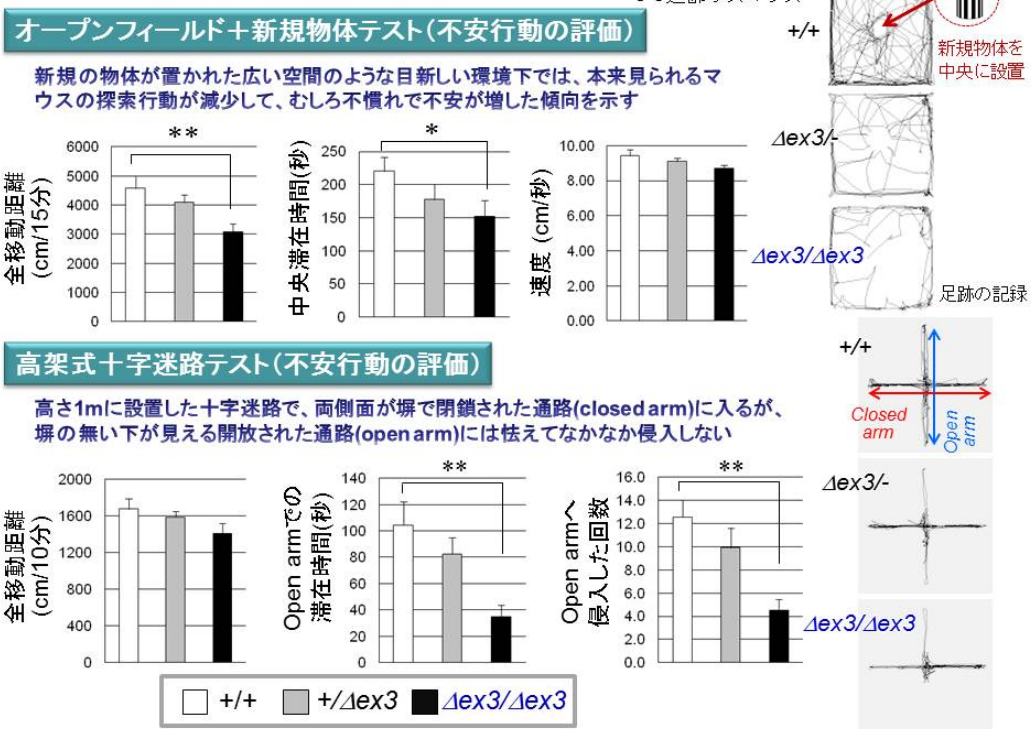
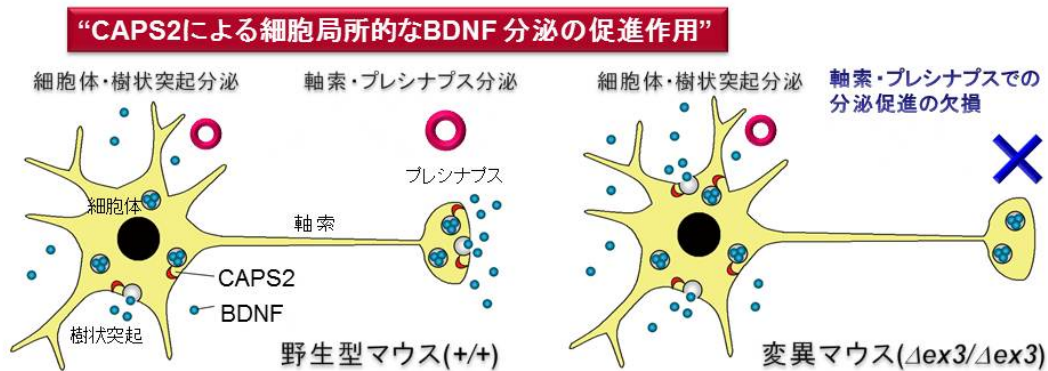


図6 遺伝子改変マウス ($\Delta ex3/\Delta ex3$) は新奇環境への適応力が低下し、不安が亢進する



CAPS2-dex3は軸索やプレシナプスにはほとんど分布しない
 このため、変異マウス(Δex3/Δex3)では、軸索やプレシナプスにおけるBDNF分泌促進作用を失う

今回の研究によって示唆される事

CAPS2-dex3を多く発現するニューロンでは、局所的なBDNF分泌制御が破たん

シナプス・神経回路の発達や機能の異常

発達障害・自閉症の発症リスクが高まる

今後の展望や期待

変異マウス利用 → 発症機序、行動障害などのメカニズムの研究、診断や改善に関連する創薬につながる応用的研究の加速

図 7 CAPS2 が自閉症に関連するモデルおよび今回作製した変異マウス (Δex3/Δex3) の利用：一部の自閉症患者では、CAPS2 のエクソン 3 を欠失する選択的スプライシングが異常に増加して、短い CAPS2 亜型の産生が増えたニューロンとなる。短い CAPS2 亜型自体の軸索での分布が著しく減少することから、軸索やプレシナプスからの分泌が殆ど起こらなくなる。例えば、BDNF の分泌促進が軸索やプレシナプスの局所で低下すると、神経回路の発達や機能が障害され、その結果、脳の発達障害の発症リスクが増大する。今回の変異マウス (Δex3/Δex3) を使用することにより、自閉症の発症や病態のメカニズムの解明、関連する創薬につながる応用研究の道が開けると期待される。

<了>