

42. 自閉症病態を見据えた新たなスパイン分子機構の解明

佐藤 真

大阪大学 大学院連合小児発達学研究所 こころの発達神経科学講座

Key words : 自閉症, 自閉スペクトラム症, 神経伝達, シナプス, スパイン

緒言

「コミュニケーションの障害」と「限局されたこだわりや反復」を特徴とする疾患群である自閉スペクトラム症 (ASD, autistic spectrum disorder) は、世界的に罹患率が急速に増加しているとされ、早急な対応が世界的課題として強く求められている¹⁾。

ASD (の少なくとも一部) では、双子での発症率が90%程度になるとの報告がなされ、遺伝的側面が発症に強く関わるとされる。原因として、Shank、Neurologin、Neurexin、CAPS2などの多くのシナプス関連分子 (図1) の遺伝子変異が報告されており、シナプスの機能が遺伝子の異常により損なわれた結果引き起こされるとも想定されている²⁾。事実、それら分子のノックアウトマウスの多くは、他のマウスと関連を持ちたがらない傾向を示す。

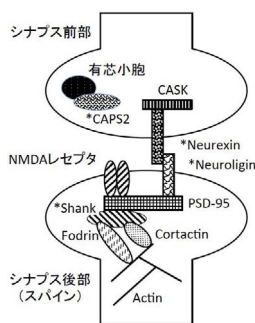


図1. シナプス部位で働く分子群

シナプス部位で働く自閉症関連分子 (*で示す)。

ASD研究とシナプスの分子機構研究は、相互に関連し進歩してきた。例えば、ASD原因遺伝子の一つである Shank は、特に後シナプス部位において、PSD-95等を介し、グルタミン酸受容体である NMDA 受容体に結合することは良く知られていたが、最近では、NMDA 受容体の刺激が、ASDモデルマウスである Shank ノックアウトマウスの ASD 様行動様式の改善につながる事が動物実験で示され、NMDA 受容体が新たな ASD の治療標的となる可能性を持つとして注目されている³⁾。

シナプスの場である棘 (スパイン) は、その小ささゆえに、生化学的アプローチが万能ではなく、現在でもスパイン内で働く分子の全貌は明らかとなっていない。他方、大脳皮質での発現動態が健常者と ASD 患者で大きく異なる遺伝子が網羅的に検索され、機能未知の遺伝子も含め多くの遺伝子の発現変化が報告されている⁴⁾。我々は、ASD とシナプス機能の深い関連性に着目し、この発現が大きく異なるとして同定された分子の幾つかは、スパインで働くのではないかと考えた。そして、そのような分子は、ASD の関連分子として病態解明や、ひいては治療標的に成り得るのではないかと考え、この仮説のもと本実験を計画し、実行した。

方法、結果および考察

我々は、ASD 患者脳と定型発達者の脳とで発現が大きく異なる分子の中で、機能未知である分子に対し検討を進めた。なお、本研究は現在論文投稿中であるため、(公開予定の) 本報告書では分子名は記載できない点をご了解いただきたい。

まず *in situ* hybridization 法および抗体を作製しての免疫細胞化学法により、脳内分布、細胞内局在を検討した。その結果、

- (1) この分子 mRNA は海馬錐体細胞、顆粒細胞に局在を認めた。
- (2) この分子に対する抗体を作製し、その局在を検討したところ、樹状突起スパインに局在を認めた。
そこで、マウス海馬錐体細胞を培養し、スパイン上に発現する受容体分子群への作用を検討した。その結果、
- (3) この分子が、NMDA 受容体のサブユニットの一つのシナプス膜上への発現制御に関わることを観察した。
本分子をノックダウンした結果、膜表面への NMDA 受容体 NR2A サブユニットの発現量が増加した (図 2)。

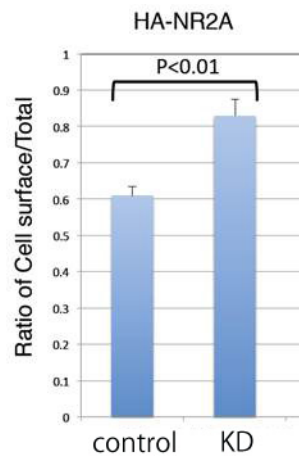


図 2. シナプス膜上での NMDA 受容体サブユニット (NR2A) への作用
シナプス膜上への NMDA 受容体局在に対する本分子の影響 (ノックダウン実験)。
エラーバーは S.E.M. *t* 検定。

このメカニズムを明らかとするため、スパインで働く分子との interaction を検討した。その結果、

(4) アクチン結合蛋白であるミオシン IIb に強く結合することを見出した。
ミオシン IIb は、いわゆる非筋肉型ミオシン II である。スパインにおいては、その形態や受容体の動態に影響することが既に報告されている^{5,6)}。

(5) スパインで働く Shank2 および Cortactin と (間接的か直接的かは未定であるが) interaction することを見出した。

これら分子は、ASD との関連が強く示唆されている分子である²⁾。さらに、
(6) Shank2 は NR2A/2B と interaction するが、その interaction は本分子が存在すると増強していた。

このため、本分子が新たな創薬ターゲットと成りうる可能性が考えられた。そこで、本分子のノックアウトマウスを作製し、その詳細を検討することとした。一方、活性調節の仕組みとしてのリン酸化による機能変化を検討したが、現在までのところ、幾つかのリン酸化変異分子 (リン酸化を受けないようにアミノ酸置換を行ったもの) では、上記機能に大きな変化は観察できていない。

また、脳内のみでのノックアウトマウスを作製するため、Emx1-Cre と掛け合わせ、
(7) 大脳皮質においてノックアウトされたコンディショナルノックアウトマウスを作製した。同時に、本分子の該当 locus に LacZ 遺伝子が組み込まれる形のマウスも作製した (このマウスに対しては Emx1-Cre マウスではなく、広く観察するため TNAP-Cre マウスと交配している)。

このため、LacZ 活性を基に、本分子の脳内発現を検討することが可能となった。脳内の発現を観察すると、均一ではなく局在性を持っていることが明らかとなった (図 3)。

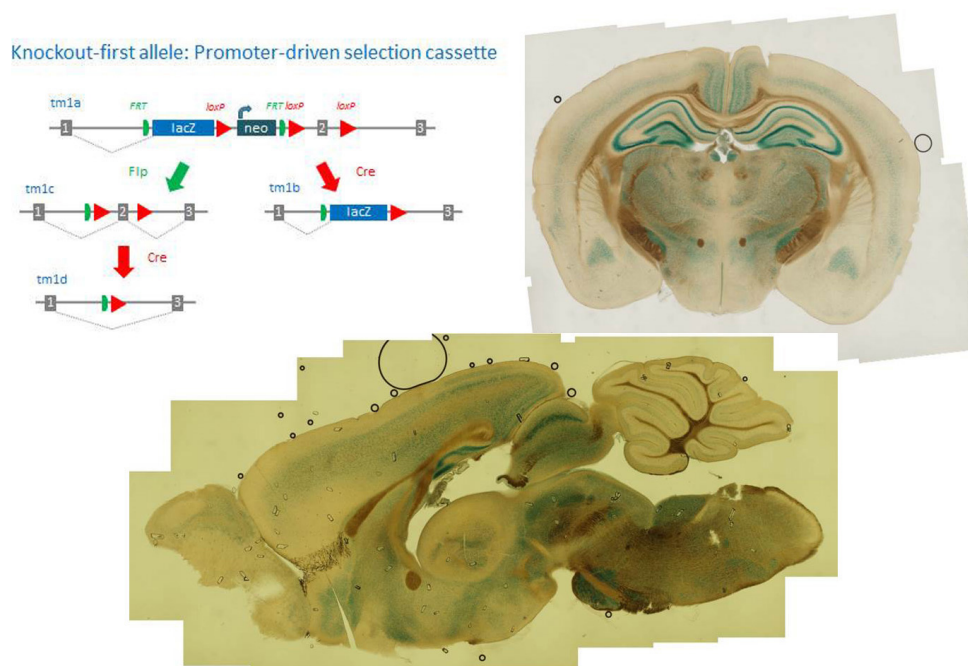


図3. ノックアウトマウスの作製と本分子の脳内発現様式

左：ノックアウトマウスの作製手順、右：LacZ 遺伝子発現で見た本分子の脳内発現様式。

(8) 本分子ノックアウトマウスについて行動解析を行った。

オスマウスに対して行動解析を行ったところ、現在までの結果では、open field test でノックアウトマウスではコントロールに比し、field 中央部分での滞在時間が極端に短かった。

以上のことより、本分子は NMDA 受容体のシナプス面への局在に関わり、重要な創薬ターゲットと成り得る可能性が考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、福井大学医学部の黒田一樹、大阪大学医学系研究科の岡雄一郎、猪口徳一、兵庫医科大学の八木秀司である。

文献

- 1) Weintraub K. The prevalence puzzle: Autism counts. *Nature*. 2011;479(7371):22-4. doi: 10.1038/479022a. PMID: 22051656.
- 2) Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*. 2011;14(3):285-93. doi: 10.1038/nn.2741. PMID: 21346746.
- 3) Won H, Lee HR, Gee HY, Mah W, Kim JI, Lee J, Ha S, Chung C, Jung ES, Cho YS, Park SG, Lee JS, Lee K, Kim D, Bae YC, Kaang BK, Lee MG, Kim E. Autistic-like social behaviour in Shank2-mutant mice improved by restoring NMDA receptor function. *Nature* 2012;486(7402):261-5. doi: 10.1038/nature11208. PMID: 22699620.
- 4) Voineagu I, Wang X, Johnston P, Lowe JK, Tian Y, Horvath S, Mill J, Cantor RM, Blencowe BJ, Geschwind DH. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology. *Nature*. 2011;474(7351):380-4. doi: 10.1038/nature10110. PMID:21614001.
- 5) Ryu J, Liu L, Wong TP, Wu DC, Burette A, Weinberg R, Wang YT, Sheng M. A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron*. 2006;49(2):175-82. PMID:16423692.
- 6) Rex CS, Gavin CF, Rubio MD, Kramar EA, Chen LY, Jia Y, Haganir RL, Muzyczka N, Gall CM, Miller CA, Lynch G, Rumbaugh G. Myosin IIb regulates actin dynamics during synaptic plasticity and memory formation. *Neuron*. 2010;67(4):603-17. doi: 10.1016/j.neuron.2010.07.016. PMID: 20797537.