

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893252

研究課題名(和文) 足場蛋白および概日リズム遺伝子の変異に起因する自閉症のシナプス病態解明

研究課題名(英文) Synaptic dysfunction of Autism spectrum disorder relating to the dysfunction of scaffold protein and circadian related genes.

研究代表者

松本 歩 (Matsumoto, Ayumi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20458318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害(ASD)のaCGH、変異解析でLin7Bの重複、Exon5のドナーサイトの変異(c.602+1G>C)を検出した。子宮内エレクトロポレーション法でマウス脳のLin7B発現を抑制した結果、大脳皮質の神経細胞の移動障害、アクソン伸長障害を認めた。Lin7Bは神経ネットワーク形成に寄与しASD発症に関与する可能性が示唆された。

また、過半数のASD患者で睡眠障害を合併することから、ASDとコントロールで概日リズム関連遺伝子の変異解析を行い、ASDで有意に概日リズム関連遺伝子の変異を検出した。概日リズム異常がASD発症に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Array comparative genomic hybridization (CGH) analysis for an autism spectrum disorder (ASD) patient, a 73 Kb duplication at 19q13.33 including LIN7B was detected. We then identified a novel frameshift mutation in LIN7B in an ASD patient.

In utero electroporation, suppression of Lin-7B in utero electroporation method resulted the migration of cortical neurons and axon extension to the contralateral hemisphere was delayed.

Lin-7B is possible to be implicated in the pathophysiology in ASD, and abnormal neuronal migration and interhemispheric axon development might contribute to the clinical symptoms of ASD. About 44-83% of children with ASD are suffering from sleep problems. We screened circadian-relevant genes in ASD with and without sleep disturbance group, and control group. In all of ASD (P=0.001), non-synonymous mutations were significantly frequently detected than control group. Circadian-relevant genes may be involved in the psychopathology of ASD.

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 サーカディアンリズム異常

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害(ASD)は、社会性やコミュニケーションの障害、常同性などを特徴とし、小児の約1%の頻度で見られる。社会不適応により患者や家族の困難が強く、治療法開発が急務である。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コピー数多型(CNV)が検出されている(Pinto D, et al. 2010)。また、全エクソーム解析も行われ、約半数の患者で病因候補遺伝子が検出されている(O'Roak BJ, et al. 2012, Sanders SJ, 2012, Neale BM, et al. 2012)。病因遺伝子は多彩である。

2. 研究の目的

ASDの主病態はシナプス構造・機能異常で、特に、シナプス膜下に局在し、シナプス結合分子や受容体等と結合、安定化や機能調節する足場蛋白は、重要な病因分子である。本研究は、ASDの病因遺伝子同定、病態解明と、治療法開発の端緒を作ることを目的とする。

(1) CNV 検出、シナプス関連遺伝子、概日リズム遺伝子変異解析による新たな病因遺伝子同定。

(2) SHANK3、申請者らが検出した LIN7 やの新たに同定され得る病因足場蛋白異常の病態を、培養細胞、マウス子宮内遺伝子導入法などにより機能解析を行う。

(3) 既に変異同定している、概日リズム関連遺伝子とシナプス形成、神経ネットワーク形成との関連解析。

(4) iPS 細胞樹立。足場蛋白結合分子を治療法開発ターゲットとし、関連薬物による治療法開発の端緒を作る。

3. 研究の方法

(1) 患者 DNA を aCGH により CNV を検出し、その領域のシナプス関連遺伝子を抽出した。それらのシナプス関連候補遺伝子と、

概日リズム関連遺伝子 24 個のパネルを複製し、次世代シーケンサーを用いて変異解析した。(2) SHANK3、LIN7、などの足場蛋白変異と症状の相関解析、足場蛋白異常による病態解析は、培養細胞へ変異を導入しシナプス機能を解析した。(3) 新たに同定された病因足場蛋白、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法などにより神経形成への関与と解析を行った。遺伝子改変マウスにより病態解明を行った。(4) 治療法開発として、足場蛋白に結合する神経伝達物質受容体の作動/抑制薬や、結合分子導入による発現増強等の解析を開始した。

4. 研究成果

(1) 足場蛋白 LinB について

ASD 患者において aCGH 解析で 19q13.33 の約 73kb の Lin7B の重複を検出した。また、変異解析で 1 例の Exon5 のドナーサイトの変異 (c.602+1G>C) を検出した。Exon5 がスキップし、変異例では Exon4 と Exon6 が連結し、Exon6 が frame shift していた。これら Exon5 の欠失は蛋白レベルでは PDZ domain の C 端側から約 1/3 に相当し、さらに新たな 30 アミノ酸の付加が見られた。

胎生 14.5 日のマウス脳に子宮内エレクトロポレーション法による機能解析では、Lin7B をノックダウンすると発達期の大脳皮質の移動障害、アクソンの伸長障害がみられた。hLin7B を導入すると移動障害の改善が見られたが、一方、上記変異 (c.602+1G>C) 蛋白の導入では移動障害の改善は得られなかった。Lin7B は大脳皮質の神経細胞の移動やアクソン伸長など神経ネットワークに寄与し、ASD 発症の病因になっていることが示唆された(文献 1)。

(2) シナプス関連および概日リズム関連遺伝子の ASD 患者における変異解析
ASD 睡眠障害なし群 14 例 (男児 5 名、女

児 9 名)、ASD 睡眠あり群 14 例(男児 12 名、女児 2 名)、正常コントロール 23 例に対してシナプス関連候補遺伝子、概日リズム関連遺伝子パネル作製(BMAL、PER、CLOCK など)、次世代シーケンサーを用い、変異解析を行った。

ASD 群では睡眠障害あり群(P=0.007)、なし群(0.002)ともコントロール群と比べ有意に概日リズム関連遺伝子の変異が多く検出された(ASD 全体 vs コントロール群では P=0.001)。概日リズム異常が ASD 発症に関与している可能性が示唆された(文献 3)。

Group	Gene	AA change	Control screening	SNP number	PolyPhen-2 analysis	Mutation t@sting
GroupA ASD 睡眠障害(+)	TIMELESS	p.F498S	0/132	None	damaging	disease causing
	NR1D1	p.S20R	0/133	None	benign	disease causing
	PER3	p.R493C	0/92	None	benign	polymorphism
	CLOCK	p.H542R	0/106	rs3762626	benign	disease causing
	ARNTL2 *	p.L473S	0/78	None	benign	disease causing
	PER3 *	p.R366Q	0/98	rs191016322	damaging	disease causing
	MTNR1B	p.A325V	0/85	None	benign	polymorphism
GroupB ASD 睡眠障害(-)	PER3	p.R493C	0/92	None	benign	polymorphism
	PER1	p.S1241N	0/89	None	benign	polymorphism
	TIMELESS	p.A325T	0/103	rs113125615	damaging	disease causing
	ARNTL	p.S13T	0/92	None	benign	disease causing
	MTNR1B	p.G24E	0/118	rs8192552	benign	polymorphism
control	PER2	p.P1228A	0/94	None	damaging	polymorphism
	PER3	p.T1177A	0/116	rs35072750	benign	polymorphism
	PER2	p.P932L	1/103	None	benign	polymorphism

*同一症例

(3) Circadian 関連遺伝子の解析

既に患者での変異を検出している Timeless のノックアウトマウスに対し、Circadian リズム、形態、行動の解析を行っている。これまでの解析結果では、ホモのノックアウトは生まれず、胎生致死であると考えられた。また、ヘテロの欠失マウスで、環境変化に対する行動の変化と考えられる結果が得られているが、今後、詳細に解析して行く予定である。

(4) ASD、発達障害における aCGH 解析を継続し、疾患との関連が示唆される CNV を複数検出した。

その一つとして、発達障害(学習障害)、母斑、網膜色素沈着、白内障を有する児において 18q12.3 (nt. 39554147-39661206) の欠失を検出した。欠失部は PIK3C3 の Exon5 ~ 23 に該当していた。家族解析で母

斑を有する弟、無症状の母にも同欠失を確認した。PIK3C3 の発現を Western Blotting で解析した結果、患児、弟、母は、コントロールの約半分に低下していた。類縁遺伝子である PIK3CA (class I of PIKs) は母斑症の原因遺伝子である。また、PIK3C3 のノックアウトマウスが白内障、小眼症を発症すると報告されており、さらに、PIK3C3 欠失患者で知的障害、小脳の片側の無形成が報告されている。よって、PIK3C3 は脳の発達にかかわると考えられ、機能解析を行った。胎生 14.5 日のマウス脳に子宮内エレクトロポレーションにより Pik3c3 の発現を抑制した結果、発達期の大脳皮質の神経細胞の移動障害およびアクソンの伸長障害を認めた。これらの結果から、PIK3C3 は発達障害、母斑、白内障の原因遺伝子と考えられた。また、この家系の全エクソーム解析で他の病因遺伝子は検出されず、弟は現時点では母斑のみ、母が正常であることは、浸透率による表現形の違いと推定される(現在、投稿中)。

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)

1. Mizuno M, Matsumoto A, Hamada N, Ito H, Miyauchi A, Jimbo EF, Momoi MY, Tabata H, Yamagata T, Nagata K. Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders. *Journal of neurochemistry*. 2015;132:61-9.
2. Inaguma Y, Ito H, Hara A, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H, Nagata K. Morphological characterization of mammalian timeless in the mouse brain development. *Neuroscience research*. 2015;92:21-8.
3. Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo EF, Kojima K, Nagata K, Iwamoto S,

Yamagata T. Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. *Brain & development*. 2016;38:91-9.

5. Matsumoto A, Nozaki Y, Minami T, Jimbo EF, Shiraishi H, Yamagata T. 6q21-22 deletion syndrome with interrupted aortic arch. *Human genome variation*. 2015;2:15015.

6 Inaguma Y, Ito H, Iwamoto I, Matsumoto A, Yamagata T, Tabata H, Nagata K. Morphological characterization of Class III phosphoinositide 3-kinase during mouse brain development. *Medical molecular morphology*. 2016;49:28-33.

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1 .松本歩、野崎靖之、白石裕比湖、南孝臣、神保恵理子、山形崇倫

脳幹・脳梁低形成と大動脈弓離断を合併した6番染色体長腕の微小欠失例:第37回日本小児遺伝学会学術集会 2014年4月10日 第37回日本小児遺伝学会学術集会,プログラム,抄録集 p51

2 .松本 歩、楊 志亮、小島 華林、中山 一大、神保 恵理子、岩本 禎彦、永田 浩一、山形 崇倫、自閉性障害患者における時計関連遺伝子の変異解析、2014年5月28-31日 第56回日本小児神経学会,プログラム,抄録集

3 .松本 歩、楊 志亮、中野 裕子、中山 一大、神保 恵理子、岩本 禎彦、永田浩一、山形 崇倫、*TIMELESS* mutation in a patient with autism spectrum disorder (ASD) and circadian rhythm disorder.

2015年5月27-30日 第57回日本小児神経学会,プログラム抄録集

4 . Matsumoto A, Inaguma Y, Yang Z, Nakano Y, Goto M, Nakayama K, Jimbo F. E., Hitoshi Osaka H, Iwamoto S,

Nagata K, Yamagata T, Genetic analysis for circadian rhythm abnormality in autism spectrum disorder, 2015, 10/6-10/10, American society of human genetics 65th annual meeting in

Baltimore, USA

〔学会発表〕(計 4 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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松本 歩(Matsumoto Ayumi)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20458318

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: