

42. 自閉症モデルからコミュニケーションの形成機構に迫る

西山 正章

金沢大学 医薬保健研究域医学系 組織細胞学

Key words : 自閉スペクトラム症, CHD8, クロマチンリモデリング, オリゴデンドロサイト

緒言

自閉スペクトラム症 (ASD) は、社会的相互作用とコミュニケーションの障害、ならびに制限された反復的な行動によって特徴付けられる神経発達障害である。近年の ASD 患者を対象としたエクソーム解析で、シナプス機能、転写調節、またはクロマチンリモデリングに関連するタンパク質をコードする遺伝子の多くの変異が特定された [1]。これらの遺伝子の中で、クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 8 (CHD8) をコードする遺伝子は、ASD 患者において最も高頻度で変異している遺伝子座として報告された。この *CHD8* に変異を有する患者は、巨頭症、異なる顔貌、胃腸の異常、認知障害、不安などの特徴を示す [2]。 *CHD8* 変異が脳の発達と機能にどのように影響を与えるかを理解することは ASD の病態を解明するカギである。

CHD8 は ATP 依存性のクロマチンリモデリング因子として機能し、はじめは Wnt- β -カテニンシグナル伝達経路の負の調節因子として同定された。マウスにおいて *Chd8* のホモ接合性の欠失は胎生致死になるのに対し [3, 4]、ヘテロ接合性変異マウスは巨頭症、不安様行動の増加、社会行動の変化、認知障害などの ASD 様表現型を示す [5]。 *CHD8* はシナプス機能と神経発達に関連する ASD リスク遺伝子の発現を調節しており、神経前駆細胞または脳における *Chd8* 変異は、これらの遺伝子発現の調節異常を引き起こす [5]。しかし、 *Chd8* のヘテロ接合性変異が行動表現型に影響を与える責任細胞種については不明のままであった [6]。

方法および結果

1. オリゴデンドロサイト特異的 *Chd8* ヘテロ接合変異マウスは、髄鞘形成障害および神経伝導速度の低下を示す

オリゴデンドロサイト系列細胞における *CHD8* の役割を調べるために、我々は *Olig1* プロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現するマウス (*Olig1-Cre* マウス) と、Floxed *Chd8* 対立遺伝子のヘテロ接合マウス (*Chd8*^{+/-F} マウス) を交配することにより、 *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F} マウスを作製した。 *Chd8*^{+/-} マウスと同様に、 *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F} マウスは、脳梁において髄鞘が薄く、g-ratio が高かった (図 1A, B)。蛍光免疫染色により、Caspr の染色の長さは *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F} マウスとコントロールマウスで差がなかったが、Nav1.6 の染色の長さは *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F} マウスで長く、 *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F} マウスにおいてもランビエ絞輪が広がっていることが示された。さらに、コントロールマウスと比較して、 *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F} マウスの脳梁では、CAP 伝達の潜時が増加し、神経伝導速度が低下していた (図 1C, D)。さらに *Olig1-Cre* による *Chd8* の欠失が神経の特性に影響を与えるかどうかをさらに調べるために、コントロールおよび *Chd8* 変異 (*Chd8*^{+/-} および *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F}) マウスにおいて、社会的行動に関連すると考えられる内側前頭前野の脳皮質の 2/3 層の錐体ニューロンの電気生理学的解析を行った。自発興奮性 (sEPSC) または自発抑制性 (sIPSC) シナプス後電流の振幅も周波数も、コントロールと *Chd8*^{+/-} マウスまたは *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F} マウスの間で差がみられなかった。これらの結果から、内側前頭前野の錐体ニューロンの興奮性および抑制性のプレシナプスの入力とポストシナプスの特性が、 *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-F} マウスで正常であることが示唆され、 *Chd8* 変異によるオリゴデンドロサイトの自律的な異常が機能的に重要であることを強調した。

2. オリゴデンドロサイト特異的 *Chd8*ヘテロ接合体変異マウスは、*Chd8*^{+/-}マウスの異常な行動表現型を再現する

次にオリゴデンドロサイト系列細胞の CHD8 ハプロ不全が、*Chd8*^{+/-}マウスと *CHD8* 変異を有する ASD 患者の両方でみられる ASD 様行動表現型の主な原因になり得るかどうかを調べた。明暗選択箱試験を行い、不安様行動を評価した。不安は、*CHD8* 変異を含む ASD 患者でよくみられる症状の一つである。CHD8 ハプロ不全マウスを含む多くの ASD モデルマウスも不安様行動を示す。明暗選択箱試験では、*Chd8*^{+/-}マウス以外のコントロールマウスと比較して、*Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスでは明室の滞在時間が有意に減少していた (図 2A)。明室の中の移動距離は、*Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスで大幅に減少しており、不安様行動の増加を示した (図 2B)。さらに、*Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスでは、*Chd8*^{+/+}マウスおよび *Olig1-Cre/Chd8*^{+/+}マウスと比較して、明室と暗室の間の移行数が大幅に減少するか、もしくは減少する傾向にあった。これらの結果は、遺伝子型間の運動性の違いによるものではなく、オリゴデンドロサイトにおける CHD8 ハプロ不全が不安様行動の増加を引き起こすことを示唆した。

また、ASD の顕著な特徴である社会的相互作用の障害を評価するために行動テストを実施した。*Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスでは、マウス同士の接触回数は遺伝子型間で差がなかったのに対し、一回の接触あたりの接触時間は増加する傾向があり、総接触時間は大幅に増加していた (図 2C)。社会的相互作用テスト中の、遺伝子型間の運動性に違いは観察されなかった。また、社交性と社会的新奇性に対する嗜好を評価するために、三部屋式社会性行動試験を実施した。三部屋式社会性行動試験では、*Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスとコントロールマウスは、*Chd8*^{+/-}マウスと同様に、新奇マウス (Stranger 1) に対して有意な嗜好性を示した。一方で、社会的新奇性に対する嗜好試験では、コントロール (*Chd8*^{+/+}および *Chd8*^{+/-}) マウスは、見知ったマウス (Stranger 1) よりも新奇マウス (Stranger 2) への有意な嗜好性を示したが、*Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスは新奇マウスへの嗜好性を示さなかった。したがって、*Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスは、社交性ではなく、社会的新奇性に対する嗜好に軽度の障害を示した。まとめると、これらの結果は、*Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスが *Chd8*^{+/-}マウスの行動表現型の一部を再現することを示唆した。

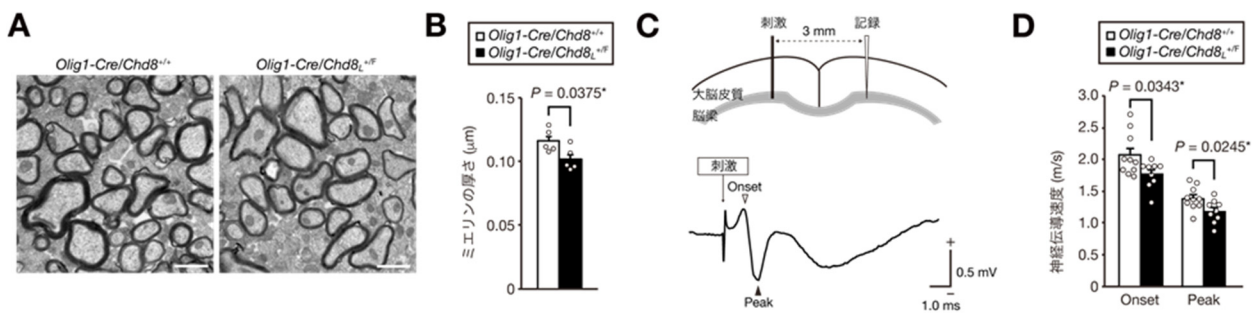


図 1. オリゴデンドロサイト特異的 *Chd8*ヘテロ接合体変異マウスは、髄鞘形成障害と活動電位伝達の低下を示す。

A) 9週齢の *Olig1-Cre/Chd8*^{+/+}および *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-}マウスの脳梁の電子顕微鏡画像。スケールバー：1 μm。

B) A) の画像と同様の画像からそれぞれ決定された髄鞘の厚さ (n=5、各遺伝子型について合計 450 の軸索を調べた)。

*P < 0.05 (unpaired Student's t test)

C) 脳梁の刺激および記録電極の配置、および CAP 記録の代表的なトレース。刺激と「Onset」または「Peak」との間の潜時を測定した。

D) 成体 *Olig1-Cre/Chd8*^{+/+} (n=10) および *Olig1-Cre/Chd8*^{+/-} (n=9) マウスの脳梁における CAP の潜時と伝導速度。

データは平均±SEM で示す (B、D)。*P < 0.05 (unpaired Student's t test)。

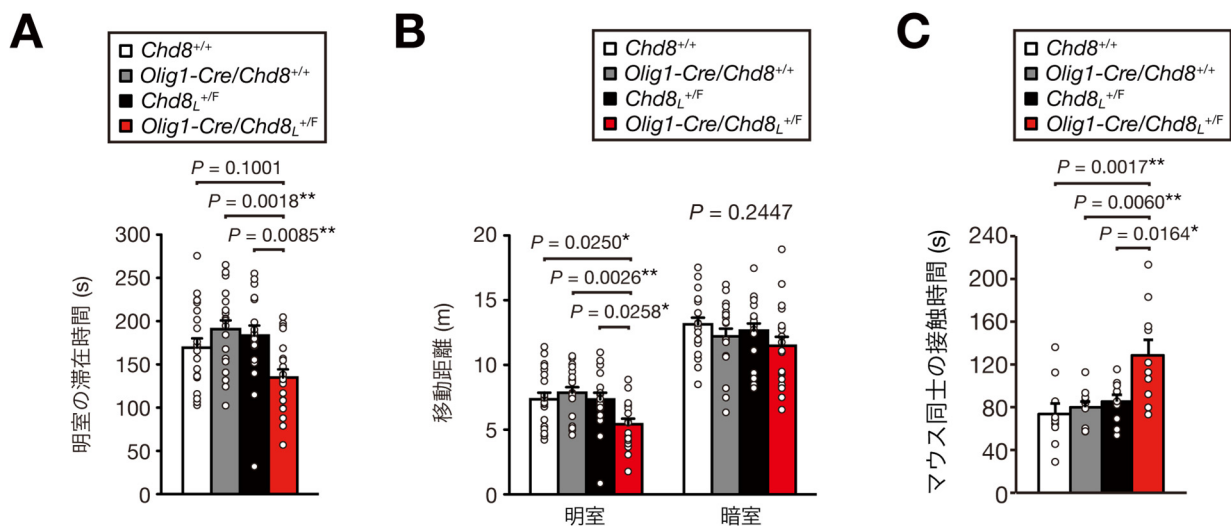


図2. オリゴデンドロサイト特異的*Chd8*ヘテロ接合体変異マウスは、不安様行動の増加と社会的行動の障害を示す。
 A、B) 明暗選択箱試験のマウスにおける10~14週齢の雄マウスの明室での滞在時間 (A)、明室と暗室での総移動距離 (B) (n=20)。
 C) 社会的相互作用試験におけるマウス同士の総接触時間 (n=10)。
 データは平均±SEMで示す。*P<0.05、**P<0.01 (one-way ANOVA with Tukey's post hoc analysis)。

考 察

オリゴデンドロサイトによる髄鞘形成は、神経発達中の適切な接続に必要であり、白質の発達と成熟は運動能力や認知機能の増加と相関する。髄鞘形成異常は、磁気共鳴画像法または死後脳解析から、一部のASD患者で検出されており [7]、一部のASDマウスモデルもオリゴデンドロサイト特異的遺伝子発現の減少および髄鞘形成異常を示すことが明らかになっている [8]。しかし、これらの異常が神経の異常の二次的な影響なのか、それとも少なくともいくつかのケースではASDの一次的な原因であるのかは不明のままであった。マウスの社会的孤立は、前頭前野の髄鞘形成に影響を与え、社交性と作業記憶の変化につながるが示されている [9]。さらに最近の報告では、髄鞘関連タンパク質PLP1を欠損したマウスは、軽度の髄鞘形成異常と不安様行動の増加および新しい社会的な匂いに対する過剰な反応を示すことが分かっており [10]、軽度の髄鞘異常が行動変化の主な原因になり得る可能性があることを示唆している。我々の結果はまた、ASD患者の髄鞘形成異常がいくつかのASD症状の一因となり得るという考えを支持している。

共同研究者

本研究は、九州大学生体防御医学研究所の中山敬一主幹教授らと共同で行ったものである。

文 献

- 1) Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Sep;16(9):551-63. PMID: 26289574 DOI: 10.1038/nrn3992
- 2) Bernier R, Golzio C, Xiong B, Stessman HA, Coe BP, Penn O, Witherspoon K, Gerdtts J, Baker C, Vulto-van Silfhout AT et al. Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell.* 2014 Jul 17;158(2):263-276. PMID: 24998929 DOI: 10.1016/j.cell.2014.06.017

- 3) Nishiyama M, Oshikawa K, Tsukada Y, Nakagawa T, Iemura S, Natsume T, Fan Y, Kikuchi A, Skoultschi AI, Nakayama KI. CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat Cell Biol.* 2009 Feb;11(2):172-82. PMID: 19151705 DOI: 10.1038/ncb1831
- 4) Nishiyama M, Nakayama K, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Kikuchi A, Nakayama KI. Early embryonic death in mice lacking the beta-catenin-binding protein Duplin. *Mol Cell Biol.* 2004 Oct;24(19):8386-94. PMID: 15367660 DOI: 10.1128/MCB.24.19.8386-8394.2004
- 5) Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Ohkawa Y, Kawamura A, Sato T, Suyama M, Takumi T, Miyakawa T, Nakayama KI. CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature.* 2016 Sep 29;537(7622):675-679. PMID: 27602517 DOI: 10.1038/nature19357
- 6) Kawamura A, Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Tokuoka K, Ueta Y, Miyata M, Isa T, Miyakawa T, Hayashi-Takagi A, Nakayama KI. Oligodendrocyte dysfunction due to Chd8 mutation gives rise to behavioral deficits in mice. *Hum Mol Genet.* 2020 May 28;29(8):1274-1291. PMID: 32142125 DOI: 10.1093/hmg/ddaa036
- 7) Zikopoulos B, Barbas H. Changes in prefrontal axons may disrupt the network in autism. *J Neurosci.* 2010 Nov 3;30(44):14595-609. PMID: 21048117 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2257-10.2010
- 8) Pacey LK, Xuan IC, Guan S, Sussman D, Henkelman RM, Chen Y, Thomsen C, Hampson DR. Delayed myelination in a mouse model of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet.* 2013 Oct 1;22(19):3920-30. PMID: 23740941 DOI: 10.1093/hmg/ddt246
- 9) Makinodan M, Rosen KM, Ito S, Corfas G. A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science.* 2012 Sep 14;337(6100):1357-60. PMID: 22984073 DOI: 10.1126/science.1220845
- 10) Gould EA, Busquet N, Shepherd D, Dietz RM, Herson PS, Simoes de Souza FM, Li A, George NM, Restrepo D, Macklin WB. Mild myelin disruption elicits early alteration in behavior and proliferation in the subventricular zone. *Elife.* 2018 Feb 13;7:e34783. PMID: 29436368 DOI: 10.7554/eLife.34783