

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09631

研究課題名(和文) シナプス機能不全による発達障害の病態解明と治療戦略の検討

研究課題名(英文) Elucidation of synaptic dysfunctions in patients with developmental disorder

## 研究代表者

山本 俊至 (Yamamoto, Toshiyuki)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：20252851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：発達障害患者を対象としたゲノム解析研究により、シナプスの機能不全が疾患の本質であると考えられるようになってきた。ただ、ゲノム情報からシナプス病態が推測されていることがほとんどであり、細胞レベルでの分子病態の実態はまだほとんどわかっていない。そこでヒトiPS細胞から分化誘導した神経細胞レベルでの病態解析を行い、分子伝達機能やその病態を明らかにすることを試みた。その結果、遺伝子ノックダウンによって神経細胞の樹状突起におけるspineの密度が低下することが示された。この現象が薬物投与によってレスキューできるかどうかを今後検証する計画である。

研究成果の概要(英文)：Genomic analysis studies on patients with developmental disorders have led the synaptic dysfunction to be considered the essence of the disorder. However, it is almost always that synaptic pathology is suspected from genomic information, and the actual state of molecular pathology at the cell level is hardly understood yet. Therefore, we analyzed the pathological condition at the level of neurons differentiated from human iPS cells and attempted to clarify the molecular dysfunction and its pathology. As a result, it was shown that gene knockdown reduces spine density in neuronal dendrites. We are planning to investigate whether this phenomenon can be rescued by drug administration in the future.

研究分野：小児神経学

キーワード：ヒトiPS細胞 シナプス機能 発達障害 遺伝子ノックダウン

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析技術の目覚ましい進歩により、自閉症スペクトラム障害を含む中枢神経発達障害を対象としたゲノム研究が進み、様々なシナプス関連遺伝子が発症に関与していることが明らかになってきた。しかし、多くの場合、ゲノムの構造異常あるいは遺伝子変異が明らかになっただけであり、患者の中枢神経細胞レベルにおける病態が明らかになったわけではない。

これまでの多くの研究では、変異を示す遺伝子がシナプス機能に何らかの影響を与えているだろうという推測を示している段階であり、実際にどのようなシナプス機能障害を生じているかは明らかでない。シナプスの機能は複雑である。シナプスにはそもそも抑制系に働くシナプスと興奮性に働くシナプスがある。そして神経伝達物質を放出するシナプス前膜と神経伝達物質を受け取るシナプス後膜はまったく別の働きをしている。シナプス関連遺伝子がシナプスのどの部分で時空間的に作用しているかを明らかにしなければ、疾患を正しく理解することはできない。また、将来の分子標的治療に結びつけることもできない。そこで、疾患患者で明らかになっているシナプス関連遺伝子の変異が、細胞レベルで実際にどのような病態を示しているのかを明らかにする必要があると考えた。

### 2. 研究の目的

ヒトの高次脳機能に関わる分子の解析はマウスなどの実験動物では再現できないことが多い。そこで、患者レベルで明らかになったゲノム変異の病態を *in vitro* で解明するためにヒト iPS 細胞を用いることとした。本研究においては、発達障害患者で変異が認められた分子の発現を人為的に変化させ、そのことによって引き起こされる下流分子の影響や細胞の phenotype の変化を解析することにより、この伝達系の詳細を明らかにすることを目的とした。さらにその結果に基づき、分子標的治療のターゲットとなり得るかどうかを明らかにする。

本研究では、これら分子の発現低下が引き起こす病態を明らかにし、これらのレスキューがその病態を改善させることができるかどうか、検証する。

### 3. 研究の方法

正常ヒト iPS 細胞を神経細胞に分化誘導させ、siRNA による遺伝子ノックダウンを行った。このことによって生じる表現型を、樹状突起におけるシナプス密度を測定することによって評価した。この測定は免疫組織染色によって行った。また、治療可能性が示唆される薬物の投与により表現型が改善するかどうか検討した。

正常ヒト iPS 細胞から分化誘導させた神経細胞をシナプスを形成させるまでに成熟さ

せる。ニューロンの樹状突起の上には小さな棘状の隆起である棘突起 (spine) が無数にあってシナプス部位として機能している。シナプス前膜の異常により、spine の数や形態が変化し、神経伝達不良を引き起こすことで、神経症状の原因となっていることが知られているが、この spine の構造密度の変化を顕微鏡下で観察した。

また、この変化が治療効果薬物を投与することにより改善するかどうか検証した。このことにより、将来の分子標的治療の可能性を検討した。

### 4. 研究成果

siRNA による部分的・一過性の遺伝子ノックダウンを行い、神経細胞の表現型の変化を観察した。具体的には神経細胞の樹状突起における spine の密度を計測した。その結果、神経分化誘導効率が低下し、spine 密度が低下することが示された。次にこの状態を mTOR inhibitor 等の投与によって上記所見がレスキューできるかどうか検証中である。結果が得られ次第論文投稿する予定である。

### 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 81 件)

- [1] Shimajima K, Okamoto N, Ohmura K, Nagase H, Yamamoto T. Infantile spasms related to a 5q31.2-q31.3 microdeletion including *PURA*. Hum Genome Var 5; 18007, 2018 (査読有)
- [2] Shimajima K, Okamoto N, Yamamoto T. A 10q21.3q22.2 microdeletion identified in a patient with severe developmental delay and multiple congenital anomalies including congenital heart defects. Congenit Anom 58; 36-38, 2018 (査読有)
- [3] 山本俊至. 【ニューロジェネティクス新時代 次世代シーケンサーが拓く新しい世界】筋疾患・神経疾患のジェネティクス てんかん. Clinical Neuroscience 36; 233-235, 2018 (査読無)
- [4] Seto T, Hamazaki T, Nishigaki S, Kudo S, Shintaku H, Ondo Y, Shimajima K, Yamamoto T. A novel *CASK* mutation identified in siblings exhibiting developmental disorders with/without microcephaly. Intractable Rare Dis Res 6; 177-182, 2017 (査読有)
- [5] Shimajima K, Okamoto N, Goel H, Ondo Y, Yamamoto T. Familial 9q33q34 microduplication in siblings with developmental disorders and acrocephaly. Eur J Med Genet 60; 650-654, 2017 (査読有)

- [6] Okamoto K, Tsuchiya Y, Kuki I, Yamamoto T, Saito H, Kitagawa D, Matsumoto N. Disturbed chromosome segregation and multipolar spindle formation in a patient with *CHAMP1* mutation. *Mol Genet Genomic Med* 5: 585-591, 2017 (査読有)
- [7] Matsumaru S, Oguni H, Ogura H, Shimajima K, Nagata S, Kanno H, Yamamoto T. A novel *PGK1* mutation associated with neurological dysfunction and the absence of episodes of hemolytic anemia or myoglobinuria. *Intractable Rare Dis Res* 6: 132-136, 2017 (査読有)
- [8] Shimajima K, Ondo Y, Okamoto N, Yamamoto T. A 15q14 microdeletion involving *MEIS2* identified in a patient with autism spectrum disorder. *Hum Genome Var* 4: 17029, 2017 (査読有)
- [9] Yamamoto T, Shimajima K, Ondo Y, Shimakawa S, Okamoto N. *MED13L* haploinsufficiency syndrome: A de novo frameshift and recurrent intragenic deletions due to parental mosaicism. *Am J Med Genet A*. 173A: 1264-1269, 2017 (査読有)
- [10] Shimajima K, Okamoto N, Yamamoto T. Possible genes responsible for developmental delay observed in patients with rare 2q23q24 microdeletion syndrome: literature review and description of an additional patient. *Congenit Anom* 57: 109-113, 2017 (査読有)
- [11] Alber M, Kalscheuer VM, Marco E, Sherr EH, Lesca G, Till M, Gradek G, Wiesener A, Korenke CG, Mecier S, Becker F, Yamamoto T, Scherer SW, Marshall C, Walker S, Dutta U, Dalal A, Suckow V, Jamali P, Kahrizi K, Najmabadi H, Minassian BA. The *ARHGEF9* Disease: Phenotype Clarification and Genotype-Phenotype Correlation. *Neurol Genet* 3: e148, 2017 (査読有)
- [12] Shirai K, Higashi Y, Shimajima K, Yamamoto T. An Xq22.1q22.2 nullisomy in a male patient with severe neurological impairment. *Am J Med Genet A* 173A: 1124-1127, 2017 (査読有)
- [13] Sangu N, Shimajima K, Takahashi Y, Ohashi T, Tohyama J, Yamamoto T. A 7q31.33q32.1 microdeletion including *LRR4* and *GRM8* is associated with severe intellectual disability and characteristics of autism. *Hum Genome Var* 4: 17001, 2017 (査読有)
- [14] Shimajima K, Ondo Y, Matsufuji M, Sano N, Tsuru H, Oyoshi T, Higa N, Tokimura H, Arita K, Yamamoto T. Concurrent occurrence of an inherited 16p13.11 microduplication and a de novo 19p13.3 microdeletion involving *MAP2K2* in a patient with developmental delay, distinctive facial features, and lambdoid synostosis. *Eur J Med Genet* 59: 559-563, 2016 (査読有)
- [15] Yamamoto T, Shimajima K, Yamazaki S, Ikeno K, Tohyama J. A 16q12.2q21 deletion identified in a patient with developmental delay, epilepsy, short stature, and distinctive features. *Congenit Anom (Kyoto)* 56: 253-255, 2016 (査読有)
- [16] Shimajima K, Narai S, Togawa M, Doumoto T, Sangu N, Vanakkere OM, De Paepee A, Edwards M, Whitehall J, Brescianini S, Petit F, Andrieux J, Yamamoto T. 7p22.1 microdeletions involving *ACTB* associated with developmental delay, short stature, and microcephaly. *Eur J Med Genet* 59: 502-6, 2016 (査読有)
- [17] Morisada N, Ioroi T, Taniguchi-Ikeda M, Ye MJ, Okamoto N, Yamamoto T, Iijima K. A 12p13 *GRIN2B* deletion is associated with developmental delay and macrocephaly. *Hum Genome Var* 3: 16029, 2016 (査読有)
- [18] Yamamoto T, Shimajima K, Ondo Y, Imai K, Chong P-F, Kira R, Amemiya M, Saito A, Okamoto N. Challenges in detecting genomic copy number aberrations using next-generation sequencing data and the exome Hidden Markov Model: a clinical exome-first diagnostic approach. *Hum Genome Var* 3: 16025, 2016 (査読有)
- [19] Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K. Systematic cellular disease models reveal synergistic interaction of trisomy 21 and *GATA1* mutations in hematopoietic abnormalities. *Cell Reports* 15: 1228-41, 2016 (査読有)
- [20] Shimajima K, Okamoto N, Yamamoto T. A novel *TUBB3* mutation in a sporadic patient with asymmetric cortical dysplasia. *Am J Med Genet A* 170A: 1076-9, 2016 (査読有)
- [21] Watanabe S, Shimizu K, Ohashi H, Kosaki R, Okamoto N, Shimajima K, Yamamoto T, Chinen Y, Mizuno S, Dowa Y, Shiomi N, Toda Y, Tashiro K,

- Shichijo K, Minatozaki K, Aso S, Minagawa K, Hiraki Y, Shimokawa O, Matsumoto T, Fukuda M, Moriuchi H, Yoshiura K, Kondoh T. Detailed analysis of 26 cases of 1q partial duplication/triplication 1 syndrome. *Am J Med Genet A* 170A: 908-17, 2016 (査読有)
- [22] Okamoto N, Toribe Y, Shimojima K, Yamamoto T. Tatton-Brown-Rahman syndrome due to 2p23 microdeletion. *Am J Med Genet A* 170A: 1339-42, 2016 (査読有)
- [23] 山本俊至. 遺伝カウンセリング. 特集 周産期医学必修知識 第8版. 「周産期医学」46; 1120-1123, 2016 (査読無)
- [24] 山本俊至. 技術講座 エキスパート: 遺伝子・染色体検査「マイクロアレイ染色体検査概論」. 検査と技術 44; 578-84, 2016 (査読無)
- [25] 山本俊至. 先天代謝異常におけるマイクロアレイ染色体検査の応用. 小児科診療 79: 727-732, 2016 (査読無)
- [26] 山本俊至. マイクロアレイ染色体検査. 検査と技術 44; 578-584, 2016 (査読無)
- [27] Shimojima K, Okumura A, Hayashi M, Kondo T, Inoue H, Yamamoto T. *CHCHD2* is down-regulated in neuronal cells differentiated from iPS cells derived from patients with lissencephaly. *Genomics* 106: 196-203, 2015 (査読有)
- [28] Yamamoto T, Shimojima K, Kimura N, Mogami Y, Usui D, Takayama R, Ikeda H, Imai K. Recurrent occurrences of *CDKL5* mutations in patients with epileptic encephalopathy. *Human Genome Variation* 2: 15042, 2015 (査読有)
- [29] Shimojima K, Okamoto N, Yamamoto T. Characteristics of 2p15-p16.1 microdeletion syndrome; review and description of two additional patients. *Congenit Anom (Kyoto)*. 55: 125-32, 2015 (査読有)
- [30] Yamamoto T, Shimojima K. A novel *MED12* mutation associated with non-specific X-linked intellectual disability. *Human Genome Variation* 2: 15018, 2015 (査読有)
- [31] Shimada S, Shimojima K, Okamoto N, Sangu N, Hirasawa K, Matsuo M, Ikeuchi M, Shimakawa S, Shimizu K, Mizuno S, Kubota M, Adachi M, Saito Y, Tomiwa K, Haginoya K, Numabe H, Kako Y, Hayashi A, Sakamoto H, Hiraki Y, Minami K, Takemoto K, Watanabe K, Miura K, Chiyonobu T, Kumada T, Imai K, Maegaki Y, Nagata S, Kosaki K, Izumi T, Nagai T, Yamamoto T. Microarray analysis of 50 patients reveals the critical chromosomal regions responsible for 1p36 deletion syndrome-related complications. *Brain Dev* 37: 515-26, 2015 (査読有)
- [32] Yamamoto T, Shimojima K, Sangu N, Komoike Y, Ishii A, Abe S, Yamashita S, Imai K, Kubota T, Fukasawa T, Okanishi T, Enoki H, Tanabe T, Saito A, Furukawa T, Shimizu T, Milligan CJ, Petrou S, Heron SE, Dibbens LM, Hirose S, Okumura A. Single nucleotide variations in *CLCN6* identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures. *Plos One* 10: e0118946, 2015 (査読有)
- [33] Shimojima K, Okamoto N, Tamasaki A, Sangu N, Shimada S, Yamamoto T. An association of 19p13.2 microdeletions with Malan syndrome and Chiari malformation. *Am J Med Genet A* 167A: 724-30, 2015 (査読有)
- [34] 山本俊至. マイクロアレイ染色体検査. 小児内科 47: 1809-12, 2015 (査読無)
- [35] 山本俊至. アレイ CGH法によるてんかんの分子診断. 医学のあゆみ 253; 543-7, 2015 (査読無)
- [学会発表](計63件)
- [1] 下島圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. *PURA* を含む 5q31 微細欠失の新規例. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/12, 東京
- [2] 柳下友映, 下島圭子, 中野さやか, 今井克美, 山本俊至. *WDR26* ハプロ不全によるてんかん症候群; 新規 1q41q42 微細欠失からの考察. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/12, 東京
- [3] 今泉太一, 渡辺基子, 下島圭子, 熊倉啓, 山本俊至. 1番染色体 UPD による *SZT2* ホモ接合変異によって生じたと考えられる重度知的障害症例. 第40回日本小児遺伝学会学術集会, 2018/01/12, 東京
- [4] 下島圭子, 白井謙太郎, 岡本伸彦, 山本俊至. X染色体上のゲノムコピー数異常を認めた症例の考察. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017/11/17, 神戸
- [5] 山本俊至, 下島圭子, 恩藤由美子, 岡本伸彦. 自閉症スペクトラム患者に認められた *MEIS2* を含む 15q14 微細欠失. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017/11/17, 神戸
- [6] 山本俊至. [シンポジウム] 染色体微細構造異常による小児神経疾患とその発症メカニズム. 日本人類遺伝学会第62回大会, 2017/11/17, 神戸
- [7] Yamamoto T, Shimojima K. [シンポジウム] Neuro-functional analysis using disease-specific iPS cells. *Bulletin of the Japanese Society for Neurochemistry*, 2017/09/08, Sendai

- [8] 下島圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. 2q23q24 微細欠失症候群の患者に認められる発達遅滞の候補遺伝子絞り込み. 第 57 回日本先天異常学会学術集会, 2017/08/26, 東京
- [9] 山本俊至, 下島圭子, 岡本伸彦, 齋藤加代子. *CTNNA3* 変異の表現型との関係についての考察. 第 24 回日本遺伝子診療学会大会, 2017/07/15, 東京
- [10] 山本俊至, 下島圭子, 岡本伸彦. 網羅的ゲノム解析により発達障害患者に認められた de novo 遺伝子変異. 第 59 回日本小児神経学会学術集会, 2017/06/15, 大阪
- [11] 島田姿野, 小國弘量, 大谷ゆい, 西川愛, 伊藤進, 衛藤薫, 中澤友幸, 永田智, 山本俊至. 発達遅滞を呈し感染を契機に急性脳症を来した *HNRNPV* 遺伝子変異の 1 男児例. 第 59 回日本小児神経学会学術集会, 2017/06/16, 大阪
- [12] 山本俊至, 下島圭子, 岡本伸彦, 齋藤加代子. 同胞間で反復して認められた染色体微細構造異常 親世代の低頻度モザイク CNV. 第 41 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会, 2017.6.22-25, 東大阪市
- [13] Dowa Y, Sameshima K, Ichinomiya K, Shiihara T, Shimojima K, Yamamoto T. Two cases of monosomy of 3q with cerebral MRI findings. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
- [14] Yamamoto T, Shimojima K, Komoike Y, Ishii A, Abe S, Yamashita S, Imai K, Kubota T, Fukasawa T, Okanishi T, Enoki H, Tanabe T, Saito A, Furukawa T, Shimizu T, Milligan CJ, Petrou S, Heron SE, Dibbens LM, Hirose S, Okumura A. Single nucleotide variation in *CLCN6* identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
- [15] Shimojima K, Okumura A, Hayashi M, Kondo T, Inoue H, Yamamoto T. *CHCHD2* is down-regulated in neuronal cells differentiated from iPS cells derived from patients with lissencephaly. The 13th International Congress of Human Genetics, April 3rd-7th 2016, Kyoto, Japan.
- [16] 山本俊至. [シンポジウム 11: 小児神経疾患の最新理解] 網羅的遺伝子診断. 第 58 回日本小児神経学会学術集会 2016.6.3-5, 東京.
- [17] 下島圭子, 岡本伸彦, 山本俊至. 非対称性大脳皮質異形成症症例に認められた新規 TUBB3 変異. 第 58 回日本小児神経学会学術集会 2016.6.3-5, 東京.
- [18] 山本俊至, 下島圭子. 疾患 iPS 細胞による小児発達障害の病態解析. 再生医療実現化研究事業・再生医療実現化拠点ネットワークプログラム合同シンポジウム「科学者たちによる挑戦～iPS 細胞を用いた疾患・創薬研究～」, 2015.12.14, 東京.
- [19] 三宮範子, 下島圭子, 高橋勇弥, 大橋伯, 遠山潤, 山本俊至. 7q31.33-q32.1 微細欠失と知的障害・発達障害. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015.10.14-17 東京.
- [20] 山本俊至, 下島圭子, 齋藤聡. 次世代シーケンサー・パネル解析結果を用いた隠れマルコフモデルによるゲノムコピー数解析の試み. 日本人類遺伝学会第 60 回大会, 2015.10.14-17 東京.
- [21] 下島圭子, 岡本伸彦, 三宮範子, 山本俊至. 2p15-p16.1 微細欠失の 2 例-既報告例 18 例との比較-. 第 55 回 日本先天異常学会学術集会 / 第 38 回小児遺伝学会学術大会, 2015.7.25-27, 横浜.
- [22] 山本俊至, 下島圭子. 次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析で *MED12* 変異が認められた非特異的知的障害の男児例. 第 55 回 日本先天異常学会学術集会 / 第 38 回小児遺伝学会学術大会, 2015.7.25-27, 横浜.
- [23] 山本俊至, 下島圭子, 金子博之, 岡本伸彦, 齋藤潤, 北島康司, 永田浩一, 矢田俊彦, 小坂仁, 山形崇倫. ゲノム構造異常によって発症した自閉症・発達障害の疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明と治療法開発. 第 57 回日本小児神経学会学術集会. 2015.5.28-30, 大阪.
- [ 図書 ] (計 20 件)
- [1] 山本俊至. マイクロアレイ染色体検査. 水口雅・岡明・尾内一信 [編]. 小児臨床検査ガイド 第 2 版. 文光堂, 東京, pp668-672, 2017.
- [2] 下島圭子, 山本俊至. ゲノム解析と iPS 細胞を用いた病態. 技術情報協会 [編]. iPS 細胞の安全・高品質な作製技術. 技術情報協会, 東京, pp158-164, 2016.
- [3] 奥山虎之・山本俊至 [編]. 小児の遺伝性疾患 症例から学ぶ遺伝学的検査診断 遺伝カウンセリングの進めかた. 診断と治療社, 東京, 総頁数 217 頁, 2016.
- [4] 山本俊至. ダウン症候群・染色体異常. こどもの神経の診かた, 新島新一, 山内秀雄, 山本仁 編. 医学書院, 東京, pp227-232, 2016.
- [5] 山本俊至( 訳 ). 染色体異常と大規模 DNA 変化を調べるための遺伝子検査技術. ゲノム医学, 菅野純夫・福嶋義光 編. ゲノム医学. メディカルサイエンス

ンターナショナル，東京 pp452-67，  
2016.

- [6] 山本俊至. 1p36 欠失症候群. 水口雅，市橋光，崎山弘 編. 今日の小児治療指針，医学書院，東京，pp182-3，2015.
- [7] 山本俊至. Rett 症候群. 水口雅，市橋光，崎山弘 編. 今日の小児治療指針，医学書院，東京，pp684-685，2015.
- [8] 山本俊至. マイクロアレイ染色体検査. 『小児内科』『小児外科』編集委員会共編. 小児疾患診療のための病態生理2小児内科47巻増刊号，pp184-190，2015.
- [9] 山本俊至. 染色体検査とアレイ CGH. 松原洋一，呉繁夫，左合治彦 [編] 子どもの病気 遺伝について聞かれたら. 診断と治療社，東京，pp237-40，2015

〔産業財産権〕

なし

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山本 俊至 (YAMAMOTO, Toshiyuki)  
東京女子医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20252851

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

下島 圭子 (SHIMOJIMA, Keiko)  
東京女子医科大学・医学部・特任助教  
研究者番号：30578935

### (4)研究協力者

なし