

氏名	小島 華林
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 461 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	自閉性障害の分子病態の解明
論文審査委員	(委員長) 教授 川上 潔 (委員) 教授 簗田 清次 教授 國田 智 講師 須田 史郎 講師 鈴木 隆浩

論文内容の要旨

1 研究目的

自閉性障害 (autistic spectrum disorders: ASD) の病因遺伝子はシナプス結合や機能に関する遺伝子が多く報告され、主要病態はシナプス形成・機能不全と考えられるが分子病態は不明である。これまで小児科学では、ASD 患者から、接着タンパク *CADM1* をはじめとして、G タンパク質共役受容体の *GPR37*、*GPR85* に点変異を検出し、各遺伝子機能と ASD への関与を解析してきた。これまで国内外において、ASD 病因候補遺伝子は数十種類報告されているが、一種の候補遺伝子の疾患全体数に占める割合は、数パーセント以下と少ない。治療法の開発には、これらの候補遺伝子に共通する分子機構および治療標的分子を同定する必要がある。申請者らは、ASD 発症に共通する分子機構の一つが遺伝子変異産物により誘導される小胞体ストレスであるという仮説をたてた。

CADM1 機能についての解析で、*Cadm1* ノックアウトマウスは攻撃性・不安性行動が増加したが、ASD に特徴的な常同行動などが見られず (Takayanagi et al, BBRC 2010)、ASD 発症に他の要因の関与も推定されること、またマウス初代培養神経細胞への *CADM1* 遺伝子変異導入実験では、*CADM1* 変異蛋白質が小胞体ストレスを誘導したことが報告されている (Fujita et al, Cell Death Dis. 2010)。以上から、ASD 発症には *CADM1* 欠損による機能喪失 (Loss of function) だけでなく、遺伝子変異産物により誘導される機能障害 (Gain of function) の存在が考えられた。

この仮説を検証するため、ヒト神経細胞の代用としてヒトリンパ芽球を用いて *CADM1* と、申請者が新たに同定した *SCTR* の変異を持つ患者家系試料における小胞体ストレス感受性について解析した。また、*Cadm1* (Y251S) 変異ノックイン (KI) マウスを用い、マウス個体における *Cadm1* 変異が及ぼす影響を解析した。

2 研究方法

(1) ASD 病因遺伝子変異家系リンパ芽球を用いた小胞体ストレスについての解析

CADM1 (Y251S)、*CADM1* (H246N)、*SCTR* (P90L) 遺伝子変異を保有する ASD 患者を含む家系 (白人および日本人) のリンパ芽球に、小胞体ストレス誘導試薬 (ツニカマイシン: TM) $1 \mu\text{g/ml}$ を添加し、または添加せずに、一定時間反応後に細胞を回収して mRNA を抽出し、cDNA を合成

した。プローブは小胞体ストレスマーカー *CHOP* (*C/EBP homologous protein*)、コントロールプローブは *GAPD* を用い、リアルタイム PCR 定量で、*CHOP* mRNA 発現量の変化を観察した。また、*XBPI* mRNA が小胞体ストレス下でスプライシングされることを利用し、*XBPI* mRNA スプライシング産物 (*sXBPI* mRNA) の変化を RT-PCR 法で観察した。さらに、小胞体ストレス蛋白質 GRP78/BiP の発現変化を Western blotting で観察した。

(2) *Cadm1*(Y251S) 変異 KI マウスの解析

行動解析には、129/sv 系統の *Cadm1* (Y251S)KI マウスを、C57BL/6J マウスの遺伝背景になるように 8 回のコンジェニック化を行ったマウスを用い、*Cadm1*(Y251S)KI 雄マウス(野生型、ヘテロ・ホモ)の社会性行動・歩行機能を解析した。脳組織における解析には、129/sv 系統マウスの野生型および *Cadm1*(Y251S)変異 KI マウス(雄マウス)を解析した。生後 10 日マウス小脳で、シナプスマーカー(vGluT1、vGAT、GABBR2 など)による免疫蛍光染色法及び Western blotting による解析を行った。

3 研究成果

(1) ASD 病因遺伝子変異家系リンパ芽球を用いた小胞体ストレスについての解析

ヘテロに *CADMI* (Y251S、H246N)変異をもつ ASD 患者家系リンパ芽球に、小胞体ストレス試薬 TM 非添加または添加下で、小胞体ストレスマーカーである *CHOP* mRNA 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、TM 非添加の場合、*CADMI* 変異を持つ者から単離したリンパ芽球は、持たない者から単離したリンパ芽球に比べて *CHOP* mRNA 発現が高かった。TM 添加により変異の違いを見やすくした解析では、*CADMI* および *SCTR* 変異を持つ者から単離したリンパ芽球は持たない者から単離したリンパ芽球と比較し、*CHOP* mRNA 上昇のピークが早期に出現し、*sXBPI* mRNA、GRP78/BiP 蛋白質の発現量も小胞体ストレス下による変動を示した。また、*SCTR*(P90L) 遺伝子変異を保有する患者家系リンパ芽球でも、同様に変異を持つ者から単離したリンパ芽球は小胞体ストレス感受性が高かった。

(2) *Cadm1*(Y251S) 変異 KI マウス解析

Cadm1(Y251S) 変異 KI マウスで、ASD 症状と関連する常同行動(repetitive jumping)が観察された。社会性行動の解析では、*Cadm1*(Y251S)KI マウスでも WT に比べ、ヘテロ・ホモともに社会性が低かった。歩行機能は KO マウスでは異常が観察されたが、*Cadm1*(Y251S)KI マウスは異常なかった。また、*Cadm1*(Y251S)KI マウス(ホモ)と野生型マウス小脳(生後 10 日)の組織蛍光免疫染色結果では、両者にシナプスマーカー Synaptophysin と興奮性シナプスマーカー vGluT1 の発現の差はなかったが、抑制性シナプスマーカー vGAT と GABBR2 の発現は KI マウスで増加していた。生後 10 日の小脳の Western blotting 解析でも、同様に KI マウスで GABBR2 の発現が増加していた。

4 考察

(1) ASD 病因遺伝子変異と小胞体ストレスについての解析

ヒトリンパ芽球における変異の有無による小胞体ストレス感受性の違いが示され、内因性の ASD 病因遺伝子変異が小胞体ストレスを誘起することが明らかになった。リンパ球と脳組

織における遺伝子発現の相同性の高さ、マウス神経細胞を用いた *CADMI* 変異導入蛋白質による小胞体ストレス誘導と合わせ、リンパ芽球における小胞体ストレス感受性の違いがヒト脳神経細胞における小胞体ストレス感受性を反映する可能性が示唆される。

また、ASD 患者から遺伝子変異が同定された *SCTR* (P90L) 変異をもつ家系内においても、変異を持つものから単離したリンパ芽球の小胞体ストレス感受性が高かったことから、ASD 共通分子病態として小胞体ストレスが関与すると推察される。

(2) *Cadm1*(Y251S) 変異 KI マウスの解析

Cadm1(Y251S)KI マウスが常同行動を呈したこと、社会性行動解析にて障害がみられたことから、*Cadm1*(Y251S)KI マウスは ASD モデルマウスであると考えられる。*Cadm1*(Y251S)KI マウス(小脳)生後 10 日目において、抑制性シナプスマーカーである vGAT と GABBR2 の発現が増加していたことから、抑制性シナプス・興奮性シナプスのインバランスが ASD 発症に関わっている可能性が示唆された。

5 結論

ASD 病因遺伝子である *CADMI* 遺伝子変異及び *SCTR* 遺伝子変異を保有するヒト細胞において小胞体ストレス感受性が高まっていることを示した。

Cadm1(Y251S)KI マウスの行動解析により、社会性行動の異常など ASD モデルマウスの特徴を見出した。常同行動は *Cadm1*(Y251S)KI マウスに特徴的であった。さらに、生後 10 日の *Cadm1*(Y251S)KI マウスの小脳において興奮性・抑制性シナプスバランスが抑制性に傾いていることを見出した。

上記から、ASD 共通分子機構には、遺伝子変異によるシナプス蛋白の機能喪失(Loss of function)に加え、変異遺伝子産物により惹起される小胞体ストレスが誘導する細胞機能障害(Gain of function)の関与が示唆される。

論文審査の結果の要旨

本論文は「自閉性障害の分子病態の解明」をテーマに、自閉性障害の原因遺伝子変異を有する患者由来の細胞や、変異を導入したノックインマウス個体を解析したものである。申請者の仮説は、「自閉性障害には小胞体ストレスがその共通基盤になっていることと、原因遺伝子の変異はその機能喪失よりも細胞機能障害の関与がより本質的である」の 2 点である。

神経細胞の代替としての患者由来のリンパ芽球を用いて、*CADMI* および *SCTR* の変異が小胞体ストレスを引き起こす事を示し、*CADMI* 変異ノックインマウスの行動解析にて ASD モデルマウスとしての表現型が表れる事が示された。これらの実験結果は、申請者らの仮説を強く支持するものであり、「自閉性障害の分子病態」の理解を前進させ、今後の自閉症の研究方向を示すものとして評価できる。

本論文は、細胞を用いた生化学的な解析、マウス個体を用いた行動解析、脳組織の組織学的解析と、多岐にわたる実験手法をとりいれ、各々の実験結果を総合して、上記仮説の証明を試みたものである。現代の医学研究は、旧来行なわれてきた学問分野毎の研究ではもはや

不十分であり、申請者が行なった如く多面多岐にわたる解析が求められる。こうした意味で、本論文は博士の学位を授与するに相応しい内容を包含するものとして高く評価できる。一方、個々の実験データのなかには、経時的解析が不足するものや、統計上の処理が必ずしも適切と言えないものも含まれていた。これらの点は審査員の指摘に従って適切に改訂がなされた。

以上のことから、本申請論文は学位論文として合格であると判断された。

最終試験の結果の要旨

申請者の発表は論理的で、適切な問題設定とそれに対する実験結果と考察がなされた。実験は自ら遂行したと判断され、実験データの解釈やその限界についても適切に述べられた。実験の解釈に必要な周辺知識について十分な素養があり、実験に関する深い考察もなされている。従って、今後独立して研究を遂行するに足る能力を十分に備えている事が窺い知れた。

審査員からは実験操作に関わる質問や、データの解釈に関わる質問、また、本研究の仮説に対する質問など、多岐にわたる範囲から質疑応答がなされた。いずれの質問に対しても、その意図を正しく理解し、答えのある質問については正しく、また、必ずしも答えがあるとは限らない質問に対しては、現状での予想や解決への方向性等が適切に述べられた。

以上のことから、申請者は博士の学位に相応しい研究能力と科学に対する真摯な姿勢を有することが明らかとなり、合格と判断された。