

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16279

研究課題名（和文）自閉症での概日リズム関連遺伝子のシナプス機能、社会性障害への作用の解明と治療開発

研究課題名（英文）Synapse function and social interaction disfunction

研究代表者

松本 歩 (Matsumoto, Ayumi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20458318

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：自閉症スペクトラム（ASD）、発達障害に対してaCGH、TrueSightOne、エクソーム解析を行った。ADIR1B、DYNC1H1、SHANK2などの遺伝子変異を検出した。DYNC1H1の皮質形成異常を伴わないASD例を報告した。また、低身長と発達障害例でGAP43の変異を同定した。GAP43は成長因子関連蛋白で、神経の再生に重要である。60例のシーケンス解析を行ったが、変異は同定できなかった。皮質形成の関与について解析中である。Timelessのノックアウトマウスで社会性について有意差が得られ、解析を継続している。また、iPSの変異の導入は効率に可能で、神経分化は今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症、発達障害は罹患率が高く、原因遺伝子は多岐にわたり、新たな病因遺伝子の同定は病因解明の第一歩となる。家族で遺伝子の共有にかかわらず、症状の有無が異なる例があり、検出した遺伝子の機能の評価法の確立も重要な課題である。iPSでの機能解析については神経分化が成功していないが、重要な課題であり今後も継続取り組んでいく。オキシトシン関連物質の治験は患者さんにとっては最も興味深く、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We performed aCGH, TrueSightOne, and exosome analysis for autism spectrum disorders (ASD) and developmental disorders. Gene mutations such as ADIR1B, DYNC1H1, and SHANK2 were detected. We report a case of ASD without cortical dysplasia of DYNC1H1. We also identified mutations in GAP43 in patients with short stature and developmental disabilities. GAP43 is a growth factor-related protein that is important for nerve regeneration. Sequencing analysis of 60 cases did not identify mutations. The involvement of cortical formation is being analyzed. Significant differences in sociality were obtained in Timeless knockout mice, and analysis is ongoing. In addition, the introduction of iPS mutations is possible efficiently, and neural differentiation is an issue for the future.

研究分野：小児神経

キーワード：自閉症スペクトラム 発達障害 エクソーム Timeless

## 1. 研究開始当初の背景

概日リズムに関連する遺伝子と ASD が関連する可能性が示唆されている。概日リズムの主要回路は、*BMAL*、*PER*、*CLOCK* 等の遺伝子がフィードバック系で調節されている。*TIMELESS* は DNA 複製や apoptosis への関与が報告されている (Witosh J et al., 2014, O'Reilly LP et al., 2011)。発達や ASD への関与が推測される。社会性・社会行動と概日リズムは密接な関連を持ち、その基盤として、概日リズム関連遺伝子の中にシナプス形成・機能に関与する遺伝子が存在し、その機能低下により神経ネットワークの形成・可塑性が低下し、社会性の障害やリズム障害などを来してくる可能性が考えられる。また、オキシトシンが ASD の社会性を改善させることが報告されている (Hollander et al., 2003, 2007, Kosaka et al., 2016)。また、オキシトシンは、摂食や睡眠などのリズムにも影響していることが報告されている。オキシトシン作用は、ASD 治療候補薬としても重要であるとともに、概日リズムの調節薬としても関心が持たれる。しかし、点鼻製剤のみで使用が容易ではないという問題があった。

## 2. 研究の目的

これまで自閉症スペクトラム障害の複数の原因遺伝子の同定、概日リズム関連遺伝子が自閉症スペクトラム障害の病因である可能性を発表してきた。続いて、概日リズム関連遺伝子の 1 つである *Timless* のノックアウトマウスを作成した。本研究では、これらの成果を発展させ、(1) 染色体の微小欠失や重複などのコピー数多型や遺伝子変異解析による新たな病因遺伝子同定および、機能解析により病態解明を行う。また、(2) 既に変異同定した概日リズム関連遺伝子がシナプス機能に与える影響の解明、(3) オキシトシンに関連した治療候補薬について、患者での臨床研究を行う、ことで自閉症スペクトラム障害の病態を解明し、治療薬の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ASD 患者のゲノム DNA を用い aCGH 解析を行う。網羅的に遺伝子の微小欠失、重複を検出する。その領域内のシナプス関連遺伝子を候補遺伝子として、変異解析、機能解析を行う。

(2) 概日リズム関連遺伝子について、マウス子宮内遺伝子導入技術や培養細胞による機能解析を行う。既に作成済みの *Timeless* ノックアウトマウスを用い、シナプス形成や興奮抑制のバランス、行動解析を行い、ASD との関連を明らかにする。オキシトシンに関連する物質で臨床試験を行う。

## 4. 研究成果

### (1) aCGH 解析, エクソーム解析

aCGH 解析は、ASD 45 例、それ以外の知的障害、発達障害 71 例について解析を行った。ASD 女児例に ASD の父由来の欠失 *cgh[hg19]11p14.3 (21706424-23922118)x1* があり、ASD で報告されている *GAS2* が含まれていた。その他、既知の欠失、重複、シナプス関連の遺伝子などが検出された。家系解析等継続している。

TrueSightOne: 17 例、エクソーム 18 例施行した。既知の遺伝子で *COL4A1*, *ZIC2*, *ADIR1B*, *DYNC1H1*, *SHANK2*, *SCN8A*, *WDR45* などの変異が検出された。*DYNC1H1* の検出変異 p.

(Leu4179Ser) は、AAA6 ドメインで、AAA6 ドメインの変異報告は、これまで ASD の症例の報告があったが、臨床症状の詳細は不明であった。皮質形成異常を伴わない知的障害、てんかん、ASD の報告も *DYNC1H1* としては少なく、てんかん、皮質形成異常の review と共に報告した。また、低身長と発達障害の症例で *GAP43* の変異を同定した。*GAP43* は成長因子関連蛋白で、神経の再生において重要であると考えられている。この症例は Silver Russell 症候群 (SRS) に類似しており、SRS が疑われる症例で、このメチル化の有意差が見られたとの報告あり。60 例の SRS 疑い例で通常 H19/IGF2 のメチル化異常が見られなかった症例についてシーケンスを行ったが、変異は同定できなかった。しかし、発達障害へ関与が考えられ、永田先生らと皮質形成への関与についてさらに解析中である。

(2)iPSでの解析: ASD患者で検出したTimelessの変異(p.(F498S),p.(A325T))をCrisper-Cas9を用いてiPSに変異導入を行った。コロニーを選択培養し、シーケンスで変異確認を行い、2種類の変異導入を確認した。p.(F498S)ではヘテロ変異が約8割、p.(A325T)ホモ約3割、ヘテロ6割と変異の導入効率は良好であった。しかし、神経分化が2週間ごろより細胞が死んでしまい、以降の分化、解析はできなかった。

(3)Timeless ノックアウトマウス: バッテリーに従い解析中であるが、社会性に有意差が見られている。Nを増やしてさらに解析中である。

(4)オキシトシン関連物質による臨床治験: コロナ感染の影響で中断しているが引き続き投与予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ayumi Matsumoto, Karin Kojima, Fuyuki Miya, Akihiko Miyauchi, Kazuhisa Watanabe, Sadahiko Iwamoto, Kensuke Kawai, Mitsuhiro Kato, Yukitoshi Takahashi, Takanori Yamagata	4. 巻 -
2. 論文標題 Two cases of DYNC1H1 mutations with intractable epilepsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Dev	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2021.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto, A. Nagashima, M. Iwama, K. Mizuguchi, T. Makino, S. Ikeda, T. Muramatsu, K. Matsumoto, N. Yamagata, T. Osaka, H.	4. 巻 41
2. 論文標題 Rapid progression of a walking disability in a 5-year-old boy with a CLN6 mutation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Dev	6. 最初と最後の頁 726-730
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2019.04.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Ayumi, Imagawa Eri, Miyake Noriko, Ikeda Takahiro, Kobayashi Mizuki, Goto Masahide, Matsumoto Naomichi, Yamagata Takanori, Osaka Hitoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 The presence of diminished white matter and corpus callosal thinning in a case with a SOX9 mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 325 ~ 329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2017.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Ayumi, Tulyeu Janyerkye, Furukawa Rieko, Watanabe Chika, Monden Yukifumi, Nozaki Yasuyuki, Mori Masato, Namekawa Michito, Jimbo Eriko F., Aihara Toshinori, Yamagata Takanori, Osaka Hitoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 A case of severe Alexander disease with de novo c. 239 T > C, p.(F80S), in GFAP	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain and Development	6. 最初と最後の頁 587 ~ 591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2018.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo EF, Tabata H, et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 Role of a circadian-relevant gene NR1D1 in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorders.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 43945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep43945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirota, Y., Minami, T., Sato, T., Yokomizo, A., Matsumoto, A., Goto, M., Jinbo, E., Yamagata, T.	4. 巻 173
2. 論文標題 Xq26.1-26.3 duplication including MOSPD1 and GPC3 identified in boy with short stature and double outlet right ventricle.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A	6. 最初と最後の頁 2446-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.38297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本歩、長尾恭光、神保恵理子、才津浩智、小坂仁、岩本禎彦、山形崇倫、
2. 発表標題 低緊張と知的障害のFER1L6の変異例
3. 学会等名 人類遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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、松本直道、山形崇倫
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本歩、後藤昌英、宮内彰彦、神保恵理子、岩本禎彦、永田浩一、山形崇倫
2. 発表標題 自閉性障害の概日リズム異常と病因遺伝子解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会、第63回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本歩、小坂仁、今川英里、三宅紀子、松本直道、山形 崇倫
2. 発表標題 大頭症と知的障害のPTEN変異を有する5歳男児例
3. 学会等名 第58回日本小児神経学会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 A. Matsumoto, E. Imagawa, N. Miyake, N. Ikeda, M Kobashi, M. Goto, T. Yamagata, N. Matsumoto, H. Osaka
2. 発表標題 Acquired ventriculomegaly in a case with SOX 9 mutation
3. 学会等名 American society of human genetics 67th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------