

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08251

研究課題名（和文）ウィリアムス症候群の社会行動異常に関わる遺伝子の探索

研究課題名（英文）Integrative analysis of genes associated with social behavior in Williams syndrome

研究代表者

木村 亮（Kimura, Ryo）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：20636641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ウィリアムス症候群は、約1万人に1人にみられる稀な病気で、7番染色体の片方の一部分がなくなり、陽気な高い社交性、心血管の異常や知的発達の遅れなど様々な症状がみられる。しかし症状の程度は一様ではなく、原因はわかっていなかった。そこで本研究では、DNAの塩基配列に加えられた修飾（エピゲノム）のうち、メチル化状態に着目し、ウィリアムス症候群患者と健常者の検体を使って網羅的に調べた。その結果、DNAメチル化の程度が両群で大きく異なる遺伝子を多数見出すことができた。とくにウィリアムス症候群では、神経発生や発達に関わる遺伝子のメチル化の程度が健常群に比べて高く、その働きが抑えられていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウィリアムス症候群は、7番染色体の片側にある複数の遺伝子の欠失により生じ、高い社交性含む特徴的な症状から、近年非常に注目を集めている。しかし、これまでに欠失領域内の遺伝子研究や質問紙を用いた臨床研究が多く行われてきたが、行動異常など症状に関わる遺伝子については十分に解明されていなかった。本研究により、DNAメチル化異常がウィリアムス症候群の病態に関わっていることが明らかになった。これは、ウィリアムス症候群にみられる多彩な症状の原因を説明する重要な手がかりを与える知見であり、今後さらなる病態の飛躍的な解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to find genes associated with social behavior in Williams syndrome (WS) based on DNA methylation changes. First, we obtained a significant number of blood samples from participants and performed comprehensive DNA methylation profiling. We then applied co-methylation network analysis to identified DNA methylation genes, and by combining this with clinical symptom evaluation, we were able to identify modules that were suggested to be associated with social behavior in WS. Interestingly, the hub gene which located in central to this network, were also significantly altered in the postmortem brains of WS patients. Thus, our study identified a group of genes that may be involved in social behavior in WS.

研究分野：精神医学 神経発達症

キーワード：ウィリアムス症候群 DNAメチル化 ネットワーク解析

1. 研究開始当初の背景

ウィリアムズ症候群は、約1万人に1人にみられる稀な病気で、7番染色体の片方にある一部分(7q11.23領域)が失われることで生じる。その結果、特徴的な妖精のような顔つき、陽気で多弁な高い社交性、心血管の異常、高血圧や糖尿病、成長と発達の遅れなど様々な症状がみられる。しかし、そのような症状がすべての患者さんにみられるわけではなく、症状の程度にも個人差があるが、その原因はわかっていなかった。これまでは、失われた染色体領域内にある複数の遺伝子に着目した研究が、多くの研究者によって進められてきたが、症状との関係は十分明らかになっていなかった。

我々のグループは、以前から患者家族会などの協力を得て、ウィリアムズ症候群を中心とした神経発達障害の研究に取り組んできており、これまでにウィリアムズ症候群では失われた遺伝子以外の複数の遺伝子の発現異常を見出している(Kimura et al. *J Child Psychol Psychiatry*. 2019)。しかし、なぜウィリアムズ症候群では、このように多くの遺伝子に発現異常が生じるのかは解明されていない。そこで我々は、遺伝子発現の制御に関わる、DNAの塩基配列に加えられた修飾(エピゲノム)がウィリアムズ症候群に関わっているのではないかと考えた。エピゲノムの中でも、DNAメチル化は統合失調症や自閉スペクトラム症など神経発達障の病態に関わっていることが知られている。本研究では、このDNAのメチル化状態に着目し、ウィリアムズ症候群との関係について研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DNAのメチル化変化を手がかりに、ウィリアムズ症候群の社会行動異常に関わる遺伝子を見出すことである。具体的には、被験者の検体を使ってDNAメチル化変化を探索、さらに共メチル化ネットワーク解析を適応することで、社会行動異常に関わる遺伝子群を同定する。

3. 研究の方法

1) DNAメチル化プロファイルの同定

臨床検体から抽出したDNAについてマイクロアレイ解析を行い、ウィリアムズ症候群におけるDNAメチル化変化を同定した。

① 血液検体からのDNAの抽出

申請者がこれまでの研究(基盤研究C H28-30年度)で収集した、ウィリアムズ症候群及び健常群、各約100例の末梢血からDNAを抽出した。被験者の社会性行動は、問題行動チェックリスト(CBCL/ABCL)と対人応答性尺度(SRS-2)という評価スケールにて重症度の評価を行った。

② 網羅的DNAメチル化解析

抽出・品質確認したDNAのうち年齢・性別が一致した疾患群と健常群について、Infinium Methylation BeadChip(イルミナ社)を用いたマイクロアレイ法で、DNAメチル化変化を調べた。得られた生データを解析ソフトRのChAMP package等を使ってメチル化変動した遺伝子を同定した。

2) 共メチル化ネットワーク解析による社会行動異常に関わる遺伝子の探索

次に1)で同定したプロファイルから、パイロシークエンスの手法を用いて遺伝子を絞り込み、パイロシークエンス法で確認した。

① 共メチル化ネットワーク解析

申請者がこれまでの研究(基盤研究C H28-30年度)で成果を上げた、WGCNAという共発現ネットワーク解析をDNAメチル化プロファイルに応用し(共メチル化ネットワーク解析)、症状に関連した遺伝子群の抽出を試みた。具体的には、解析ソフトRのWGCNA packageを用いて、メチル化遺伝子間の関連性を算出し、関連性が類似する遺伝子群を抽出する。さらに症状評価スコアを加えて解析することで、臨床症状と相関の高いメチル化遺伝子群(モジュール)を同定した。

② データベースを用いた探索

Enrichr等のデータベースを用いて社会行動異常や脳神経系との関連が予想されるモジュールを探索する。さらにモジュールの中心を担う遺伝子(ハブ遺伝子)について、脳におけるメチル化の程度をBlood Brain Comparison Tool等のデータベースを用いて確認した。とくにハブ遺伝子については、ウィリアムズ症候群死後脳の遺伝子発現データとも照合した。

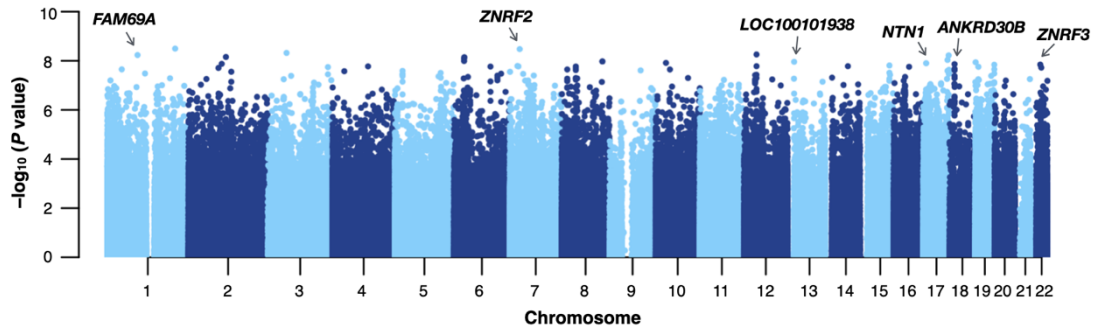
③ パイロシークエンス法による候補遺伝子のメチル化定量

とくにプロモーター領域のメチル化変化は遺伝子発現に影響を与えるため、本領域を中心にプローブを設計し、②で見出された複数のハブ遺伝子について、パイロシークエンス法を使ってメチル化の程度を定量した。

4. 研究成果

1) DNA メチル化プロファイル

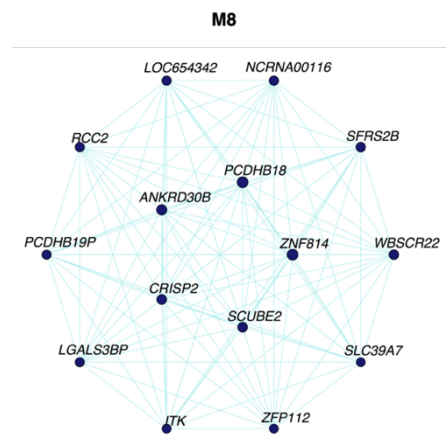
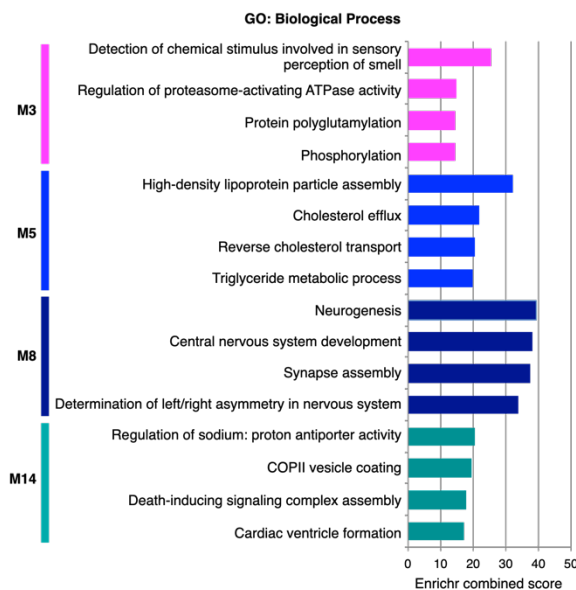
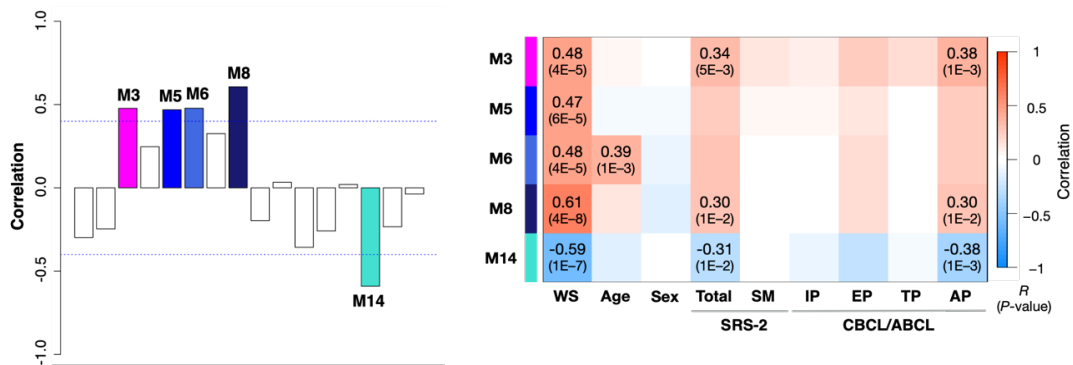
健常群とウィリアムス症候群、有意な DNA メチル化変動が多数みられた



Kimura R et al. Neuropsychopharmacology. 2020

2) 共メチル化ネットワーク解析

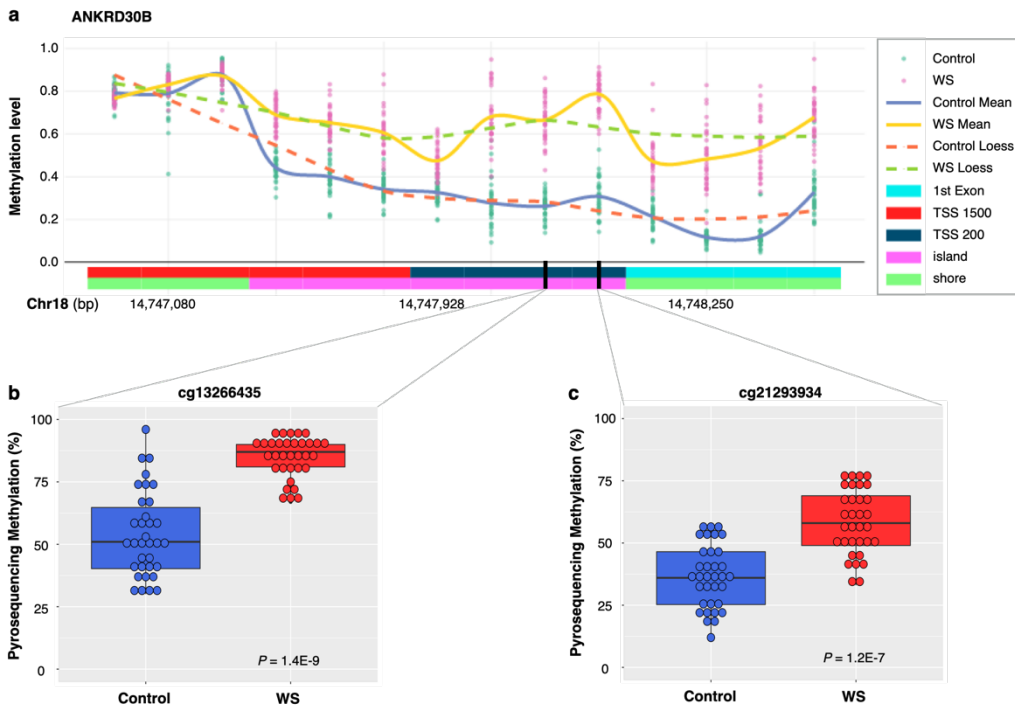
ウィリアムス症候群と最も関連の強い遺伝子群 (モジュール)、M8 を同定。M8 モジュールは、社会性障害の臨床症状指標である SRS-2 とも有意に関連していた。また、M8 モジュールは、神経発生やシナプス合成などと有意に関連していた。これら M8 モジュールの中心を担う遺伝子 (ハブ遺伝子) である、ANKRD30B に着目した。



Kimura R et al. Neuropsychopharmacology. 2020

3) パイロシーケンス法によるメチル化定量

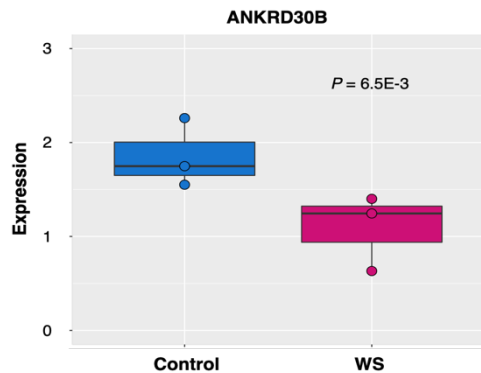
ANKRD30B 遺伝子について、パイロシーケンス法によるメチル化定量を行った。ウィリアムズ症候群では ANKRD30B 遺伝子の DNA メチル化の亢進がみられた。



Kimura R et al. Neuropsychopharmacology. 2020

4) 死後脳組織を用いた遺伝子発現解析

ウィリアムズ症候群の死後脳に関して、データベースを用いて ANKRD30B 遺伝子の発現変動を調べた。その結果、ウィリアムズ症候群では発現が有意に低下していた。



Kimura R et al. Neuropsychopharmacology. 2020

以上の結果から、DNA メチル化異常がウィリアムズ症候群の病態に関わっていることが明らかになった。まとめると、DNA メチル化の程度が両群で大きく異なり、とくに神経発生や発達に関わる遺伝子のメチル化の程度が、ウィリアムズ症候群で有意に高くなっており、その働きが抑えられていることが示唆された。本研究成果は、ウィリアムズ症候群にみられる多彩な症状の原因を説明する重要な手がかりを与える知見であり、今後さらなる病態の解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Okazaki Satoshi, Kimura Ryo, Otsuka Ikuo, Funabiki Yasuko, Murai Toshiya, Hishimoto Akitoyo	4. 巻 17
2. 論文標題 Epigenetic clock analysis and increased plasminogen activator inhibitor-1 in high-functioning autism spectrum disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0263478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0263478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 木村亮, 萩原正敏	4. 巻 39
2. 論文標題 エピゲノム制御異常と精神神経疾患	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CSJカレントレビュー	6. 最初と最後の頁 99-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Kimura, Roy Lardenoije, Kiyotaka Tomiwa, Yasuko Funabiki, Masatoshi Nakata, Shiho Suzuki, Tomonari Awaya, Takeo Kato, Shin Okazaki, Toshiya Murai, Toshio Heike, Bart P F Rutten, Masatoshi Hagiwara	4. 巻 45
2. 論文標題 Integrated DNA methylation analysis reveals a potential role for ANKRD30B in Williams syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 1627-1636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-020-0675-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shiho Suzuki, Ryo Kimura, Shingo Maegawa, Masatoshi Nakata, Masatoshi Hagiwara	4. 巻 13
2. 論文標題 Different effects of methylphenidate and atomoxetine on the behavior and brain transcriptome of zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular brain	6. 最初と最後の頁 70-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00614-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hidekazu Kato, Ryo Kimura (33人中22番目) et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Rare genetic variants in the gene encoding histone lysine demethylase 4C (KDM4C) and their contributions to susceptibility to schizophrenia and autism spectrum disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational psychiatry	6. 最初と最後の頁 421-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-01107-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Ryo, Tomiwa Kiyotaka, Inoue Ryo, Suzuki Shiho, Nakata Masatoshi, Awaya Tomonari, Kato Takeo, Okazaki Shin, Heike Toshio, Hagiwara Masatoshi	4. 巻 115
2. 論文標題 Dysregulation of the oxytocin receptor gene in Williams syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychoneuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 104631 ~ 104631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psyneuen.2020.104631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Ryo, Nakata Masatoshi, Funabiki Yasuko, Suzuki Shiho, Awaya Tomonari, Murai Toshiya, Hagiwara Masatoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 An epigenetic biomarker for adult high-functioning autism spectrum disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50250-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakata Masatoshi, Kimura Ryo, Funabiki Yasuko, Awaya Tomonari, Murai Toshiya, Hagiwara Masatoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 MicroRNA profiling in adults with high-functioning autism spectrum disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-019-0508-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Benitez-Burraco Antonio、Kimura Ryo	4. 巻 13
2. 論文標題 Robust Candidates for Language Development and Evolution Are Significantly Dysregulated in the Blood of People With Williams Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2019.00258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 木村亮	4. 巻 34
2. 論文標題 知っておきたい稀な精神症候・症候群 症例から学ぶ 14.ウィリアムズ症候群	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 精神科治療学	6. 最初と最後の頁 47-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 木村亮
2. 発表標題 シンポジウム 自閉症スペクトラム症の新規病態と治療的展開 遺伝子発現に着目した自閉スペクトラム症の病態研究と治療の可能性
3. 学会等名 第43回 日本生物学的精神医学会・第51回 日本神経精神薬理学会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村亮
2. 発表標題 シンポジウム 超社会性を呈する希少疾患に着目した社会性認知研究の現状と展望 超社会性を呈する希少疾患ウィリアムズ症候群とは
3. 学会等名 第117回 日本精神神経学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村亮, 鈴木志穂, 西村泰生, 前川真吾, 萩原正敏
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを活用した神経発達症研究の現状と課題
3. 学会等名 第7回 ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Kimura, Roy Lardenoije, Kiyotaka Tomiwa, Yasuko Funabiki, Masatoshi Nakata, Shiho Suzuki, Tomonari Awaya, Takeo Kato, Toshiya Murai, Toshio Heike, Bart Rutten, Masatoshi Hagiwara
2. 発表標題 Integrative DNA methylation and gene expression analysis of Williams syndrome
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryo Kimura, Roy Lardenoije, Kiyotaka Tomiwa, Yasuko Funabiki, Masatoshi Nakata, Shiho Suzuki, Tomonari Awaya, Takeo Kato, Shin Okazaki, Toshiya Murai, Toshio Heike, Bart Rutten, Masatoshi Hagiwara
2. 発表標題 Integrated Epigenetic Analysis of Williams Syndrome
3. 学会等名 World Congress on Psychiatric Genetics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>エピゲノム異常がウィリアムズ症候群に関わることを発見 - 多彩な症状の原因を説明する手がかりに - https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2020-04-24</p> <p>2種類のADHD治療薬が対照的な作用を持つことを発見 - ゼブラフィッシュで行動や脳での働きを探る - https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2020-05-18-0</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	富和 清隆 (Tomiwa Kiyotaka)		
研究協力者	前川 真吾 (Maegawa Shingo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オランダ	Maastricht University			
米国	Harvard Medical School	University of California Los Angeles		
ドイツ	University of Gottingen			
スペイン	University of Seville			