

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18390301

研究課題名（和文） 自閉性障害における遺伝子発現プロファイリングによる
共通分子機構の解析

研究課題名（英文） Research on the common molecular pathology for autism

研究代表者

桃井 真里子 (MOMOI MARIKO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90166348

研究成果の概要：自閉性障害の分子機構の解明のために、原因遺伝子検索、遺伝子発現プロファイリング、遺伝子改変マウスによる分子病態の解析を実施した。ヒト変異を有する FOXP2 遺伝子改変マウスの homozygote では変異遺伝子産物は核に輸送されず細胞質内に停留する分子病態を確認した。さらに、シナプス接着蛋白遺伝子である CADM1 に 2 個の変異を検出し、遺伝子欠損マウスにおける社会性行動異常を確認した。罹患者の末梢血球における遺伝子発現解析では、GPCR 群の発現が有意に増加しており、原因分子病態の結果を反映すると考えられた。また、一部の罹患者において、MECP2 で制御を受ける DLX5 の発現が増加していた。同様に制御される DLX6 には罹患者同胞にミスセンス変異を認めたことから、これらの遺伝子が病態に関与する可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

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：自閉性障害、シナプス形成、CADM1, FOXP2

1. 研究開始当初の背景

自閉性障害 (ASD) は、発症の増加が報告されており、その社会性障害から、社会不適応、さらには二次的精神疾患を生じるリスクの

高い発達障害として、病態解明と分子病態に沿った治療法開発が要望されている疾患群である。研究開始時点では、1999 年に Rett 症候群の原因遺伝子 *MECP2* が報告され、2003

年に *NLG3, 4* の変異が報告され、さらに、シナプス骨格蛋白遺伝子のひとつである *SHANK3* に変異が検出されるにいたり、ASD の分子病態の一部は、シナプス形成、機能にあることが推定されてきた。その一方で、これらの遺伝子に変異が検出される例はそれぞれ約 200 例に 1 例であることから、変異探索と同時に、共通分子機構の解明へと研究の方向が示されてきた。さらに、異なる疾患関連遺伝子の変異による共通の分子病態は検出されておらず、自閉性障害に共通分子病態があるのか、あるいは、生物学的指標で複数の疾患に分類されるべき病態なのかも不明であった。これらを背景として、申請者らは、自閉性障害の原因遺伝子探索を進め、研究開始までに、MECP2 のファミリーに属する MBD1 に変異を、言語障害の原因遺伝子である FOXP2 に自閉性障害に有意に多い塩基配列を報告してきた。それらをさらに進めて、本研究では、共通分子機構の解析のために、変異遺伝子の同定、変異を導入した、あるいは原因遺伝子欠損のマウスモデルでの分子病態の解析、共通の遺伝子発現の異常の検出を研究の構想として立案し実施した。

2. 研究の目的

ASD の原因遺伝子検索と共通分子病態の解明を目的として、第一に、シナプス形成・機能関連遺伝子の変異スクリーニングを実施した。これにより、遺伝子変異が閉める範囲が明瞭になることが期待された。さらに、変異が検出された遺伝子を欠損するマウス、および、変異を導入した遺伝子改変マウスを作成し、行動解析、および分子病態解析に供した。共通遺伝子発現異常の検出を目的として、罹患者末梢血球における遺伝子発現を脳らかに解析し、一方で、変異を有する遺伝子と

関連する遺伝子群について発現を解析し、病態との関連を検討した。これらにより、ASD における共通の分子機構の抽出が最終目的である。

3. 研究の方法

① 遺伝子変異解析: ASD 罹患者末梢血試料は、日本人罹患者 (小児) からは、親の承諾を得て、採血し、リンパ芽球を保存し DNA 解析、RNA 解析に使用した。Caucasian 罹患者の DNA 試料は USA の AGREConsotium から得た細胞から DNA を得た。Cuacasian の正常対照 DNA も同様に入手した。

② 変異解析対象遺伝子は、シナプス形成、機能に関与する接着蛋白、および GPCR 群、および、MECP2 で発現制御される DLX5, 6 とした。方法は、大部分の遺伝子は DHPLC によるフラグメント解析で変異スクリーニングをし、直接塩基配列決定法で変異を決定した。機能的に関連性が示唆される遺伝子については、直接塩基配列決定法で全 exon、および exon-intron 境界を解析した。正常対照は、同意を得た正常者の試料を使用した。

③ リンパ芽球の遺伝子発現解析は、real-time PCR system (ABI) で内部標準を GAPDH 遺伝子として半定量的に解析した。細胞は一定の条件化で培養されたものを使用し、3 回計測した平均値を求めた。

④ 検出した変異をもつ遺伝子は、site-specific mutagenesis で作成された変異遺伝子は塩基配列を確認後、pcDNA4/T0/myc-HisExpression Vector に挿入され、C2C5 細胞に導入された。蛋白発現、および分子量解析はウサギ抗-His 抗体で免

疫細胞染色で細胞内局在等を解析された。

⑤ 本研究は、自治医科大学研究倫理委員会の審査承認を得て実施された。DNA 試料、血液試料は、連結可能な匿名化システムで保管され、主任研究者、共同研究者以外は、連結が不可能であり、個人情報保護されている。

4. 研究成果

① ASD 関連遺伝子変異の同定：シナプス接着蛋白のひとつである RA175/SynCAM/CADM1 (CADM1) は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する蛋白で、シナプスでは homodimer を形成し、接着機能を果たす。Caucasian 試料 195、日本人試料 180、それぞれ対照試料 200 で変異解析を実施し、Caucasian 2 名の罹患者に C739A (H246N)、A755C (Y251S) の変異を検出した。200 名の正常対照では検出されず、正常者にはない塩基配列と推定され、ASD 関連変異と考えられた。それぞれの家系で罹患同胞に検出され、非罹患者母、または父に検出された。1 家系では非罹患者女性同胞に検出された。変異が同定された父親は、小児期に言語発達の問題で療育をうけた経過があったが、詳細は不明である。変異が同定された母親には発達上、言語上の問題の記載はなかった。2 変異ともに N 端から 3 番目の immunoglobulin domain 上極めて互いに近傍であった。変異遺伝子を導入した C2C5 細胞上では、wild-type 蛋白に比して、膜上への発現は減少し、細胞質に発現が検出される細胞は wild-type が 2% に比して 50%、32% と明らかに多く、変異蛋白は低分子量の発現が多かった。このことは、ASD 関連遺伝子変異によりシナプス前、後膜上に発現する接着蛋白量が減少していること、変異蛋白は所定の位置への輸送が傷害され、細胞質で蛋白分解

を受けること、が示唆された。変異蛋白の分解、膜上への機能蛋白の減少が、シナプス形成、および機能の障害にいたることが推察された。遺伝子改変マウスによる行動異常の解析が進められている。

家系内正常女性に罹患者と同一変異が同定されたことは、ASD の男女差と一致する所見であった。ASD は浸透率の多様な常染色体優性遺伝する疾患であるとする遺伝学的報告とも一致しており、同定された変異は同遺伝子に関しては常にヘテロであり、女性は変異を有しても、発症しない機構があることを示唆している。これらは、研究者らが報告した MBD1 においても同様であったことから、ASD に共通のパターンであると推定される。

② ASD 関連遺伝子発現異常の同定：罹患日本人のリンパ芽球で遺伝子発現を網羅的アレイ解析し、さらに機能別クラスター解析を実施した。正常対照と ASD で有意な差は、GPCR 群であり、 $P < 10^{-14}$ で発現増加を認めた。GABAR 群、DopamineR 群、serotoninR 群には、群としての有意差は検出されなかった。特定の GPCR 2 個にミスセンス変異が検出されていることから (in prep)、欠損病態の修復機能として増加している可能性を示唆した。変異を導入した遺伝子改変マウスにおいて同様の GPCR 発現増加を解析し、末梢血における増加が確認された (in prep)。

③ MECP2 がメチル化部位に結合する遺伝子の発現、変異解析：ASD 罹患者リンパ芽球においては、DLX5 の発現が一部の罹患者で増加していた。増加群と正常と同等群では臨床的差はなかった。さらに、DXL6 に G656A を検出した。これは正常対照には検出されなかった。同胞罹患者にも同様の変異が同定された。親の解析は非同意で実施されなかった。MECP2

変異は Rett 症候群において発現抑制機能の障害ではなく発現促進機能の障害が病態と関連するという報告に合致する結果であり、DLX6 蛋白の発現障害が ASD 病態と関連する可能性を示唆した。DLX6 発現と、シナプス機能との関連は今後の課題である。

④ 研究者らが 2005 年に ASD 罹患者に有意に多い SNP を FOXP2 に報告したこと、および、FOXP2 変異病態と ASD が一部重複することから、言語障害の変異を導入した遺伝子改変マウスにおける解析を実施した。変異遺伝子導入細胞において変異蛋白は、細胞質に局在し、核への移動が障害されていた。変異遺伝子導入マウスではヘテロで軽度のホモで重度の小脳低形成があり Purkinje 細胞異常が検出された。体重も homo では生後 10 日ですでに 30% 小さく、成長障害あがると同時に、脳全体の成長も小さいことが検出された。遺伝子改変マウスでは、超音波音声記録において、コミュニケーションツールとしての超音波音声正常マウスに比してきわめて低いことが検出され、この方法が、ASD モデルの行動解析に加えて、コミュニケーション障害の検出法となる可能性を示唆した。

以上の成果から、ASD では単一遺伝子の変異は罹患者の 0.5-1% の頻度で検出されることから、原因遺伝子は 100 に及ぶことが推定された。CADM1 の変異は、2 箇所とも種を超えて保存されている箇所であり、病態関連変異である可能性が高い。CADM1 の欠損、あるいは、減少はシナプス形成、機能に障害を呈することが推定され、ASD の基本病態がシナプス形成・機能障害にあることを強く示唆している。すでに報告された NLG3, 4 とともに、これらのシナプス形成蛋白の所定の部位への発現障害がシナプス機能を障害し、その反

映として GPCR 群の発現増加等の二次的異常を呈する可能性が示唆された。GPCR は多数の遺伝子が発現増加を呈することから、機能補完のための二次的現象なのか、原因遺伝子変異による一時的病態なのかは、モデルマウスにおいて今後の課題である。

DLX5, 6 の発現異常、変異とシナプス機能障害、および GPCR 発現異常との関係は今後の課題である。これらは、罹患者リンパ芽球での成果であり、脳内における遺伝子発現異常ではない。脳と末梢血では発現プロファイルを約 40% 共有するという報告もあり、リンパ芽球における発現異常が脳との共通現象である可能性があると同時に、脳での発現と共通ではない場合でも、ASD の分子指標となる可能性がある。

FOXP2 のヒト変異導入マウスにおいて、ヘテロでは致死ではないが、ホモでは半数が致死であり、出生マウスも早期に成長障害を呈することは、ASD の遺伝子変異のすべてが、ヘテロで報告されていることと合致している。ヘテロでは、親を呼ぶ音声記録が中等度に障害され、ホモでは大部分が消失、あるいは減少していることは、ヒトのヘテロでは生命に影響ない形質であることと合致している。

CADM1 の 2 変異が近傍に存在したことも、どちらもヘテロであったことも、病因遺伝子変異であることを強く示唆する所見である。

CADM1 変異導入マウスにおいても社会性障害が検出されており (in prep)、マウスの脳の遺伝子発現解析により、ヒト ASD リンパ芽球で検出された遺伝子発現の異常が、病態と関連している共通分子現象であることが示されることが期待される。

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 5 件)

①Nakajima N, Yamagata T, Mori M, Kuwajima M, Suwa K, Momoi MY. Expression analysis and mutation detection of DLX5 and DLX6 in autism. *Brain Dev* **2009**, 査読あり, doi:10.1016

②Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, Momoi MY. Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読あり, 2008: 377:926-929

③Fujita E, Tanabe Y, Shiota A, Ueda M, Suwa K, Momoi MY, Momoi T. Ultrasonic vocalization impairment of FOXP2 (R552H) knockin mice related to speech-language disorder and abnormality of Pukinje cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読あり, 2008 ;105:3117-3122

④Mizutani A, Matsuzaki A, Momoi MY, Fujita E, Tanabe Y, Momoi T. Intracellular distribution of a speech/language disorder associated FOXP2 mutant. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読あり, 2007;353:869-874

⑤Nishijima I, Yamagata T, Spencer Cm, Weeber EJ, Alekseyenko O, Sweatt JD, Momoi MY, et al. Secretin receptor deficient mice exhibited impaired synaptic plasticity and social behavior. *Hum mol Genet*, 査読あり, 2006;15:3241-3250

[学会発表] (計 2 件)

①USA American Academy of Human Genetics Branch:International Autism Research meeting 2007 年、2008 年発表

研究成果①③

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桃井 真里子 (MOMOI MARIKO)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90166348

(2) 研究分担者

山形 崇倫 (YAMAGATA TAKANORI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00239857

森 雅人 (MORI MASATO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10337347

野崎 靖之 (NOZAKI YASUYUKI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：90281295

後藤 珠子 (GOTO TAMAKO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：40364509

桑島 真理 (KUWAJIMA MARI)

自治医科大学・医学部・研究生

研究者番号：30398515

(3) 連携研究者

なし