

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22790996

研究課題名（和文） 自閉性障害の病態に関与する候補遺伝子群の網羅的遺伝子発現解析

研究課題名（英文）

Exhaustive gene expression analysis of the candidate genes related to pathology of autism spectrum disorder

研究代表者

中島 尚美 (NAKASHIMA NAOMI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20337330

研究成果の概要（和文）：

自閉性障害(ASD)および知的障害の病因遺伝子を同定し、病態を解明して治療法の開発に結びつけていくことを目的に、患者での染色体・遺伝子変異解析と、変異が検出されて病因と考えられた遺伝子の機能解析を行った。

その結果、10 例で病因と考えられる CNV を検出した。CNV 領域に局在する遺伝子として、*SHANK3*, *Monoamine oxidase (MAO) A and B*, *RPS6KA3*, *LIN7A and LIN7B* などが挙げられる。*LIN7B* に関しては、他の患者での変異解析により、スプライス変異を来す塩基変異を検出し、ASD との関連は強いと考えられた。*LIN7A/7B* は現在、機能解析継続実施中であるが、それぞれシナプス前、後膜で局在しており、神経細胞の発生・分化に伴って発現が増加する結果や、胎児期に発現抑制すると神経細胞移動、機能に影響を来す結果が得られている。*LIN7A/7B* は神経機能、シナプス機能に重要な役割を有すると考えられる。さらに、病因と考えられる遺伝子があり解析中で、これらの同定が、病態の理解、治療法の開発に有用である。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed array CGH for CNV and candidate genes for mutations on autism spectrum disorder (ASD) patients to identify genes for ASD and detect the target of treatment. We detected pathogenic CNV on 10 patients in 52 patients. Genes on CNV were *SHANK3*, *Monoamine oxidase (MAO) A and B*, *RPS6KA3*, *LIN7A and LIN7B*, etc. These genes were working relating to the synaptic function. *LIN7A* and *LIN7B* localized on the pre- and post-synaptic area. Suppression of *LIN7A* and *LIN7B* in the fetal brain induced delayed migration suggesting *LIN7A* and *LIN7B* had an important role on neuronal function. Further analysis of candidate genes on CNV induces understanding of ASD pathology and the development of the treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床系医学・小児科学

キーワード：自閉性障害、シナプス関連遺伝子、CGH法、CNV

1. 研究開始当初の背景

自閉性障害（以下、ASD）は、社会性やコミュニケーションの障害、常同性を症状の中核とする疾患で、社会的にも重要な疾患であるとともに、脳機能発達研究の点からも興味ある疾患である。

ASDの病因として、一部の患者でシナプス結合に関与する *Neurologin* や *SHANK3* などのいくつかの遺伝子に変異が報告されているが、多因子遺伝形式も想定されるなど、遺伝的背景は多彩である。*Neurologin* や *SHANK3* は、シナプス結合に関与する遺伝子であり、また、シナプス機能の異常として、GABA や glutamate などの神経伝達物質の機能異常も示唆されていることから、ASDの分子基盤として、シナプス形成、機能に関与する多数の遺伝子が病因として関与していると考えられる。

近年、染色体の微少構造変化を網羅的に解析する complementary genomic hybridization (CGH)法が開発されている。それにより、ASDにおいて染色体の多数の領域において、小さな欠失や重複などの copy number variation (CNV)が患者の10%前後に検出されており、解析精度がより細くなるにつれ、検出頻度は上昇している。

*SHANK3*は22番染色体の遠位端に局在し、サブテロメアの欠失により、*SHANK3*の欠失していた患者もあった。また、15qのCNVにGABA受容体が局在し、病因遺伝子と考えられている。また、自閉性障害患者で検出されたCNV領域には、シナプス関連遺伝子やユビキチン化に関連する遺伝子が多く局在していることなどから、CNV領域に局在するシナプス関連遺伝子は、ASDの候補遺伝子である。

我々の研究室でCGH解析を行ったASD患者を中心とした発達障害患者において、*SHANK3*が局在する22q13に欠失が検出された患者があったが、これまでに報告のない、11q24とXq26にCNVが検出された。この領域に、シナプス関連遺伝子が局在している。11q24は、全ゲノム連鎖解析でASDとの連鎖が報告された領域であり、候補遺伝子として有望と考えられた。

2. 研究の目的

ASDの分子基盤として、シナプス形成、機能に関与する多数の遺伝子が病因として関与していると考えられる。本研究では、シナプス関連遺伝子をASD候補遺伝子として、ASD患者でのCNV解析、遺伝子変異解析を

行うことにより、自閉性障害の病因、病態を解明して治療法の開発に結びつけていく。

3. 研究の方法

当研究室で保有しているASDおよび知的障害患者DNA400例において、ASDおよび知的障害患者を対象に、Agilent社 Human CGHアレイ（180K）を用いたアレイ-CGH解析による染色体微細欠失/重複(CNV)の同定、およびシーケンス法による候補遺伝子の変異解析を継続的に実施した。

CNV領域中の候補遺伝子について、他の患者での変異解析や機能解析を行い、病因の可能性を解析した。また、11q24、Xq26に局在するシナプス関連遺伝子について解析を行った。変異解析は、当該遺伝子の全エクソンおよび近傍のイントロンをPCR増幅し、直接シーケンス法で塩基置換の解析を行った。さらに、家族やコントロールでの変異の有無を解析した。

4. 研究成果

1. CNV解析

患者DNAを抽出し、Agilent社CGHアレイ（Human Genome 180K）でCNV解析を継続して実施した。

① 3年間で、ASD患者52名に実施し、10例に疾患との関連性が示唆されるCNVを検出した。*SHANK3*の欠失など、既報告の病因遺伝子の欠失が検出された。

② ASDと重度知的障害を持つ兄弟で、Xp11に微小欠失を検出した。この欠失領域には、monoamine oxidase (MAO) A, Bが局在していた。この兄弟の髄液中のセロトニンが著増しており、MAOA, Bの欠失により、代謝が阻害されたと考えられる。MAOA, BおよびセロトニンがASD発症に関与する事を示す重要な所見である。

③ ASD患者1名を含む、知的障害患者5名の家系解析で、Xp22.12の重複が検出された。その領域に*RPS6KA3*が局在していた。*RPS6KA3*は、Coffin-Lowry症候群の病因遺伝子で、非症候性の知的障害の病因としても知られており、また、重複例も報告されている。この家系解析結果から、*RPS6KA3*は、知的障害のみならず、てんかんやASDの病因となる可能性が示唆された。

④ 知的障害患者1例で12q21の欠失が検出され、その部位にLIN7A局在していた。また、ASD患者で19q31.33の重複が検出されその領

域にLIN7Bが局在していた。LIN7Bに関しては、他の患者での変異解析により、スプライス変異を来す塩基変異を検出し、ASDとの関連は強いと考えられた。LIN7A/7Bは現在、機能解析継続実施中であるが、それぞれシナプス前、後膜で局在しており、神経細胞の発生・分化に伴って発現が増加する結果や、胎児期に発現抑制すると神経細胞移動、機能に影響を来す結果が得られている。これらの結果から、LIN7A/7Bは神経機能、シナプス機能に重要な役割を有すると考えられ、今後さらにASDの発症機序との関連を解析していく。

⑤ 他に、細胞接着に関連する遺伝子とチャネル遺伝子が各1例、脳での作用が不明な遺伝子が2例であった。他の4例は、CNV領域に複数の候補遺伝子が含まれ、病因遺伝子がどれか検討中である。

2. 11q24に局在するシナプス関連遺伝子の変異解析

ASD患者1例に11q24の微小重複が検出されていた。その領域に局在するシナプスで機能している遺伝子*JAM3*について、ASD患者150名で遺伝子変異の有無を解析した。その結果、病因と考えられる変異は検出されなかった。その後、*JAM3*が常染色体劣性の脳形成異常、白内障を伴う疾患の病因であることが報告されたこともあり、ASDとの関連は否定的である。また、同様に脳形成異常と白内障を持つ患者で変異解析を行ったが、変異は検出されなかった。

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1件)

Matsumoto A, Kuwagima M, Miyake K, Kojima K, Nakashima N, Jimbo E, Kubota T, Momoi MY, Yamagata T: Familial analysis of mild intellectual disability and microduplication at Xp22.12 including *RPS6KA3*. J Hum Genet submitted.

[学会発表] (計2件)

① Duplication of *GPC3* in the boy with growth retardation and developmental delay. 中島尚美, 第12回国際人類遺伝学会, モントリオール (カナダ), 平成23年10月

13日

② Deletion of MAOA and MAOB in male siblings with severe mental retardation and autistic phenotype. Saito M, Yamagata T, Shiba Y, Nakashima N, Nagashima M, Jimbo E, Momoi MY, 第12回国際人類遺伝学会, モントリオール (カナダ), 平成23年10月13日

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 尚美 (NAKASHIMA NAOMI)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：20337330

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：