

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461531

研究課題名(和文)日本人自閉症の全ゲノムコピー数多型を用いた疾患感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文)Comprehensive analysis for copy number variant in the whole genome of Japanese patients with autism spectrum disorder

研究代表者

佐藤 大介 (Sato, Daisuke)

北海道大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：60516681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症の脳機能障害機構の解明を目的に自閉症スペクトラムを呈する患者の網羅的遺伝子解析を試み、一部から特定の染色体に存在する遺伝子異常の可能性を見出した。しかしながら、多くの患者では有意な異常をみださず、病態の理解にはむしろ自閉症になることが明らかな遺伝子異常を有する複数の疾患の脳機能を解析し、共通する機能障害をみだすことが近道となりうると発想を転換した。代表的な遺伝性自閉症スペクトラムであるUBE3A機能欠失のモデルマウスを用いて、脳の特定の領域において抑制機能が特異的に減少していることを見出した。脳領域間の抑制機能のアンバランスが自閉症の原因の一つである可能性を提唱することができた。

研究成果の概要(英文)：Initially, I have tried to find genetic abnormality in autism spectrum disorders by comprehensive analyses for whole genome. Although I have successively found a gene abnormality in the specific chromosome in some patients, the majority of patients did not show any specific abnormality in my gene sequence. For deeper understanding of the mechanisms of autism, I next analyzed electrophysiological functions in a model mouse of genetically confirmed autism spectrum disorder, UBE3A deficit mouse. I have illustrated that tonic inhibitory function is specifically decreased in the cortex or hippocampus, but not the thalamus in UBE3A deficit mouse. Because similar decrements have been recently shown in other autism models, the deficiency of tonic inhibition might be a common pathophysiology of autism spectrum disorders. On the others, my finding which shows the imbalance of inhibition among brain region can provoke a novel hypothesis for the mechanism in autism spectrum disorder.

研究分野：小児神経学

キーワード：自閉症

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害は、「対人関係障害」、「コミュニケーション障害」、「常同的・反復的な行動、関心、活動」といった特徴をもつ発達障害である。現在はアスペルガー症候群等を含む自閉症スペクトラム障害として知られ、小児約 68 人に 1 人の割合で発症し増加傾向である。また多くに、認知機能障害、てんかんなどの合併症も存在し、そのメカニズムは多くが不明である。

自閉症は遺伝的要因が強く、責任遺伝子解明が北米を中心にマイクロアレイで行われ、病因の一端が同定されつつあるが、報告された遺伝子の変異は多岐にわたり、多くの患者では発症機構は不明である。アレイでは従来の染色体検査では同定できなかった微小染色体構造異常であるコピー数多型 (CNV) が検出可能となった。CNV が遺伝子や遺伝子発現領域を含むことがあり、自閉症感受性に関与すると考えられている。北米ではアレイ CNV 解析による自閉症遺伝研究が盛んであるが日本ではほとんど行われていない。

自閉症関連遺伝子が多く同定されるようになった一方、これらの遺伝子異常がどのように自閉症患者の脳機能障害につながるかについても多くが未解明である。脳機能障害の解明は治療に直結するため、近年遺伝子編集技術の発展と共に、自閉症患者の遺伝子異常をマウスで再現させることが可能となり、遺伝子レベルのみならず、脳神経生理のレベルでも自閉症病態生理の解明が求められてきている。

2. 研究の目的

(1) 日本人の自閉症患者遺伝子を網羅的にマイクロアレイにて解析し、自閉症関連遺伝子を検索する。

(2) 自閉症スペクトラムを示す代表的な遺伝子異常症のモデルマウスを作成し、脳機能障害の生理学的メカニズムを探索する。これらをあわせて、自閉症メカニズムを遺伝的レベルから生理学的レベルまで網羅的に解析することで、そのアウトラインを提示することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 自閉症患者の遺伝子検索

(1) - 1 自閉症スペクトラム障害の遺伝解析するサンプル収集および臨床症状入手
北海道大学病院およびその関連病院で自閉症スペクトラム障害のサンプルを収集していく計画とした。

(1) - 2 サンプルの解析

収集したサンプルから DNA を抽出し北海道大学医学部小児科に集積、その後、高解像度マイクロアレイで全ゲノム網羅解析スクリーニングを行なった。特にシナプスに発現する遺伝子のエクソン欠失や重複を伴い遺伝子機能に影響を及ぼすような CNV を検出し、興味深い CNV が検出されたら、他の qPCR 法や

FISH (fluorescence in situ hybridization) 法を用いて同 CNV の存在を確認する計画とした。その CNV の健常人頻度をデータベースで調べ正常多型でないと考えられたら、その CNV が影響を与えている遺伝子の機能、脳での発現、家系内罹患者、非罹患者の比較、de novo 変異かどうかの選別を行い、その CNV が影響を及ぼし遺伝子の変異が病的であると推定されればその遺伝子を自閉症感受性候補遺伝子と考え他の自閉症スペクトラム障害サンプルを用いてエクソン及びエクソン近傍イントロンをサンガーシーケンシング法により遺伝子変異解析を行う計画とした。

(2) 疾患モデルマウスをもちいた自閉症における脳機能障害メカニズムの解明

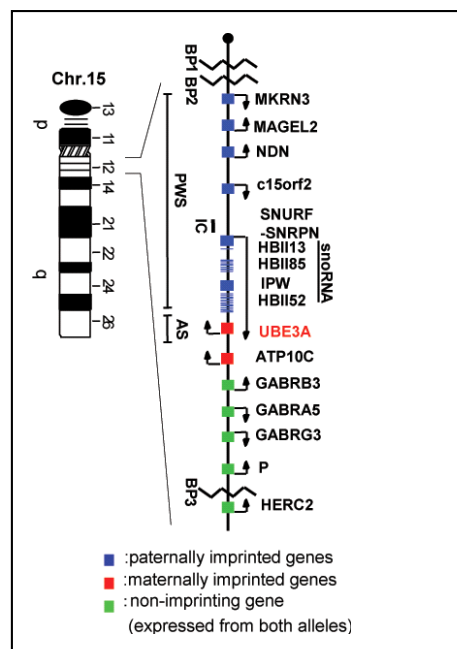


図 1: 検討にもちいた自閉症スペクトラム障害の遺伝子マップ

自閉症スペクトラム障害を示す代表的な単一遺伝子異常である、UBE3A 機能欠失マウス (母性発現遺伝子 UBE3A を母由来でノックアウトしたもの。アンジェルマン症候群モデルマウス: 遺伝子マップは図 1 を参照) を入手し、研究協力者である北海道大学医学部小児科助教である江川潔と共に電気生理学的機能解析をおこなった。

多岐にわたる機能障害の中で、認知機能障害およびてんかんに焦点をあて、ボルテージクランプによるパッチクランプ法を用いて特に GABA 抑制系に関する神経生理学的解析をおこなった。具体的には、生後 3 週齢のマウスから、急性脳スライスを作成し、人工脳脊髄液を還流したチャンパーに移し、微分干渉位相差顕微鏡下で神経細胞を確認後、ガラス電極をもちいてホールセルパッチクランプを電位固定化で行った。人工脳脊髄液には

あらかじめグルタミン酸受容体および GABA 受容体の競合的拮抗剤を加えており、伝達物質により惹起される電流としては GABA 受容体由来のもののみを観察できる状態とした。この条件下で、GABA 受容体により惹起されるシナプス性あるいは非シナプス性（持続性）電流を記録し、UBE3A 機能欠失マウスおよび対象コントロールマウスにおける視床および海馬における抑制機能を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 自閉症患者の遺伝子検索

今回の解析において、精神遅滞を伴う患児で一例、16 番染色体の 16q22.1-16q23.1 領域の部分欠失をマイクロアレイで検出した。この欠失は正常表現型の両親、同胞にはなく、de novo（新生）の変異と考えられたため、自閉症発症に關与する可能性が高いと考えられた。もう一例、発達遅滞を伴う症例においてマイクロアレイで 16 番染色体上の 16p13.12 の 0.8Mb の重複を認めた発達遅滞を伴う症例も検出することができた。しかしながら、解析を行った患者の大半では、病因につながると考えられるコピー数多型異常を検出することはできなかった。この結果は、自閉症の発症には遺伝的要因が強いと言われながら、実際には環境要因等、多数の複雑な要因が発症にかかわり、現在の遺伝学的手法のみではそのメカニズムの解明が難しいことを示唆するものといえた。

(2) 自閉症モデルを用いた自閉症スペクトラムの神経生理学的病態解明

そこで発想を転換し、遺伝的背景は様々であるにもかかわらず、自閉症の表現型は比較的単一であることに注目し、複数の遺伝的機序が明瞭な自閉症スペクトラムモデルについて、その病態生理を横断的に解析し、共通のメカニズムを発見することで自閉症の原因究明に迫ることができるのではないかと考え自閉症スペクトラム障害モデルをもちいた神経生理学的解析をおこなった。特に、近年 GABA 抑制系の機能不全が自閉症発症のメカニズムに強く関わっているとの仮説が提唱され、検証には GABA 抑制系に焦点をあてた。

認知機能に大きな役割をもつ海馬 CA1 錐体細胞において、まずシナプス性 GABA 抑制機能を検討した。

まず、シナプス性抑制についてシナプス前の伝達物質放出確率、シナプス伝達頻度、シナプス後細胞の受容体機能について網羅的に検討をおこない、この自閉症モデルではシナプス性抑制については異常がないことが判明した。(図 2)

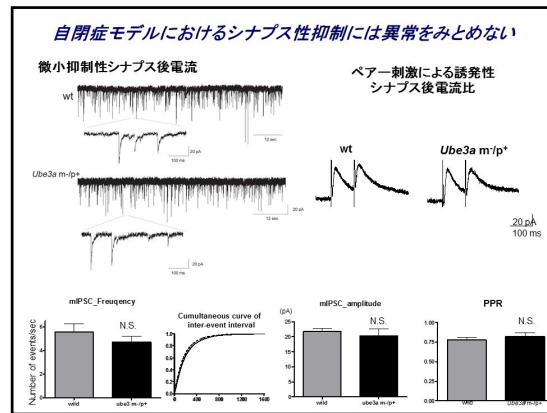


図 2: 自閉症スペクトラム障害、UBE3A 機能欠失のモデルマウスでは抑制性シナプス後電流に変化をみとめない

また、ニューロンの発火特性にも異常をみとめず(図 3)、図 1 の結果と合わせて、抑制性シナプス伝達には異常がないことがあきらかになった。

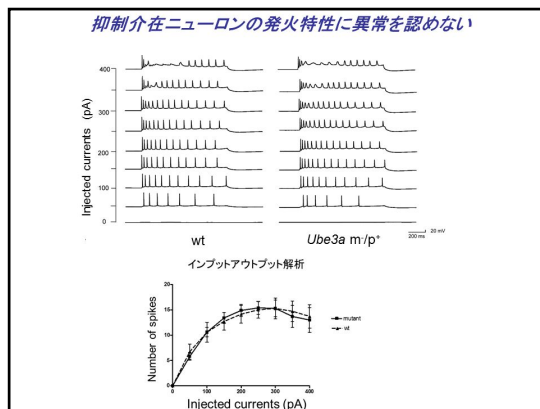


図 3: 自閉症スペクトラム障害、UBE3A 機能欠失のモデルマウスではニューロンの発火特性に異常をみとめない

つぎに、シナプス外 GABA 受容体により惹起される GABA 持続電流について、GABA 受容体拮抗剤を投与する前後での電流値のベースライン変化を計測することで評価した。その結果、UBE3A 機能欠失では海馬 CA1 のシナプス外持続抑制が著明に減弱していることがあきらかとなった(図 4)。このような持続抑制の減弱は、近年他の自閉症スペクトラム障害モデル(レット症候群、脆弱 X 症候群など)においても報告されており、我々の結果は、自閉症スペクトラムに共通する病態生理である可能性を示唆するものとなった。

次に、海馬 CA1 錐体細胞で観察された GABA 持続抑制の減弱が、他の脳領域でも観察されるかを検討した。視床における視床皮質投射ニューロンは、皮質-視床間のネットワーク形成に大きな役割を担っている。視床皮質脳スライスを作成し、視床皮質投射ニューロンに対して GABA 持続電流の大きさを検証したところ、視床においては GABA 持続抑制は減弱していないことが判明した(図 5)。

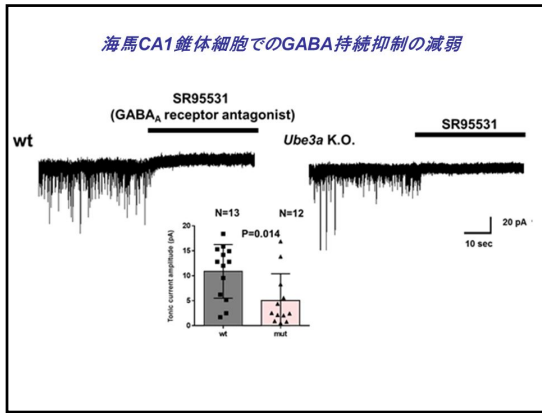


図4 自閉症スペクトラム障害、UBE3A 機能欠失のモデルマウスでは海馬 CA1 錐体細胞において GABA 持続抑制が減弱している

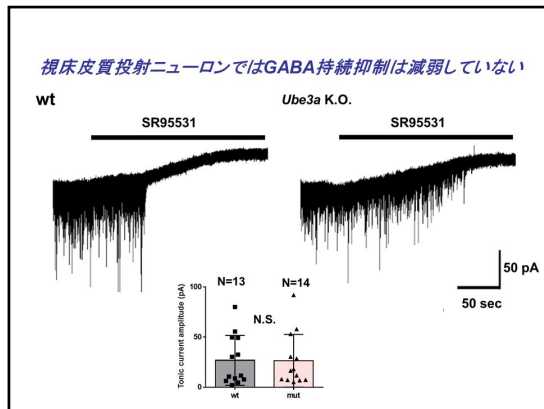


図5 海馬 CA1 錐体細胞においてみられた GABA 持続抑制の減弱は視床皮質投射ニューロンではみられない。

このような、脳の領域毎に GABA 持続抑制減少の程度が異なるとの知見はこれまでに報告がなく、まったく新しい発見である。その機序としては、GABA 持続抑制を制御する GABA トランスポーターの発現が、脳領域毎に異なることが原因と考えられ、今後詳細に検討を行っていく予定である。シナプス外 GABA 受容体サブユニットをノックアウトし、GABA 作動性持続抑制を脳全体で減弱させたマウスでは認知機能などに異常をしめさないことが知られている。従って、今回の我々の治験は、脳全体で GABA 持続抑制が低下しているよりむしろ、脳の領域間で GABA 持続抑制の程度が異なることの方が脳機能障害の病態としてより関与が大きいという可能性を示唆しており(図6) 自閉症スペクトラムの病態生理を考えるうえで重要な知見と考えられた。また、今回の結果から、近年開発された海馬および皮質特異的に GABA 作動性持続抑制を増強させる薬剤が治療戦略として有望ではないか、との仮説を立てることができた。今後他の自閉症スペクトラム障害においても検討していくとともに、立案した検証を追求していく予定である。

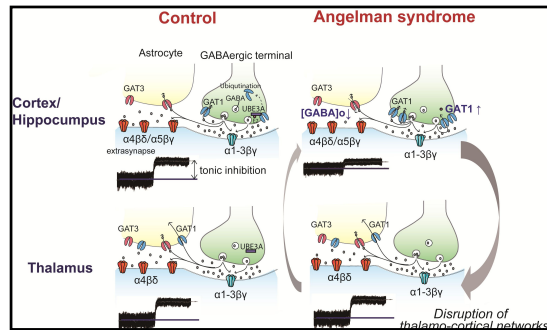


図6 今回の結果から推測される自閉症スペクトラムの病態生理

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 佐藤大介(SATO Daisuke)

北海道大学・大学院医学研究科・

客員研究員

研究者番号: 60516681

(2)研究分担者

なし

()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()
なし
研究者番号 :

(4)研究協力者 ()
なし