

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08337

研究課題名(和文)軽度知的障害が見られるR3HDM1欠損症の脳病態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the brain pathology of R3HDM1 deficiency with mild intellectual disability

研究代表者

福士 大輔 (Fukushi, Daisuke)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・遺伝子医療研究部・主任研究員

研究者番号：90397159

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)：本症例は軽度知的障害や自閉症様行動を呈し、2番染色体逆位でR3HDM1が機能不全となる世界初のR3HDM1欠損症である。患者におけるR3HDM1の発現量は健常者の約60%であるが、R3HDM1のイントロン18に局在するマイクロRNA(miR-128-1及びその成熟体のmiR-128)の発現量は健常者と同等であった。神経突起の伸長を促進するPHF6の3'非翻訳領域に対して、miR-128はPHF6のmRNAの分解を促進するが、R3HDM1はmiR-128の作用を阻害することが明らかになった。以上より、R3HDM1とmiR-128-1の不均衡な発現が本症例の発症機序に関与するという仮説を立てた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重度の知的障害とは異なり、軽度の知的障害は所見の乏しさなどから、これまで病因遺伝子の解明が遅れていた。本症例は、RNA結合タンパク質であるR3HDM1がハプロ不全となる、世界初のR3HDM1欠損症である。本研究により、これまで機能が不明であったR3HDM1は、神経突起の伸長に関与する可能性が高いことが示された。また、同遺伝子に含まれるMIR128-1との不均衡な発現が本症例の発症機序に関与する、という遺伝子-マイクロRNA不均衡発現仮説は本研究のオリジナルであり、今後この仮説が証明されれば、知的障害についての新たな発症機序が提唱されるという点で、学術的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：We reported a first case of a patient exhibiting mild intellectual disability, developmental delay and autistic tendencies with a de novo pericentric inversion disrupting R3HDM1 without affecting the expression level of miR-128-1 (MIR128-1) which is located in intron 18 of R3HDM1. Our study demonstrated that R3HDM1 knockdown in cultured mouse hippocampal neurons led to abnormal neurite formation. miR-128, which is a mature form of miR-128-1, has been reported to inhibit dendritic growth and branching in mouse brain neurons, which directly opposes the novel functions of R3HDM1. These findings support the hypothesis that the genetic imbalance owing to different gene dosages of MIR128-1 and R3HDM1 is likely associated with the mild intellectual disability of this patient.

研究分野：細胞遺伝学

キーワード：R3HDM1 染色体逆位 軽度知的障害 自閉症様行動 神経突起 RNA結合タンパク質 miR-128

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンスの普及により、脳神経の発達に関連する多くの遺伝子が、知的障害や自閉症スペクトラム障害の病因となることが明らかになっている。厚生労働省の難治性疾患研究事業では、対象疾患の多くが中等度から重度の知的障害が対象となっており、軽度知的障害を対象とした病因の解明はほとんど行われていない。そこで我々は、愛知県医療療育総合センター中央病院との共同研究で、患者にみられる染色体や遺伝子の異常に注目して、軽度知的障害の病因遺伝子の同定を行っている。

本症例は、軽度知的障害と自閉症様行動が見られ、片方の2番染色体に *de novo* の腕間逆位 inv(2)(p16.1q21.3) を有する12歳男性で、6歳時のIQは64であった(田中ビネー知能指数V)。独歩は生後17か月、始語は2歳と運動発達や言語発達の遅れがあり、物をきちんと並べるなどのこだわりの強さを示す自閉症様の行動が見られた。Gバンド法では逆位断点部位が正確に同定できなかったため、FISH法、PCR法と塩基配列決定法を併用し、逆位断点部位に病因となる遺伝子が局在するのかを解析した。その結果、本症例は2番染色体長腕(2q21)に局在する *R3HDM1* がハプロ不全となる *R3HDM1* 欠損症であることを見出した。*R3HDM1* はRNA結合タンパク質であり、神経細胞においては、細胞体から神経突起末端へ特定のmRNAを運搬していると考えられるが、どのようなmRNAを運搬しているのかは不明であり、さらに本タンパク質の機能不全と本症例の発症機序との関連も未知であった。

2. 研究の目的

本研究は、*R3HDM1* 欠損症の病因遺伝子として同定した *R3HDM1* の脳神経細胞における機能を明らかにし、*R3HDM1* の機能不全が本症例で見られる軽度知的障害や自閉症様行動とどのように関連するのかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本症例における *R3HDM1* および miR-128 の発現量の解析。患者および健常者3名の培養リンパ芽球細胞より抽出したRNAを逆転写後、定量PCRにて *R3HDM1*、および同遺伝子のイントロン18に局在する *MIR128-1* (miR-128-1) さらにその成熟体である miR-128 の発現量を定量した。

(2) ウエスタンブロット法による *R3HDM1* の発現量の解析。患者および健常者4名の培養リンパ芽球細胞を用いて、ウエスタンブロット法により *R3HDM1* の発現量を定量した。

(3) マウス胎仔の海馬由来の初代培養神経細胞を用いた神経突起の形状解析。胎生16.5日のマウス海馬由来の神経細胞に対し、エレクトロポレーション法にて pSUPER (Wild type) および pSUPER-siR3HDM1 (*R3HDM1* のノックダウン) ベクターをそれぞれ導入した。培養5日目に細胞を固定し、抗GFPおよびTUJ1抗体を用いた免疫染色を行った。その後、蛍光顕微鏡で撮影した神経細胞の神経突起をImageJのプラグインであるNeuronJを用いて計測し、突起の長さと同分枝数についてWild type および *R3HDM1* のノックダウン細胞で比較し、統計処理を行った。

(4) *PHF6* の3'非翻訳領域に対する *R3HDM1* と miR-128 の保護活性の検証。知的障害の病因遺伝子 *PHF6* は、神経突起の伸長を促進する遺伝子であり、miR-128 は、*PHF6* の3'非翻訳領域(3'UTR)に作用して、*PHF6* のmRNAの分解を促進する。一方、*R3HDM1* の同属のタンパク質であるARPP21は、miR-128の作用を阻害して *PHF6* のmRNAの分解を阻害する。すなわち、ARPP21とmiR-128は、*PHF6* の神経突起伸長作用に対して競合関係にある(Rehfeld *et al.*, 2018)。そこで *R3HDM1* もARPP21と同様に *PHF6* のmRNAの保護活性があるのかを解析するために、miR-128のターゲット配列を含む siCHECK ベクター (*PHF6*-3'utr/siCHECK) を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。

(5) *R3HDM1* の神経突起上での動態解析。マウス胎仔の脳皮質由来の初代培養神経細胞に対して、チューブリン重合阻害剤であるノコダゾール処理を行い(最終濃度5 µg/ml、2時間)、*R3HDM1* の神経突起上での局在の変化を解析した。さらに、ノコダゾール処理後にノコダゾールを含む培養液を除去するリリース実験を行い、神経突起上での *R3HDM1* の動態の変化を検討した。

(6) シナプスにおける *R3HDM1* の局在。マウス胎仔の脳皮質由来の初代培養神経細胞(培養16日目)を用いて、前シナプスのマーカータンパク質であるSynapsin 1、あるいは後シナプスのマーカータンパク質であるPSD95と *R3HDM1* が共同局在するのかを免疫染色で解析した。

(7) i-GONAD法によるモデルマウスの作製。i-GONAD法を用いて、*R3HDM1* のホモ欠失、ヘテロ欠失、さらに miR-128-1 の欠失マウスの作製を行った。

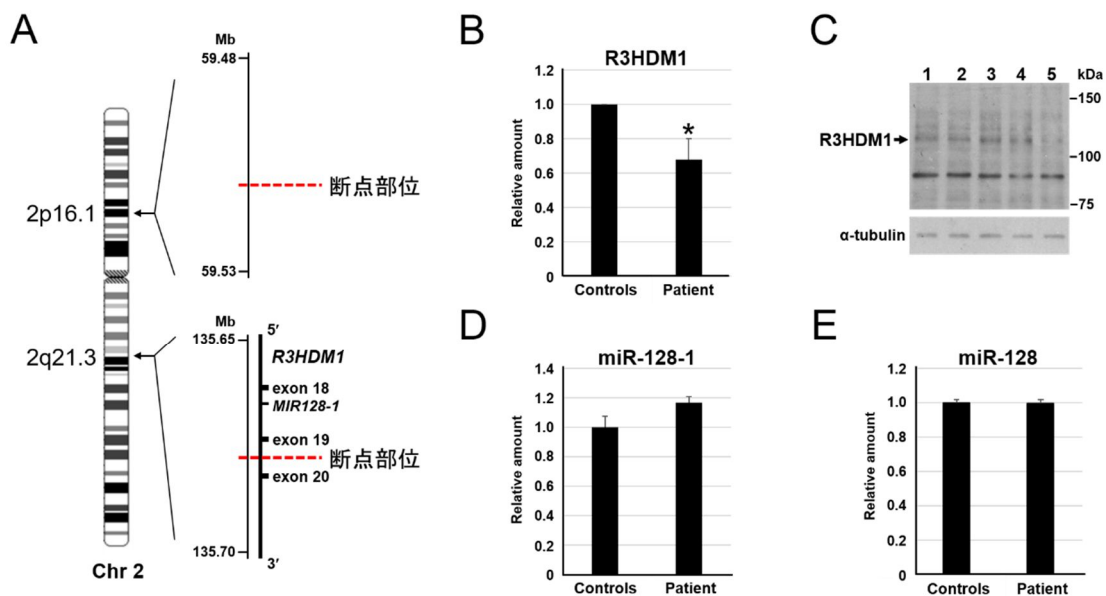
4. 研究成果

(1) *R3HDM1* 欠損症の患者における *R3HDM1* および miR-128 の発現量

本症例は、2p16.1の非遺伝子領域および2q21.3の *R3HDM1* のイントロン19にそれぞれ染色体逆位の切断点が局在する(図1A)。この逆位により *R3HDM1* は切断を受けてハプロ不全とな

り、発現量も低下していると予想された。また *R3HDM1* のイントロン 18 には miR-128-1 の遺伝子である *MIR128-1* が局在するが、本逆位が miR-128-1 およびその成熟体である miR-128 の発現に影響するのかわ不明であったため、定量 PCR 法にて *R3HDM1* および miR-128-1、miR-128 の発現量を定量した。なお *R3HDM1* については、ウエスタンブロット法でも発現量を確認した。

その結果、患者の培養リンパ芽細胞における *R3HDM1* の発現量は、定量 PCR 法では健常者の平均の 68% (図 1B)、ウエスタンブロット法では 49% (図 1C、1-4 が健常者、5 が患者) と低下していた。一方、miR-128-1 (図 1D) および miR-128 (図 1E) の発現量は健常者と同等であり、逆位の影響を受けていないことが明らかになった。以上より、本症例は *R3HDM1* のみがハプロ不全となることが判明した。



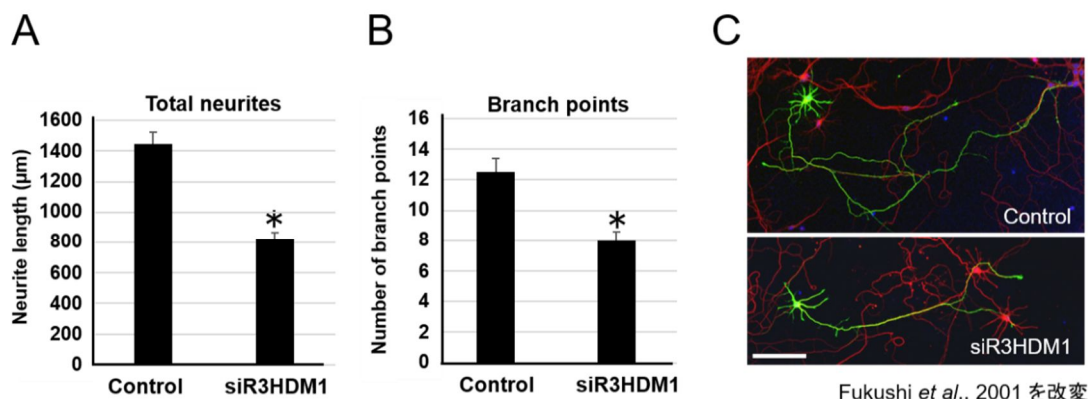
Fukushi et al., 2001 を改変

図 1

* $p < 0.02$

(2) *R3HDM1* は神経突起の伸長と分枝に必須である

神経細胞における神経突起の伸長と分枝に対する *R3HDM1* の関係を明らかにするために、胎生 16.5 日のマウス海馬由来の神経細胞の *R3HDM1* をノックダウンした結果、正常細胞に比べて神経突起の長さや分枝数が共に約 60% に低下した (図 2)。以上より、*R3HDM1* は神経突起の伸長と分枝に必須であることが判明した。



Fukushi et al., 2001 を改変

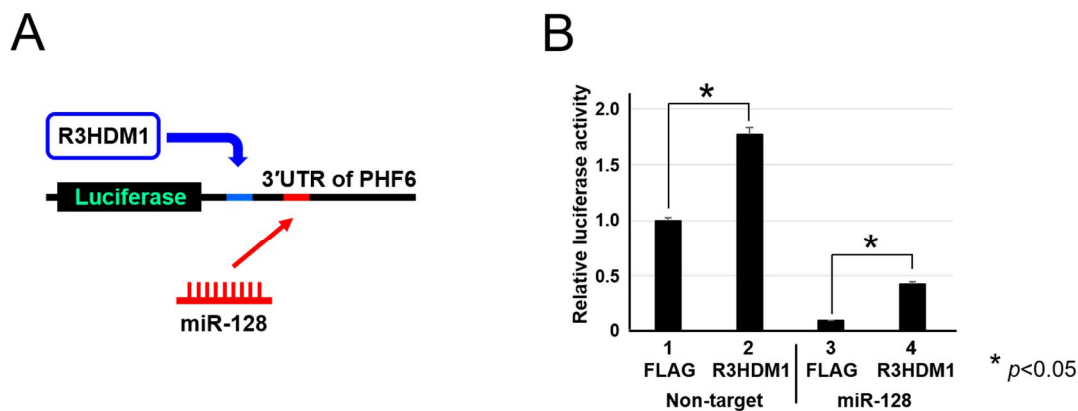
* $p < 0.01$

図 2

(3) *PHF6* の 3'UTR に対して *R3HDM1* と miR-128 は競合作用がある

ルシフェラーゼアッセイにより、*PHF6* の 3'UTR に対する *R3HDM1* と miR-128 の保護活性の検証を行った (図 3A)。その結果、miR-128 の過剰発現は (図 3B-3) コントロール (図 3B-1) の約 10% までルシフェラーゼ活性を減少させた。これに対し、*R3HDM1* を過剰発現すると、ルシフェラーゼ活性は約 40% まで回復した (図 3B-4)。以上より、*R3HDM1* は、miR-128 が *PHF6*

の mRNA の分解を促進する作用を阻害すると考えられた。



Fukushi et al., 2001 を改変

図3

(4) 神経突起における R3HDM1 の分布

R3HDM1 は、神経細胞において細胞体から神経突起末端へ特定の mRNA を運搬していると考えられる。そこで、神経突起における R3HDM1 の分布と移動について明らかにするために、マウス胎仔の脳皮質培養神経細胞に対して、培養 7 日目にチューブリン重合阻害剤であるノコダゾールを加えた。その結果、コントロール (DIMSO) では神経突起上に R3HDM1 の分布が認められた。一方、ノコダゾール処理を行うと、神経突起上での R3HDM1 の局在量が減少した。さらに、ノコダゾール処理後にノコダゾールを含む培養液を除去するリリース実験を行った結果、少なくともリリース後 0.5 時間で、一部の神経突起における R3HDM1 の局在量が回復し始めていた (図 4)。これより、R3HDM1 は細胞体から短時間で神経突起に移動することが明らかになった。

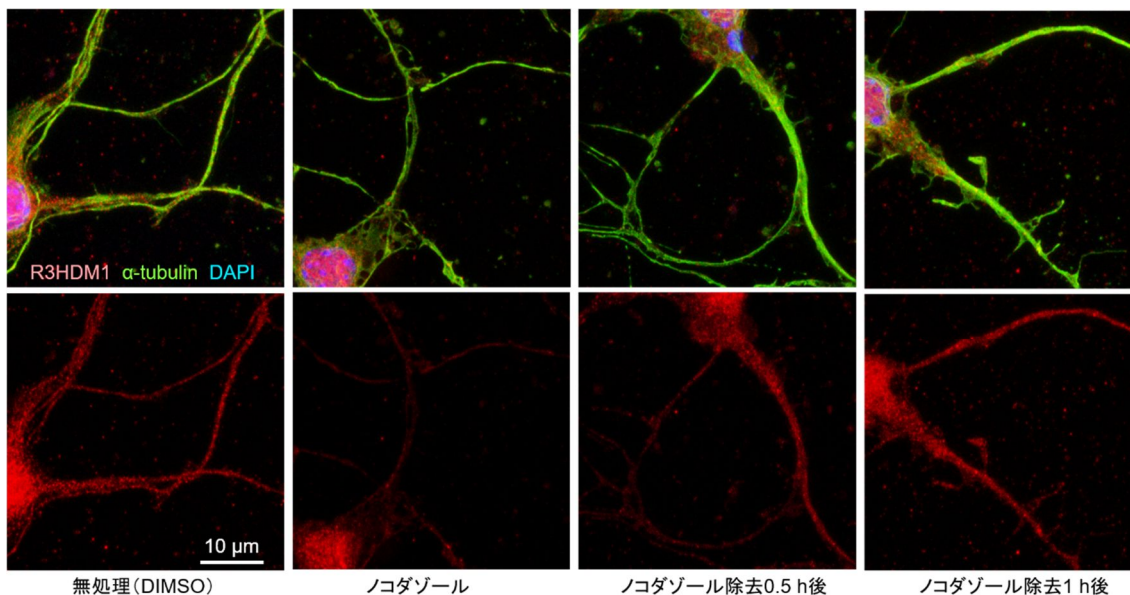


図4

(5) シナプスにおける R3HDM1 の局在

ノコダゾールを用いた実験より、マウスの神経突起における R3HDM1 の局在が明らかになった。次に、シナプスにおける R3HDM1 の局在はどのようにになっているのかについて、マウス胎仔の脳皮質由来の初代培養神経細胞 (培養 16 日目) を用いて、前シナプスのマーカータンパク質である Synapsin 1、あるいは後シナプスのマーカータンパク質である PSD95 をそれぞれ用いて、R3HDM1 がそれらのタンパク質と共局在するのかを免疫染色で解析した。その結果、R3HDM1 は、Synapsin 1、PSD95 どちらも共局在しないことが判明した (図 5)。以上より、R3HDM1 はシナプス近傍までは神経突起の伸長や分枝に必要な mRNA を運搬するが、シナプス内部までは入り込まない可能性が示唆された。

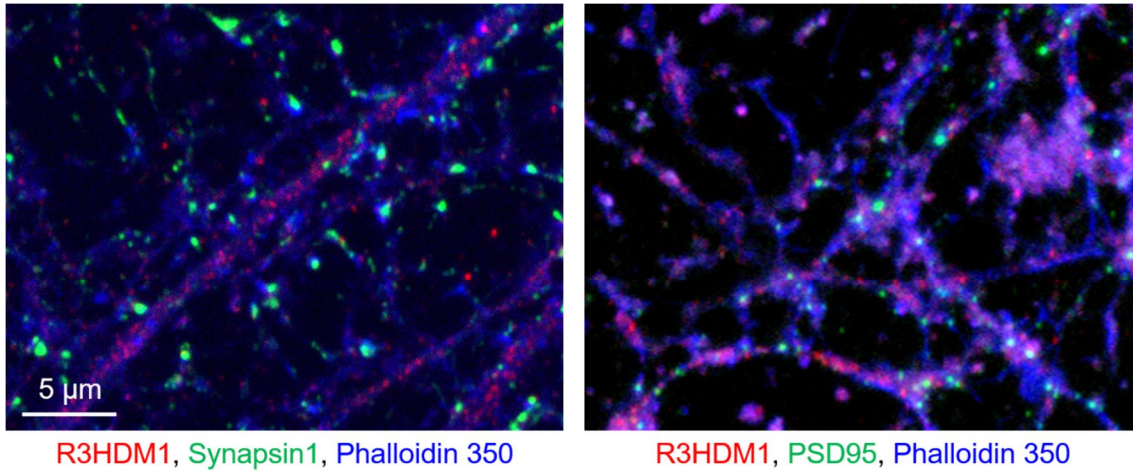


図5

(6) i-GONAD 法によるモデルマウスの作製については、R3HDM1 のホモ欠失、ヘテロ欠失それぞれのマウスの作出に成功し、系統維持を行っている。一方、本症例の発症に R3HDM1 と共に関与すると考えられる miR-128-1 についても、*MIR128-1* 遺伝子の欠損モデルマウスの作出に成功し、系統維持を行っている。今後、本症例の発症機序に R3HDM1 と miR-128-1 の不均衡な発現が関与するの否かを、これらのモデルマウスを用いて検証する。

< 引用文献 >

Rehfeld F, Maticzka D, Grosser S, Knauff P, Eravci M, Vida I, Backofen R, Wulczyn FG. The RNA-binding protein ARPP21 controls dendritic branching by functionally opposing the miRNA it hosts. *Nat Commun* 9(1):1235, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukushi Daisuke, Inaba Mie, Katoh Kimiko, Suzuki Yasuyo, Enokido Yasushi, Nomura Noriko, Tokita Yoshihito, Hayashi Shin, Mizuno Seiji, Yamada Kenichiro, Wakamatsu Nobuaki	4. 巻 185
2. 論文標題 R3HDM1 haploinsufficiency is associated with mild intellectual disability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 1776-1786
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.62173	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福士大輔, 稲葉美枝, 加藤君子, 鈴木康予, 榎戸 靖, 野村紀子, 時田義人, 水野誠司, 山田憲一郎, 若松延昭, 林 深
2. 発表標題 染色体腕間逆位から同定した知的障害の新規原因遺伝子R3HDM1.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会・第28回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 深, 福士大輔, 稲葉美枝, 加藤君子, 鈴木康予, 榎戸 靖, 野村紀子, 時田義人, 水野誠司, 山田憲一郎, 若松延昭
2. 発表標題 染色体腕間逆位から同定した知的障害の新規原因遺伝子R3HDM1.
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知県医療療育総合センター 発達障害研究所 遺伝子医療研究部門
<https://www.pref.aichi.jp/addc/eachfacility/hatatsu/department/index3.html>

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 分 担 者	加藤 君子 (Kato Kimiko) (30598602)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・遺伝子医療研究部・研究員 (83902)	

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
---------	---------