

令和元年6月25日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09995

研究課題名(和文) シナプス異常症としての自閉症、知的障害の治療法開発に向けた病因と病態解析

研究課題名(英文) Genetic analysis for autism spectrum disorder and intellectual disability focusing on synaptic network abnormality

研究代表者

山形 崇倫 (Yamagata, Takanori)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00239857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自閉スペクトラム症(ASD)の病因・病態解明のため、染色体微小変異や遺伝子変異解析を行った。既知および未知の候補遺伝子を含むコピー数多型(CNV)を多数検出し、局在する候補遺伝子を解析しGAS2などとASDの関連が推定された。CNV中のマイクロRNA解析により、Mir935のASDへの関与が示唆された。概日リズム関連遺伝子のNr1d1とPer3を胎児脳にRNAiを導入し抑制した結果、神経細胞移動や突起伸長が障害された。シナプス・神経ネットワーク形成に関与し、ASDの病因となる可能性が示された。また、オキシトシン作用に関連する内服薬のASDに対する効果について臨床研究を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、ASDの病因となるコピー数多型、遺伝子変異、マイクロRNAなどを同定したことが挙げられる。特に、概日リズム関連遺伝子がASD患者で変異の頻度が高いことを示したことは意義が大きい。その中で、NR1D1とPER3が、概日リズム形成以外に神経形成にも重要な機能を有していることは知られていなかったことであり、概日リズム形成の解明研究に対しても重要な結果である。ASDの病因、病態が明らかになることは、患者の診断、予後判定、さらに治療法開発に重要である。現在、治療候補薬の臨床研究に着手しており、治療効果が示されれば、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)： To detect the pathogenic gene mutations for autism spectrum disorder (ASD) and their function, we analyzed patients samples by aCGH, candidate gene sequence and exome sequence. Several copy number variations (CNVs) were detected and candidate genes were selected. Among them, several genes such as GAS2, and also, microRNAs such as Mir935 were considered to relate with ASD. Addition to that, we detected several mutations on circadian relevant genes. Among them, Nr1d1 and Per3 were analyzed firstly. By intra-utero gene knock down of each gene by RNAi electroporation, neuronal migration and neurite elongation were disturbed. Addition to the mutations in ASD patients, these genes were considered to relate with ASD through the function on synaptic and neural network formation.

And we started the clinical study of a drug that relate the oxytocin function for ASD patients.

研究分野：小児科学、小児神経学、分子遺伝学、遺伝子治療

キーワード：自閉スペクトラム症 シナプス 概日リズム関連遺伝子 マイクロRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム (ASD) は、社会性の障害と常同性を中核とする発達障害で、社会不適応による患者や家族の困難が強く、治療法開発が急務である。病因として、array complementary genomic hybridization (aCGH)法で、約 10%に染色体の多数の領域に小さな欠失や重複などの copy number variation (CNV)が検出され、全エクソーム解析で、多数の病因候補遺伝子が報告されている。その中で、シナプス形成、機能に関連する遺伝子異常が多く報告され、病態の主体はシナプスと神経ネットワークの形成・機能の異常と考えられている。また、ASD には、睡眠障害などの概日リズム障害など、多くの併存症がある。シナプス異常症として知的障害等、他の発達障害やてんかんと関連しており、共通の病態を持つことも提起されている。これらの病態に関連する分子基盤と ASD の関連を解明することも、ASD の病態解明には重要である。申請者らは、候補遺伝子変異解析、aCGH、候補遺伝子改変マウス解析等により、ASD の病因遺伝子同定とシナプス構造・機能異常の病態解明を行い、既報告・未報告の CNV や疾患関連遺伝子変異を多数同定した。また、ASD に睡眠障害の合併が多いことから、概日リズム関連遺伝子群を次世代シーケンサーで変異解析し、ASD 群で、timeless、PER3、NR1D1 などに新たな変異を同定し、概日リズム遺伝子は、ASD の病態にも関連する可能性を示した。

### 2. 研究の目的

ASD および知的障害患者に対し、CNV と未知の病因遺伝子同定し、病因遺伝子の機能を解析する。また、概日リズム関連遺伝子変異解析を行い、検出された遺伝子と ASD との関連を解析する。また、治療法開発着手を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 発達障害患者を対象とした病因遺伝子解析

患者における染色体微細欠失 / 重複 (CNV) の解析

Agilent 社 SurePrint G3 human CGH 4x180 アレイを用いた aCGH 解析を実施し、CNV を同定する。検出された CNV 領域で、シナプスで機能している遺伝子を抽出する。

aCGH で検出された遺伝子の、他の患者での塩基変異解析

保有している ASD 患者 DNA 400 例で、検出された CNV 領域に局在するシナプス関連遺伝子の全エクソンを直接シーケンス法で変異解析する。塩基置換が検出された場合、コントロールでの有無をスクリーニングし、疾患関連変異かどうか同定する。

概日リズム関連遺伝子変異解析

概日リズム関連遺伝子 15 個をエクソンキャプチャーし、次世代シーケンサーで変異解析。

全エクソーム解析

承諾が得られた例では、患者と両親に対し全エクソーム解析に着手する。

概日リズム関連遺伝子およびシナプス関連遺伝子の機能と分子機構解析

#### (a) マウス子宮内遺伝子導入技術を用いた候補遺伝子の神経発達への関与解析

変異を検出した遺伝子に対して、胎生 14 日に子宮内胎児脳に RNAi 導入し発現抑制、あるいは変異遺伝子を導入し、生後脳での神経細胞への影響を観察し、病因遺伝子の可能性を検討。

#### (b) ノックアウトマウスを用いた解析

Timeless のノックアウトマウス作製、行動や病理学的解析等で、ASD との関連を解析する。

#### (2) ASD の治療法開発

自治医科大学統合生理学から治療候補薬が同定された。臨床研究に進めていく。

### 4. 研究成果

#### (1) 発達障害患者を対象とした病因遺伝子解析

ASD 患者における CNV および病因遺伝子同定と機能解析

ASD 患者で aCGH 解析を実施した結果、病因と考えられる染色体の微小欠失・重複 (CNV) が複数検出された。SHANK3 や NRXN などの既知の病因遺伝子を含む CNV も検出されている。新たな候補遺伝子として、Chr 1q25.1 の GPR52、RABGAP1L、Chr14q32.1 の BDKRB1、BDKRB2、8p23.2 の CSMD1、6p25.3 の DUSP22、11p14.3 の GAS2 など、いくつかの遺伝子を抽出して、疾患関連性を解析した。GAS2 を含む 11p14.3 欠失例では、欠失は父由来であった。GAS2 は、微小管と細胞骨格の形成、アポトーシス調整などへの関与が報告されており、シナプス形成にも関与している可能性が示唆される。父由来であるが、父も自閉傾向があり、本症例の病因である可能性が考えられた。今後、GAS2 のマウスで脳の形成期での発現、シナプスでの機能の有無や他の患者での変異解析等により、神経発生への関与と、ASD の病因であることを確認する。

さらに、他の候補遺伝子と、全エクソーム解析で検出された遺伝子も含め、疾患との関連性解析を継続している。

ASD とマイクロRNA との関連解析

上記解析結果から、CNV領域にマイクロRNAが局在しているかを調べ、疾患との関連を解析した。1例でMir935を含む領域のde novoの重複が同定された。患者リンパ球を用い、Realtime PCRでMir935の発現が増加していることを確認し、さらにMir935によって発現が調節されるSTAT1の発現が患者で低下していることを確認した。よって、この患者は、Mir935が発症に関与していると推定された。既報告も含め、ASDの発症にマイクロRNAが関連することが示唆され、マイクロRNA、それにより発現が調節される遺伝子とASDの関連について、さらに解析継続している。

知的障害、学習障害等の発達障害およびてんかんにおけるCNV、遺伝子変異解析

発達遅滞患者の遺伝子解析で、SOX9およびCLN6の変異を検出した。SOX9は、知的障害に、大頭症、白質形成不全等を伴った患者で同定された。また、CLN6は、Neuronal ceroid lipofuscinosesの病因遺伝子であるが、患者は、発達の停滞、てんかん、失調等を示し、診断後は急速に退行した。

学習障害と皮膚、目の症状を持つ患者でClass III phosphoinositide 3-kinase (PIK3C3)の欠失を同定した。PIK3C3の発現を胎児脳でノックダウンした結果、神経細胞の移動や神経突起伸長の異常が検出された。よって、PIK3C3は、神経ネットワークやシナプス形成にも関与し、発達障害にも関連することを明らかにした。

難治性てんかんと重度知的障害を持つ患者において、KCNQ2変異を同定した。KCNQ2は、良性家族性新生児けいれんの病因と言われていたが、難治性てんかん例でも病因となることが知られてきた。本例は、早期ミオクロニー脳症の病態で、これまでに報告がなく、KCNQ2の表現型をさらに拡大した。

重度知的障害に低身長、先天性心疾患等を持つ児でXq26.1-26.3の欠失を同定し、MOSPD1とGPC3、4が成長と心疾患の発症に関与する可能性を示した。

他に、MELASやLeigh症候群などのミトコンドリア異常症、Pelizaeus-Merzbacher病などで、遺伝子変異を同定した。

概日リズム関連遺伝子のASD発症への関与の解析

ASD患者28人（睡眠障害あり14人、なし14人）と、対照群23人で、概日リズム関連遺伝子11個の変異解析を行った結果、対照群では一つの変異のみだったのに対し、ASD患者で多数の変異が検出され、概日リズム遺伝子がASDに関与する可能性を示した。それらの中で、まずNR1D1とPER3、TIMELESSを解析対象とした。

NR1D1解析では、マウス子宮内でiRNAをエレクトロポレーションすることにより胎児脳のNR1D1の発現を抑制した結果、神経細胞の移動障害、神経突起の伸長障害等が確認され、NR1D1の神経形成、突起伸長とシナプス形成への関与が示唆された。この神経細胞移動障害は正常遺伝子導入でレスキューされるが、ASD例で検出されたp.R500H変異遺伝子導入ではレスキューされず、この変異が遺伝子機能を低下させることが確認された。NR1D1はASDの病因遺伝子と考えられた。

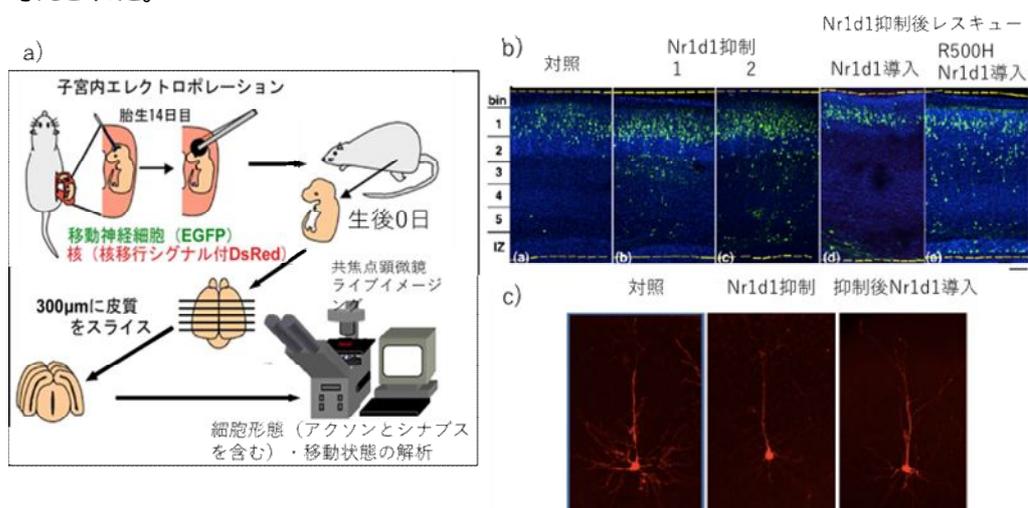


図 子宮内エレクトロポレーションによるNr1d1の抑制

a) 子宮内エレクトロポレーションの方法。胎生14日にマウス胎児脳にエレクトロポレーションでRNAi導入しNr1d1の発現抑制。b) 生後の神経細胞移動の確認。対照では脳表に移動しているが、発現抑制では移動が遅れる細胞が多い。正常遺伝子導入では回復するが、R500H導入では回復しない。c) 同じく、神経突起を確認した結果、Nr1d1発現抑制では神経突起伸長が不良になるが、正常遺伝子導入で回復した。

PER3でも、NR1D1同様、エレクトロポレーションでiRNAを導入しPer3の発現を抑制した結果、神経細胞移動と神経突起伸長が障害されることが検出され、Per3が神経細胞の成熟と神経ネットワーク形成に参与していることを示した。また、患者での変異解析により、複数の変異が検出された。よって、PER3は、ASDの病因遺伝子の一つと考えられる。

TIMELESSのノックアウトマウスを作製し、解析している。行動解析で、暗期と明期とでの行動の違いや感覚に対する反応の違いが検出されている。さらに詳細に解析継続中である。

## (2) 治療法開発

生理学で、マウスで社会性の改善作用と肥満抑制効果を示す、オキシトシン作用と関連する物質であるASD治療候補薬が選定された。ASD患者に対する臨床研究を実施する計画を立案し、倫理委員会の承認を得た。現在、同意が得られた患者に治療を開始している。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 15 件)

Ikeda T, Osaka H, Shimbo H, Tajika M, Yamazaki M, Ueda A, Murayama K, Yamagata T. Mitochondrial DNA 3243A>T mutation in a patient with MELAS syndrome. Hum Genome Var. 2018;5:25. doi: 10.1038/s41439-018-0026-6. (査読有り)

Matsubara Y, Osaka H, Yamagata T, Ae R, Shimizu J, Oguro N. Long-term outcomes in motor and cognitive impairment with acute encephalopathy. Brain Dev. 2018;40:807-812. doi: 10.1016/j.braindev.2018.05.013. (査読有り)

Ueda A, Shimbo H, Yada Y, Koike Y, Yamagata T, Osaka H. Pelizaeus-Merzbacher disease can be a differential diagnosis in males presenting with severe neonatal respiratory distress and hypotonia. Hum Genome Var. 2018;5:18013. doi: 10.1038/hgv.2018.13. (査読有り)

Miyauchi A, Osaka H, Nagashima M, Kuwajima M, Monden Y, Kohda M, Kishita Y, Okazaki Y, Murayama K, Ohtake A, Yamagata T. Leigh syndrome with spinal cord involvement due to a hemizygous NDUFA1 mutation. Brain Dev 2018;40:498-502. doi: 10.1016/j.braindev.2018.02.007. (査読有り)

Matsumoto A, Imagawa E, Miyake N, Ikeda T, Kobayashi M, Goto M, Matsumoto N, Yamagata T, Osaka H. The presence of diminished white matter and corpus callosal thinning in a case with a SOX9 mutation. Brain Dev 2018;40:325-329. doi: 10.1016/j.braindev.2017.09.002. (査読有り)

Kojima K, Shirai K, Kobayashi M, Miyauchi A, Saito H, Matsumoto N, Osaka H, Yamagata T. A patient with early myoclonic encephalopathy (EME) with a de novo KCNQ2 mutation. Brain Dev 2018;40:69-73 doi: 10.1016/j.braindev.2017.06.004. (査読有り)

Hirota Y, Minami T, Sato T, Yokomizo A, Matsumoto A, Goto M, Jinbo E, Yamagata T. Xq26.1-26.3 duplication including MOSP1 and GPC3 identified in boy with short stature and double outlet right ventricle. Am J Med Genet A. 2017;173:2446-2450. doi: 10.1002/ajmg.a.38297. (査読有り)

Usui M, Miyauchi A, Nakano Y, Nakamura S, Jimbo E, Itamura S, Adachi K, Nanba E, Narita A, Yamagata T, Osaka H. Miglustat therapy in a case of early-infantile Niemann-Pick type C. Brain Dev 2017;39:886-890. doi: 10.1016/j.braindev.2017.05.006. (査読有り)

Sakamoto S, Monden Y, Fukai R, Miyake N, Saito H, Miyauchi A, Matsumoto A, Nagashima M, Osaka H, Matsumoto N, Yamagata T. A case of severe movement disorder with GNAO1 mutation responsive to topiramate. Brain Dev. 2017;39:439-443. doi: 10.1016/j.braindev.2016.11.009. (査読有り)

Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo EF, Tabata H, Yamagata T, Nagata KI. Role of a circadian-relevant gene NR1D1 in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorders. Sci Rep 2017;7:43945. doi: 10.1038/srep43945. (査読有り)

Takayanagi Y, Yoshida M, Takashima A, Takanami K, Yoshida S, Nishimori K, Nishijima I, Sakamoto H, Yamagata T, Onaka T. Activation of Supraoptic Oxytocin Neurons by Secretin Facilitates Social Recognition. Biol Psychiatry. 2017;81:243-251. doi: 10.1016/j.biopsych.2015.11.021. (査読有り)

Kojima K, Anzai R, Ohba C, Goto T, Miyauchi A, Thony B, Saito H, Matsumoto N, Osaka H, Yamagata T. A female case of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency responsive to MAO-B inhibition. *Brain Dev* 2016;38:959-63. doi: 10.1016/j.braindev.2016.06.002. (査読有り)

Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo EF, Kojima K, Nagata KI, Iwamoto S, Yamagata T. Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. *Brain Dev* 2016;38:91-99. doi: 10.1016/j.braindev.2015.04.006 (査読有り)

Inaguma Y, Matsumoto A, Noda M, Tabata H, Maeda A, Goto M, Usui D, Jimbo EF, Kikkawa K, Ohtsuki M, Momoi MY, Osaka H, Yamagata T, Nagata KI. Role of Class III phosphoinositide 3-kinase in the brain development: possible involvement in specific learning disorders. *J Neurochem*. 2016;139:245-255. doi: 10.1111/jnc.13832. (査読有り)

Miyake N, Abdel-Salam G, Yamagata T, Eid MM, Osaka H, Okamoto N, Mohamed AM, Ikeda T, Afifi HH, Piard J, van Maldergem L, Mizuguchi T, Miyatake S, Tsurusaki Y, Matsumoto N. Clinical features of SMARCA2 duplication overlap with Coffin-Siris syndrome. *Am J Med Genet A* 2016;170:2662-70. doi: 10.1002/ajmg.a.37778. (査読有り)

(学会発表)(計 5件)

後藤昌英、松本歩、神保恵理子、小坂仁、大橋圭、齋藤伸治、山形崇倫：自閉スペクトラム症児に対するアレイ CGH 解析による MicroRNA の検討. 第 60 回日本小児神経学会学術集会 2018 年

松本歩、小坂仁、長嶋 雅子、岩間 一浩、水口 剛、池田 尚広、村松 一洋、松本 直通、山形崇倫：急速に歩行障害が進行した CLN6 変異を有する神経セロイドリポフスチン症の 5 歳男児例. 第 60 回日本小児神経学会学術集会 2018 年

後藤昌英、松本歩、神保恵理子、小坂仁、大橋圭、齋藤伸治、山形崇倫：自閉症スペクトラム障害児に対するアレイ CGH 解析での検討. 第 59 回日本小児神経学会総会 2017 年

Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo EF, Tabata H, Osaka H, Nagata K, Yamagata T : Role of a circadian-relevant gene, NR1D1, in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorder . 2017 International Meeting for Autism Research (国際学会) 2017 年

Matsumoto A, Inaguma Y, Usui D, Goto M, Jimbo EF, Tabata H, Maeda A, Kikkawa K, Momoi MY, Osaka H, Nagata KI. Yamagata T : PIK3C3 is responsible gene for epidermal nevus, cataract and learning disorder. American Society of Human Genetics 2016 Annual meeting (国際学会) 2016 年

## 6. 研究組織

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 松本 歩、後藤 昌秀、小島 華林、神保 絵里子、永田 浩一

ローマ字氏名: Ayumi Matsumoto, Masahide Goto, Karin Kojima, Eriko Jimbo, Ko-ichi Nagata

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。