

機関番号：82611

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591239

研究課題名 (和文) シナプス機能分子 Shank3 に起因した広汎性発達障害の神経病態の解明

研究課題名 (英文) Analysis of neuropathogenesis for autism spectrum disorders caused by mutation of *SHANK3* gene.

研究代表者

内野 茂夫 (UCHINO SHIGEO)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所代謝研究部 室長

研究者番号：30392434

研究成果の概要 (和文)：

本研究は、広汎性発達障害の神経病態を神経細胞の発達・シナプス形成異常と捉え、シナプス機能分子をコードする *SHANK3* 遺伝子に着目し、その異常を分子レベルで解析することにより広汎性発達障害の神経病態の解明を目指すものである。本研究では、重度言語障害・精神遅滞を呈する広汎性発達障害患者における *SHANK3* 遺伝子解析から DNA メチル化に重要な CpG island 領域に複数の変異を見出した。さらに、その領域から新たな *SHANK3* バリエントが発現していること、また、このバリエントが広汎性発達障害の神経病態に深く関与することが判明した。

研究成果の概要 (英文)：

Cumulative evidence has shown that abnormal synaptic function represents neuropathogenesis of autism spectrum disorders (ASDs). In this study, we focused on *SHANK3* gene, which encodes a synaptic molecule and is identified as a responsible gene for 22q13.3 deletion syndrome. We found novel mutations within CpG islands of *SHANK3* gene in ASDs patients, and confirmed the expression of several variants of *SHANK3* transcripts from the CpG island region. Further studies show that *SHANK3* variants are involved in synaptic dysfunction and autistic behaviours.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：広汎性発達障害、シナプス、Shank3、エピジェネティクス、DNA メチル化、MeCP2、ゲノム、脳発達

1. 研究開始当初の背景

自閉症をはじめとする広汎性発達障害は、中枢神経系の機能不全を原因とする脳発達

障害である。現在、罹患率は出生 1000 人あたり 4～5 名といわれており、小児科領域の重要な疾患のひとつである。軽度の障害であ

れば「ソーシャルスキルトレーニング」等の各種プログラムによって健常人に近い社会生活を送ることができるが、根本的治療法は無く、家庭養育はもとより福祉施設においても対応が困難とされる疾患のひとつである。さらに、未診断患者も多数おり、特に軽度の患者に対しては、家庭環境や親の育て方が原因といった誤解を生じていることが多々ある。従って、客観的な診断の実施および病因の解明は、患者の生活の質的向上をもたらすとともに今後の根本的治療法の開発に向け極めて重要な課題である。

Shank 分子は、1999 年、M.Sheng らによって見出されたシナプスに存在するマルチドメイン蛋白質で、我々を含めた多くの研究室から、種々のシナプス機能分子と複合体を形成することが報告された。一方、2001 年、M.C.Bonaglia らは、重度言語障害・精神遅滞を主徴とする広汎性発達障害である 22q13.3 欠失症候群患者の遺伝子解析から、その原因遺伝子の最有力候補として *SHANK3* 遺伝子を報告した。その後のカナダ、米国、英国における患者の遺伝子解析からも、その妥当性がうかがえる。我々も、既に 2 例の *SHANK3* 重複患者を見出し報告した。これらの現状をふまえ、2007 年 7 月の *Science* 誌の記事「Autism's cause may reside in abnormalities at the synapse」では、広汎性発達障害の原因は多岐にわたるが、*SHANK3* 遺伝子異常が数%以上しめ、単一の原因としては最も重要な分子の可能性があると紹介している。

2. 研究の目的

上記の背景を鑑み、本研究では広汎性発達障害の神経病態を神経細胞の発達異常・シナプスの機能異常と捉え、22q13.3 欠失症候群の原因遺伝子である *SHANK3* 遺伝子に着目し、その異常を分子レベルで理解することで、広汎性発達障害の神経病態を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 重度言語障害・精神遅滞を呈する広汎性発達障害患者の診断、血液サンプルの収集および遺伝子診断の実施

患者の診察・診断は、大阪母子保健総合医療センターにおいて発達小児科専門医の岡本伸彦が担当した。

① 遺伝子診断の患者基準の設定

これまでの 22q13.3 欠失症候群患者に関する知見から、過成長傾向および頭囲大で精神遅滞を伴う小児自閉症患者とした。自閉症の診断は DSM-IV に準拠した。

② 患者血液サンプルの収集

インフォームドコンセントをとったうえで患者より数 ml の血液を採血し、それを以

下の遺伝子診断に用いた。

③ 遺伝子診断の実施

SHANK3 遺伝子全長もしくは SH3-PDZ 機能ドメイン (約 5 kb) の特異的プローブを用いた FISH 法にて、遺伝子欠失および重複を診断した。

④ 診断結果に基づいた遺伝カウンセリングの実施

診断の結果、本領域の遺伝子の欠失が確認された患者については、22q13.3 欠失症候群患者として同胞罹患リスク等の情報を開示するなど遺伝カウンセリングを施し、今後の患者の生活の質的向上に努めるとともに、22q13.3 欠失症候群の病態を把握する。一方、欠失が確認されなかった患者については、22q13.3 欠失症候群患者と症状の類似性を考慮し、類似性の高い患者においては以下の *SHANK3* 遺伝子解析を行った。

(2) 遺伝子解析による *SHANK3* 遺伝子配列・構造異常の探索

個人情報保護に基づき、全ての患者サンプルを匿名化後、*SHANK3* 遺伝子全 22 エクソンについて、DNA シーケンス法を用いて塩基配列を決定した。コントロールサンプルは国立精神・神経医療研究センターが有するサンプルを用いた。

(3) *SHANK3* 遺伝子異常に基づく機能解析

① ゲノム DNA のメチル化解析

発達期のマウス (胎生 17 日齢、生後 1 日齢、7 日齢、14 日齢、20 日齢、4 週齢、12 週齢) の大脳皮質からゲノム DNA を抽出し、メチル化 DNA に対して反応性が異なる 2 つの制限酵素 (*HpaII*: 非メチル化 DNA を消化、*McrBC*: メチル化 DNA を消化) により消化後、*SHANK3* 遺伝子の 5 つの CpG island 領域に対応するプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物を電気泳動し、得られたバンドの強度を定量的に解析した。

② クロマチン免疫沈降

生後 1 日および 14 日齢のマウスの大脳皮質を用いて、常法に従いクロマチン免疫沈降を行った。ゲノム DNA は超音波処理にて断片化した。免疫沈降には MeCP2 抗体 (upstate) を使用した。

③ ルシフェラーゼを用いたプロモーター活性測定

ルシフェラーゼレポーターベクター (pGL3-Basic) に検索する *SHANK3* 遺伝子断片を挿入し、内部コントロールベクター (pRL-TK) とともに HEK293 細胞に導入した。48 時間後に細胞を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

本研究で実施したヒトゲノム解析は、国立精

神・神経医療研究センターならびに大阪母子保健総合医療センターが定める倫理規定に則り、各々の委員会の承認を得て行った。また、マウスをはじめとする動物実験において、動物愛護の精神に基づき、国立精神・神経医療研究センター神経研究所が定める倫理規定に則り、動物委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) 重度言語障害・精神遅滞を呈する広汎性発達障害患者の診断、血液サンプルの収集および遺伝子診断の実施

重度言語障害・精神遅滞を呈する広汎性発達障害患者 134 例について *SHANK3* 特異的プローブを用いた FISH 法により遺伝子診断を実施した結果、6 例の患者で *SHANK3* 遺伝子の欠損を確認した。これらの患者を 22q13.3 欠失症候群と診断し、その後遺伝カウンセリングを実施した。

(2) 遺伝子解析による *SHANK3* 遺伝子配列・構造異常の探索

上記の FISH 診断で陰性であった 128 例の患者について、シーケンス法を用いて *SHANK3* 遺伝子配列を解析した。その結果、7 例に新規変異を見出した。これらの変異はコントロールサンプル 228 例では確認されなかった。さらに、新規な 2 アミノ酸挿入バリエント、これまでに報告されている 3 つのミスセンスバリエントを見出した。また、5 カ所において新たな SNPs、を見出した。全ての結果を論文にまとめ報告した (Waga et al., Psychiatr. Genet., 2001)。

上記の新規変異について、特に DNA メチル化に重要とされている CpG island において複数見出された。中でも、CpG island-2 内の SH3 領域直上流 18 bp (6 アミノ酸) 欠失 (1 例)、および exon11 直下 (intron11) における 10 bp の繰り返し配列 (CGCGGGGGG) (図 1) の挿入 (3 例) および欠失 (1 例) は非常に興味深い。挿入変異を持つ患者のうち 2 人は姉弟の同一家系である。別の家系の 1 人を含め、3 人の臨床症状ならびに体格 (頭囲大) は酷似している。一方、欠失患者は *UBE3A* 遺伝子にも変異を持ち、Angelman 症候群と診断された。14 歳でも有意語は無く、発達指数 (Developmental Quotient) 18 と極めて重篤な精神遅滞を呈していた。

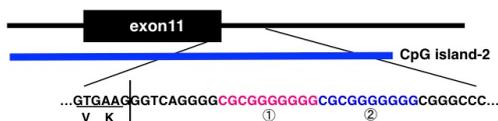


図 1. exon11 直下流の 10 bp 繰り返し配列

(3) *SHANK3* 遺伝子異常に基づく機能解析

CpG island 内に複数の変異が見出されたことから、まず *SHANK3* 遺伝子のメチル化の動態について検討した。ヒトおよびマウスゲノムにおいて、CpG island 領域はよく保存されている。従って、マウスの脳発達過程におけるメチル化の割合を検討した。

脳発達期 (胎生 17 日～生後 3 ヶ月齢) のマウスの大脳皮質において、*SHANK3* 遺伝子上にある 5 つの CpG island 領域のメチル化動態を検討した結果、全ての時期で CpG P (プロモーター領域) は非メチル、CpG island-3 はメチル化されていた。一方、CpG island-2、-4、-5 においては、生後直後は非メチルであるものの、その後脳の発達にともないメチル化されることがわかった (図 2)。

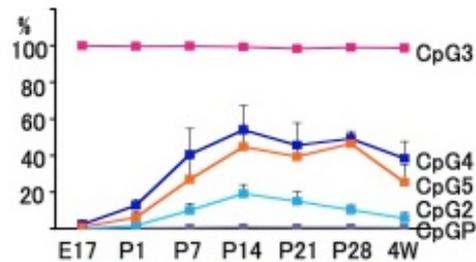


図 2. マウス脳発達過程における CpG island メチル化変動

また、CpG island-2、-3、-4 にはメチル化 CpG 結合蛋白質 2 (MeCP2) が結合することを見出した (図 3)。MeCP2 は女兒の自閉性疾患である Rett 症候群の責任遺伝子であり、その遺伝子産物は転写抑制因子として機能する。Rett 症候群は 22q13.3 欠失症候群と臨床症状が類似していることから、非常に興味深い知見である。

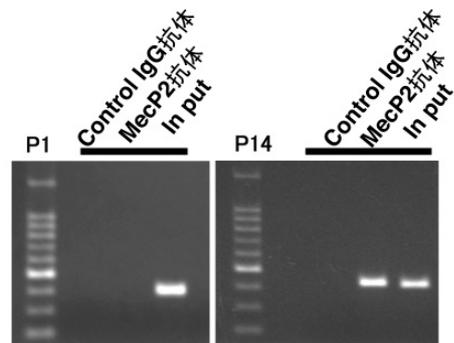


図 3. MeCP2 抗体を用いた CpG island-2 領域のクロマチン免疫沈降

さらに、我々は CpG island-2 から転写される新たな *SHANK3* バリエントを確認した。そ

の転写開始点は intron10 および intron11 に位置していた。また、定量 RT-PCR 法を用いて、MeCP2 ノックアウトマウスにおいて、新たな SHANK3 バリエントの発現がコントロールマウスと異なることを確認した (図4)。MeCP2 は転写抑制因子として知られている。そこで、CpG island-2 領域においてプロモーター活性を検討した結果、一部の領域でプロモーター活性を確認した。

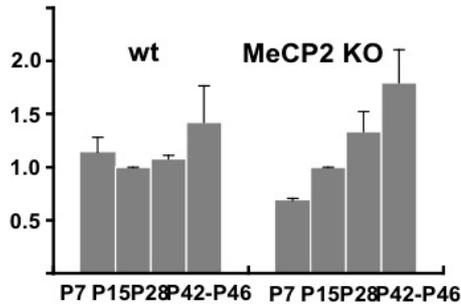


図4. MeCP2 ノックアウトマウスにおける SHANK3 バリエントの発現

近年、Bozdagi らは全長 Shank3 の半量欠損マウスを作製したところ、シナプス伝達に異常が見られたものの、自閉的行動を含む明らかな行動異常は観察されなかった。本マウスは exon10 以降の遺伝子が残されているため、CpG island-2 からの Shank3 バリエントが発現している (Bozdagi et al, Mol. Autism, 1, 15, 2010)。一方、Peca らは全長とともに CpG island-2 からのバリエントも欠失させたマウスを作製した。その結果、自閉症様行動が観察されたことから、本バリエントが自閉症の神経病態に深く関与する可能性が示された (Peca et al., Nature, 472, 437-442, 2011)。現在、我々は、本バリエントのコンディショナルノックアウトマウスを作製中である。このマウスを用いることで、自閉症に関わる脳領域や発達時期のより詳細な解析が期待される。

以上、シナプス機能分子である Shank3 は広汎性発達障害の神経病因・病態に深く関与することが判明した。本研究では、患者のゲノム解析を通じて得られた知見から、新たな SHANK3 バリエントの存在ならびにその発現機構の一部を明らかにした。特に、MeCP2 が原因遺伝子と考えられている発達障害 Rett 症候群のシナプス病態の分子基盤に、Shank3 バリエントが関与する可能性を示唆したことで、Rett 症候群と 22q13.3 欠失症候群の臨床的類似性の妥当性が理解できる。今後、広汎性発達障害の神経病態の解明を目指し、さらなる研究の発展が期待できる。

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7件)

- ① Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Goto Y, Kohsaka S, Uchino S (2011) Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr. Genet.*, DOI: 10.1097/YPG.0b013e328341e069 査読あり
- ② Uchino S, Hirasawa T, Tabata H, Gonda Y, Waga C, Ondo Y, Nakajima K, Kohsaka S. (2010) Inhibition of NMDA receptor activity resulted in aberrant neuronal migration caused by delayed morphological development in the mouse neocortex. *Neuroscience*, 169, 609-618. 査読あり
- ③ Namba T, Yabe T, Gonda Y, Ichikawa N, Sanagi T, Hirasawa E, Mochizuki H, Kohsaka S, Uchino S. (2010) PEDF up-regulation induced by memantine, an NMDA receptor antagonist, is involved in the increased proliferation hippocampal progenitor cells. *Neuroscience*, 167, 372-383. 査読あり
- ④ Namba T, Maekawa T, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S. (2009) The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in the adult hippocampus. *GLIA*, 57, 1082-1090. 査読あり
- ⑤ Maekawa T, Namba T, Suzuki E, Yuasa S, Kohsaka S, Uchino S. (2009) NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus. *Neurosci. Res.*, 63, 259-266. 査読あり

[学会発表] (計31件)

- ① 和賀央子、浅野弘嗣、加藤怜子、伊藤雅之、後藤雄一、内野茂夫、高坂新一、第40回日本神経精神薬理学会・第20回臨床精神神経薬理学会 仙台 9.16.2010. 自閉症関連遺伝子 SHANK3 のマウス脳発達過程におけるメチル化動態解析およびその分子基盤に関する研究
- ② 和賀央子、浅野弘嗣、加藤怜子、伊藤雅之、後藤雄一、内野茂夫、高坂新一、第33回日本神経科学会・第53回日本神経化学会・第20回日本神経回路学会 神戸 9.2.2010. マウス脳発達過程における自閉症関連遺伝子 SHANK3 のメチル化動態解析
- ③ Uchino S, Waga C, Okamoto N, Goto Y, Kohsaka S. The 22nd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry

(ISN)/Asian Pacific Society for Neurochemistry (APSN) Joint Meeting. Busan, Korea, 8. 27. 2009. Novel mutations in the SHANK3 gene in autistic patients with severe delayed speech development.

④内野茂夫、和賀央子、岡本伸彦、高坂新一
第 51 回日本神経化学会、シンポジウム「発達障害の神経化学」 富山 9.13.2008. 自閉症患者におけるシナプス機能分子 SHANK3 の遺伝子解析

⑤岡本伸彦、内野茂夫、第 50 回日本小児神経学会 東京 5.29.2008. SHANK3 異常症例の臨床的検討

[その他]

ホームページ等

研究部ホームページ

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_tai/index.html

本研究により得られたゲノム解析結果

DNA Data Bank of Japan (DDBJ)

ヒト：AB569469

マーモセット：AB447516

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内野 茂夫 (UCHINO SHIGEO)

(独) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所代謝研究部・室長
研究者番号：3 0 3 9 2 4 3 4

(2) 研究分担者

伊藤 雅之 (ITO MASAYUKI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所疾病研究第二部・室長
研究者番号：5 0 2 4 3 4 0 7

(3) 連携研究者

岡本 伸彦 (OKAMOTO NOBUHIKO)

大阪府立母子保健総合医療センター
研究所・参事・小児科医
研究者番号：0 3 4 1 6 2 4 2

難波 隆志 (NAMBA TAKASHI)

(独) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所代謝研究部・流動研究員
研究者番号：7 0 4 6 2 7 9 4

和賀 央子 (WAGA CHIKAKO)

(独) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所代謝研究部・流動研究員
研究者番号：8 0 4 6 2 7 9 5

権田 裕子 (GONDA YUKO)

(独) 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所代謝研究部・流動研究員
研究者番号：6 0 4 2 4 1 8 1