

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：82611
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791207
 研究課題名（和文） 精神遅滞・広汎性発達障害におけるシナプス機能分子の遺伝解析および機能異常の検証
 研究課題名（英文） Genetic and functional analysis of synaptic molecule in mental retardation and pervasive developmental disorder.
 研究代表者
 和賀央子（WAGA CHIKAKO）
 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 疾病研究第二部 科研費研究員
 研究者番号：80462795

研究成果の概要（和文）：

精神遅滞および広汎性発達障害は中枢神経系の発達機能獲得異常とされていることから、本研究では精神遅滞バイオリソースレポジトリの DNA サンプルを用いて、シナプス関連分子である *SYP*, *RAB39B*, *GRIA3*, *SHANK3* の遺伝子解析を行い、*SYP* において 1 例のナンセンス変異、1 例のミスセンス変異、*SHANK3* 遺伝子においては 8 か所のミスセンス変異を 10 例の患者から検出した。

研究成果の概要（英文）：

Cumulative evidence has shown that abnormal synaptic function represent neuropathogenesis of mental retardation (MR) and pervasive developmental disorder (PDD), and one of the major causes are gene mutation. In this study, we focused on *SYP*, *RAB39B*, *GRIA3* and *SHANK3* genes, which encode synaptic molecules, and analyzed those genes in MR and PDD patients. We found 2 novel mutations in *SYP* gene, and 8 novel missense mutations in *SHANK3* gene in patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：精神遅滞、広汎性発達障害 シナプス 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

精神遅滞および自閉症を含めた広汎性発達障害は中枢神経系の発達の機能獲得不全を原因とする疾患である。現在、両疾患の合計罹患率は出生 100 人に 1 人といわれており、小児科領域の重要な疾患のひとつであるが、病因が解明されていないことから根本的な治療法の開発には至っていない。

本疾患の多くは 3 歳までに発症するとさ

れているが、最近の研究では 1 歳の時点ですでに脳発達に変化が起こっていると考えられている (Hazlett, et al. Arch. Gen. Psychiatry, 2005)。これまでの精神遅滞・広汎性発達障害患者の遺伝子解析により、ニューロリジンやニューレキシンなどシナプス機能にかかわる分子の遺伝子変異が報告されたことから、精神遅滞・広汎性発達障害の原因のひとつの可能性は「脳発

達期のシナプスの形成および成熟異常」であると考えられている (Garber, Science, 2007)。さらに申請者は重度言語障害を呈する 128 例の広汎性発達障害患者においてシナプス機能分子の一つである *SHANK3* 遺伝子のゲノム解析を行い新規の変異を 6 例に見出した (Waga et al. Psychiatr. Genet. 2011)。

精神遅滞・広汎性発達障害患者の双生児研究から疾患の発症には遺伝的要因が大きく関与していると考えられており、発症の男女比は 3:1 と男児で多いことから、特に X 染色体上に原因遺伝子が存在する可能性が高いことを示唆している。以上のことから、精神遅滞・広汎性発達障害発症の原因のキーワードとして、シナプスの成熟・機能異常、X 染色体が挙げられる。

米国ではボストン地域の 11 の医療研究機関で自閉症コンソーシアムが設立、米国自閉症患者 3700 人が登録されており、大規模な遺伝解析が行われているのに対し、日本においては患者数が多いものの、遺伝子解析は遅れているのが現状である。その中で申請者が所属する国立精神・神経医療研究センターでは精神遅滞・広汎性発達障害患者家系の患者およびその家族の血液細胞より細胞株が樹立され、約 360 家系が家系情報 (家族歴) と共にバイオリソースとして保存・管理されている。申請者の研究グループは精神遅滞・広汎性発達障害の発症因子特定のため 2005 年までに学術論文において候補遺伝子と報告されていた X 染色体上の 19 遺伝子を対象に遺伝子解析を行い、約 15% の患者でなんらかの遺伝子の変異を検出した。しかしながら 2005 年以降、候補遺伝子は約 20 以上増えており、残りの 85% の患者において原因特定のためにこれら遺伝子の解析が急務であると

考えられた。

2. 研究の目的

本研究では精神遅滞・広汎性発達障害の発症をシナプス機能の異常としてとらえ、日本における本疾患症例の原因特定のため、X 染色体上に存在するシナプス関連分子シナプトフィジン (*SYP*), *RAB39B*, *GRIA3*, そして 128 例中 6 例と遺伝子変異が認められたシナプス機能分子 *SHANK3* (22q13 領域) の 4 遺伝子に着目し、研究所が保有する 360 家系のバイオリソースを用いて遺伝子解析を行い、これら遺伝子変異による症例の実態を把握すること、そして患者由来の遺伝子異常に基づいた病態解明を目指した機能解析への実験の構築との検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) *SYP*, *RAB39B*, *GRIA3*, *SHANK3* 遺伝子解析

1)-1 *SYP*, *RAB39B*, *GRIA3* 遺伝子

解析対象: *SYP*, *RAB39B*, *GRIA3* 遺伝子は X 染色体上に位置していることから

(*SYP*: Xp11. 23-p11. 22 *RAB39B*: Xq28

GRIA3: Xq25)、精神遅滞・バイオリソースレポジトリに登録されている家系から X 連鎖性の疑われる家系を抽出し、53 例の男児患者を XLMR 群、また X 連鎖性の可能性が低い男性患者および孤発例男性患者 132 例を non-XLMR 群として解析を行った。

ゲノム解析: *SYP*, *RAB39B*, *GRIA3* 遺伝子の各エクソンおよびエクソン-イントロン境界部を含むようにプライマーを設計し、PCRダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定の後、SeqScape ver. 2. 6 ソフトウェアを用いてリファレンスシーケンスとの比較解析を行い、変異の検出を行った。

1)-2 SHANK3 遺伝子 (22q13.3)

解析対象: 精神遅滞バイオリソースレポジトリから無作為に 270 例を抽出し対象とした。

ゲノム解析: SHANK3 遺伝子のエクソンおよびエクソン-イントロン境界部を含むようにプライマーを設計し、PCR ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定の後、SeqScape ver. 2.6 ソフトウェアを用いてリファレンスシーケンスとの比較解析を行い、変異の検出を行った。

2) トラップベクターを用いた SHANK3 遺伝子 intron11 変異のスプライシング解析

SHANK3 遺伝子 intron10 から exon11 exon12 を含む intron12 までの約 1.5kbp を PCR 法にて増幅し、スプライシング異常を検出するための pET-01 Exontrap cloning vector (Mo Bi Tec) に組み込み SHANK3 遺伝子の野生型および患者から検出された c.1498+214_256del 変異型ベクターをそれぞれ作成した。その後、HeLa 細胞にそれぞれのベクターおよび empty vector をトランスフェクション後、24 時間培養しその後 total RNA を精製、cDNA を合成した。RT-PCR およびシーケンス解析を行い、SHANK3-exon11 および exon12 領域におけるスプライシング異常の有無を確認した。

4. 研究成果

1) SYP, RAB39B, GRIA3, SHANK3 遺伝子解析

1)-1 SYP, RAB39B, GRIA3 遺伝子解析

それぞれの遺伝子解析結果について表 1 に示し、また変異が検出された SYP 遺伝子の構造と変異の位置および種間の保存性に

ついては図 1 に示した。SYP 遺伝子において、XLMR 群から 1 例のナンセンス変異、1 例のミスセンス変異を検出した。non-XLMR 群においては検出されなかった。また RAB39B および GRIA3 遺伝子において患者特異的な変異は検出されなかった。SYP 遺伝子における p. G299A 変異についてはタンパク質相互作用に重要なペプタペプチドリピート領域に存在し、種間の保存性も高いことから、機能的意味を持つ可能性が高いと考えられた。

表 1. X 染色体における 3 遺伝子解析結果

gene	XLMR群	non-XLMR群	計
SYP	2/53 (3.8)	0/132 (0)	2/185 (1.1)
RAB39B	0/53 (0)	0/112 (0)	0/165 (0)
GRIA3*	0/53 (0)	0/84 (0)	0/137 (0)

陽性所見数/解析数 (%)

*exon1 領域 PCR 増幅困難のため 74 例未解析

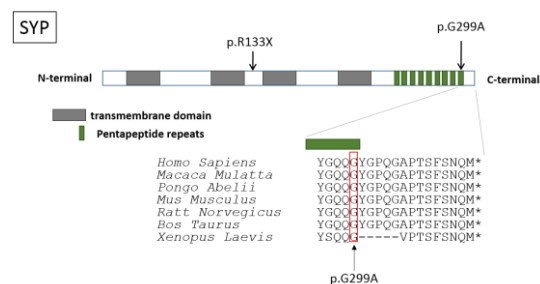


図 1. SYP 遺伝子の構造と検出した変異の位置および種間における保存性

1)-2 SHANK3 遺伝子

SHANK3 の構造と変異の位置について 2 に示した。患者 270 例の遺伝子解析の結果、これまでに報告のない新規変異が 8 か所 10 名の患者から検出された。また Polyphen2 による遺伝子の種間における保存性および構造から検出された遺伝子変異が分子に与える影響について予測解析を行った結果、図 2 において赤字で示した 5 つの変異で SHANK3 機能に影響を与える可能性が示された。特に AMPA 受容体や PSD95 に相互作用が報告されている (uchino et al, 2006) PDZ ドメイン内に検出された p. R625C 変異はこれらの分子との結合に

何らかの影響を与える可能性が高いと考えられた。

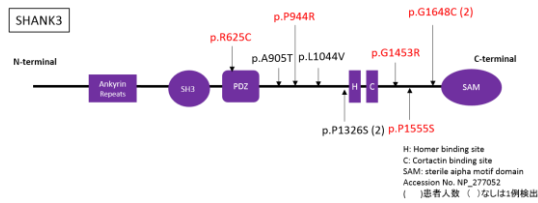


図 2. SHANK3 遺伝子の構造と変異の位置

さらに intron 10 および intron11 の領域にも新たな変異 5 種を 6 例の患者から見いだした (図 3)。

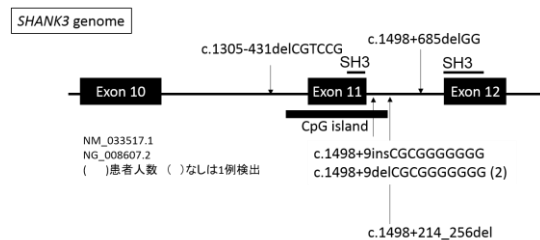


図 3. SHANK3 遺伝子構造 (一部) と患者から検出された変異

申請者はこれまでに intron10 から複数の SHANK3 アイソフォームが発現していること、さらにこの領域に女兒特有の言語・運動発達遅延、知能障害を呈するレット症候群の原因分子である methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) が結合し、そのアイソフォームの発現制御に関わっていることを見出している (論文投稿中)。さらに近年、SHANK3 全長およびアイソフォームを欠失させたマウスの解析がなされ、その行動解析から自閉症様行動を示すことが報告された (Peca et al, Nature 472, 2011)。SHANK3 全長のみを半量欠損したマウスにおいては行動に変化をもたらさないことも報告されていたことから (Bozdagi et al, Mol. Autism, 115, 2010)、SHANK3 のアイソフォームは疾患発症に重要な役割を担っていることが予想される。本研究において検出され

た Intoron における変異は SHANK3 アイソフォームの発現に關与する可能性があり、今後 MeCP2 との結合および SHANK3 アイソフォームの発現に及ぼす影響について検討が必要であると考えられた。

2) トラップベクターを用いた SHANK3 遺伝子 intron11 変異のスプライシング解析

電気泳動 (図 4) およびシーケンス解析の結果、SHANK3 遺伝子 c. 1498+214_256del の変異においても野生型と同様に exon11-exon12 と正常にスプライシングされている所見が確認でき異常所見は認められなかった。

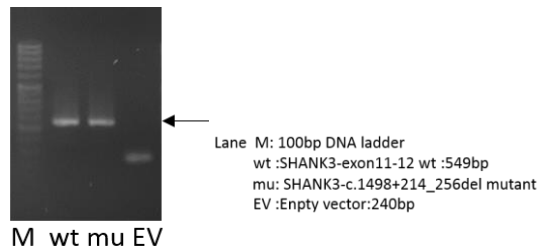


図 4. pET-01 Exontrap cloning vector を用いた c. 1498+214_256del 変異におけるスプライシング異常の確認

以上、本件研究期間における精神遅滞・広汎性発達障害における遺伝子解析から SYP 遺伝子でナンセンス変異 1 例、ミスセンス変異 1 例 (全体の 1.1%)、SHANK3 遺伝子では 8 か所の変異を 10 例患者において新規ミスセンス変異を見出した (全体の 3.7%)。本研究期間内では変異における機能的影響について十分に検討できなかったため、今後の研究課題であるが、機能的な解析を積み重ねること、遺伝子の異常に基づいた本疾患の病態が明らかになると考えられる。また、遺伝子変異を持つ患者の臨床症状に共通項を見出すことにより、早期診断への情報となることが期待できる。SYP, RAB39B, GRIA3 遺伝子解

析では X連鎖性を疑う家系において、陽性所見の出現率は 3.8%、non-XLMR 群では 0%であった。このことから家系情報が診断に重要な役割を担うことがわかり、そしてその情報に基づいた X染色体の遺伝子検査は有効であることが示された。

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)

1. Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Fukumura-Kato R, Goto YI, Kohsaka S, Uchino S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr Genet.* 2011, 21(4):208-11.
doi:10.1097/YPG.0b013e328341e069.

[学会発表] (計 4 件)

1. Waga C, Okamoto N, Asano H, Goto YI, Uchino S, Kohsaka S. Mutations in the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development and mental retardation. The 12th International Congress of Human Genetics (ICHG) and the 61st The American Society of Human Genetics (ASHG) Annual Meeting. 10.13. 2011. Le Palais des congres, Montreal, Canada,
2. 和賀央子, 浅野弘嗣, 岡本伸彦, 土屋明子, 伊藤雅之, 後藤雄一, 内野茂夫, 高坂新一 自閉症関連遺伝子SHANK3のマウス大脳皮質発達過程におけるバリエーション発現解析. 包括脳ネットワーク

夏のワークショップ 2011. 8. 23神戸国際会議場、兵庫

3. 和賀央子, 浅野弘嗣, 土屋明子, 後藤雄一, 伊藤雅之, 内野茂夫, 高坂新一 自閉症関連分子Shank3のマウス大脳皮質における新規バリエーション解析. 第 21 回臨床精神神経薬理学会・第 41 回日本神経精神薬理学会 2011. 10. 28 京王プラザホテル、東京
4. 和賀央子, 澤野由枝, 竹下絵里, 中川栄二, 後藤雄一 X連鎖性が疑われる精神発達遅滞患者の候補遺伝子解析. 日本文学遺伝学会 第57回大会 2012. 10. 27 京王プラザホテル 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和賀央子 (WAGA Chikako)

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 疾病研究第二部 科研費研究員

研究者番号 : 80462795