

## 分泌異常型自閉症の発症メカニズムの解明

定方哲史

群馬大学 テニュアトラック普及推進室

### 【研究の背景】

自閉症は、三歳頃までに診断される発達障害で、“対人関係やコミュニケーション能力の障害”、“興味の限局と反復的で常同的な行動”を特徴とする。一卵性双生児で両方が自閉症を発症する一致率は高く(70-90%)、自閉症には遺伝素因が深く関わっていると考えられている。

Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion (CAPS, CADPS) タンパク質はペプチド性の神経伝達物質を含有する有芯小胞に細胞質側から会合し、その分泌を制御していることが知られている。自閉症患者の協力を得て解析を行った結果、一部の患者では CAPS2 の exon 3 のみがスキップする異常なスプライシングが起きていることが明らかになった。

exon 3 がスキップした CAPS2 タンパク質は軸索終末部に輸送されないことも明らかになり、exon 3 スキップ型の CAPS2 を発現する特定の自閉症患者においては、脳由来神経栄養因子 (BDNF) が健常者と異なったパターンで分泌されるために、神経ネットワークの形成に異常をきたす可能性が示唆された (*J. Clin. Invest.*, 2007)。

私はこの仮説を証明すべく、exon 3 がスキップした CAPS2 タンパク質のみを発現する遺伝子改変マウスを作製した。このマウスは社会性行動の異常、母性行動の低下、新奇環境への適応力の低下といった様々な自閉症様形質を示した (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; *PLoS One*, 2014)。

### 【目 的】

私は分泌調節因子である遺伝子 CAPS2 の mRNA に関して、一部の自閉症患者で exon 3 がスキップしていること、CAPS2 exon 3 スキップマウスが自閉症様の様々な形質を示すことを明らかにしてきた。今回、CAPS2 の exon 3 スキップが脳内で何をもたらし、自閉症様形質の原因となるのかを明らかにすることを目的とした。

### 【方 法】

本研究課題では、自閉症様行動形質を示す CAPS2 exon 3 スキップマウスに関して、脳内における分泌異常を生化学・細胞生物学・解剖学的解析によって解析する。具体的には以下の研究計画・方法を遂行する。

- 1) CAPS2 タンパク質に対する抗体を用いることで CAPS2 会合小胞を精製し、質量分析により内包される分泌タンパク質を同定する。
- 2) 以前の研究で同定された候補分子の 1 つである脳由来神経栄養因子 (BDNF) の分泌量を、モデルマウスから調製した大脳初代培養上清の ELISA 法によって詳細に測定する。
- 3) 近年自閉症の治療薬として注目されているオキシトシンの分泌量を、モデルマウスから調製した脳下垂体の初代培養を用いて、詳細に解析する。
- 4) 自閉症モデルマウスから調製した大脳・海馬初代培養において、蛍光有芯小胞マーカーを用い、その動態の変化を非刺激時・刺激時において測定する。
- 5) GeneChip を用い、CAPS2 KO マウスにて発現変動をしている遺伝子を同定し、自閉症様形質の発現への関与を解析する。

## 【結 果】

CAPS2 会合小胞に内包されるタンパク質の同定を試みた。その結果、NT-3、chromogranin A、chromogranin B、secretogranin II といったタンパク質が同定された。現在、CAPS2 に依存したこれらの分泌が自閉症様形質の発現にどのように関連しているのかについて解析を行っている。

CAPS2 exon 3 スキップマウスから調製した大脳初代培養から分泌される BDNF 量は、長期培養において、野生型から調製されたものに比べて有意に減少していることが明らかとなった。刺激依存型の分泌については検出限界以下であったため、検出はできなかった。

脳下垂体の初代培養からのオキシトシン分泌量の測定を試みた。野生型からの分泌量も検出限界以下となっており、現在、調整法のさらなる改善を検討している。

自閉症モデルマウスから調製した海馬初代培養において、BDNF-GFP を発現させ、刺激時の分泌パターンを測定した。その結果、刺激時に軸索から分泌される BDNF 量は、CAPS2 exon 3 スキップマウスからの初代培養において野生型より減少していた。興味深いことに、刺激時に樹状突起から分泌される BDNF 量は、その逆の傾向を示した (CAPS2 exon 3 スキップマウスからの初代培養において野生型より増加していた)。

GeneChip を用い、CAPS2 KO マウスにおいて有意に発現量が変化している遺伝子の探索を行った。その結果、分泌関連遺伝子 (*Stx5a*, *Syt6*)、分泌タンパク質をコードする遺伝子 (*Fgf2*, *Fgf4*, *Edn2*)、シナプス関連遺伝子 (*Grin2b*, *Gabbr1*)、神経栄養因子のシグナリングに関連している遺伝子 (*Sos1*, *Shc1*, *Traf6*, *Psen2*)、レット障害の原因遺伝子 (*Mecp2*) が有意に変化していた。

## 【考 察】

今回の結果により、神経細胞からの BDNF 分泌パターン (樹状突起 vs 軸索) が *in vivo* においても変化していることが明らかになった。BDNF の分泌パターンは神経ネットワークの形成に重要であるため、この異常が自閉症で見られる神経ネットワーク形成異常の一因である可能性が示唆された。

BDNF 以外にも、質量分析は GeneChip により、様々な分泌タンパク質が CAPS2 の exon 3 スキップにより影響を受けていることが明らかになった。今後、これらの分泌タンパク質と自閉症様形質の影響を、conditional KO マウスの作製などにより明らかにしていきたい。

今回 CAPS2 KO マウスにおいて発現変化が見られた遺伝子の中で *Grin2b*, *Gabbr1* は興奮・抑制バランスに関与する遺伝子である。自閉症においては、ニューロンの興奮・抑制バランスの異常を原因とする説もあるため、これらの遺伝子発現異常がどのように自閉症様形質の発現に関与しているのかについて、今後検討したい。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

今回、モデルマウスを用い、自閉症様形質の発現の解明を行った。特にこれまで関連が指摘されていなかった分泌タンパク質が新しく同定されたことは意義深いものであった。今後、これらの分泌タンパク質の異常が脳の発達にどのように影響を与え、自閉症様形質の発現にどのように関与しているのかについて明らかにしていきたい。

## 【参考・引用文献】

Analysis of gene expression in Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 2 (*Cadps2*) knockout cerebellum using GeneChip and KEGG pathways. Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Yasuki Ishizaki, Teiichi Furuichi. *Neuroscience Letters*. 639, p88-93 (2017).