

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08265

研究課題名（和文）概日リズム関連遺伝子の自閉症、神経発達への影響について

研究課題名（英文）The effect of circadian genes to Autism and neuron development

研究代表者

松本 歩（MATSUMOTO, Ayumi）

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20458318

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）：概日リズム遺伝子の自閉スペクトラム症への影響、およびその機序を明らかにするためにTimeless K.O.マウスを用いて行動解析を行った。その結果、社会性の低下等が示唆されASDと合致していた。また、脳の活動性の違いをみた解析では、Timeless K.O.マウスとWTでは違いが検出され現在投稿準備中である。TimelessがASD、特に社会性の低下に関わっている可能性が示唆され、ASDの発症機序として新しい知見が得られた。また、ASDを含め発達障害、知的障害患者38例においてエクソーム解析を実施し、12例で診断に至った。GAP43やCACNA1Hは機能解を追加し投稿準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Timelessはこれまでヒト、マウスにおける概日リズム、ASDのエビデンスが乏しかったが、マウスでの行動解析および脳での活動性をみることでASDとの関連を明らかにした。ASD、概日リズムの病態解明につなげることができた。また、Timeless K.O.マウスは今後内服の治療効果判定に用いることも可能となり、今後の発展、社会的な意義は非常に大きい。エクソーム解析においても多数の診断や、GAP43など疾患報告のない遺伝子について疾患との関連を見出すことができ、患者さんや社会にとって非常に大きな意義があったと考えている。今後、解析を継続することでより詳細な病態解明につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the influence of circadian rhythm genes on autism spectrum disorder and its mechanism, behavioral analysis was performed using Timeless KO mice. The results suggested a decline in sociality, consistent with ASD. Furthermore, analysis using neural activity markers detected differences between Timeless KO mice and WT mice, and the results are currently in preparation for submission. It was suggested that Timeless may be involved in ASD, particularly in the decline in sociality, and new knowledge was gained about the pathogenesis of ASD. In addition, exome analysis was performed on 38 patients with developmental disorders and intellectual disabilities, including ASD, and a diagnosis was made in 12 cases. Functional solutions for GAP43 and CACNA1H have been added and are currently in preparation for submission.

研究分野：小児神経

キーワード：概日リズム 自閉スペクトラム症 発達障害 知的障害 Timeless

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは自閉スペクトラム症の原因遺伝子として LIN7 等のシナプス関連遺伝子を同定[1, 2]、解析し、また、概日リズム異常の有無にかかわらず、自閉スペクトラム症 (ASD) では概日リズム関連遺伝子が ASD の病因の 1 つになってきている可能性を報告してきた[3]。特に、ASD および概日リズム異常のある親子で Timeless p.F498S を同定していた。社会性・社会行動と概日リズムは密接な関連を持ち、その基盤として、概日リズム関連遺伝子の中にシナプス形成・機能に関与する遺伝子が存在し、その機能低下により神経ネットワークの形成・可塑性が低下し、社会性の障害やリズム障害などを来してくる可能性が考えられる。実際、我々の解析でも *NR1D1*、*PER3* などが ASD の原因遺伝子でありノックダウンにより大脳皮質の神経の神経細胞移動や突起伸長が抑制されることを明らかにした。しかし、これらの遺伝子は、独自の機序で神経分化に作用するのか、概日リズムに影響された発現によりシナプス形成に影響するのか不明である。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 概日リズム関連遺伝子の神経ネットワーク形成への関与をさらに解明するため、TIMELESS、PER3 等の既検出変異を iPS 細胞に導入しシナプスへの影響を調べる。(2) マウスで概日リズム異常を起こし関連遺伝子の発現変化を確認、それが神経分化やシナプス機能へ及ぼす影響を明らかにし、リズム正常化や薬剤の効果などの治療法開発をする。概日リズムの神経発達への影響を証明することが出来れば、社会的にも重要な研究となり得る。

3. 研究の方法

- 1) Timeless やその他の概日リズム関連遺伝子で得られたバリエーションをゲノム編集で iPS に導入し、シナプス形成などを評価する。
- 2) マウスを用いた解析: Timeless のノックアウト(K.O.)マウスでリズム障害の解析、バッテリーを用いた行動解析および、脳の神経細胞の活動性マーカーを用い興奮部位を WT と比較する。
- 3) 概日リズム異常以外の ASD、発達障害、知的障害についてのエクソーム解析を行い原因遺伝子の同定を行う。また、追加解析必要な症例については機能解析を行う。

4. 研究成果

- 1) Timeless のバリエーションについて Cas-9 を用い iPS に導入した。導入効率は 3 割で可能であった。その後の神経の分化について至適な条件検討を継続している。
また、Timeless の C 末端に HiBiT のタグおよびバリエーションを導入したベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションして、同システムを用いてシグナルの違いおよび細胞内局在を解析したが WT、2 つのバリエーションで有意な違いは検出できなかった。
- 2) Timeless K.O. マウスでは、社会性の低下等が示された。また、脳神経の活動性マーカーを用いた解析では、Timeless K.O. マウスと WT では、違いが示され、Timeless の ASD、特に社会性の低下に関わっている可能性が示唆され、現在投稿中である。
- 3) ASD や発達障害の症例のエクソーム解析や、機能解析を行った。
患者 38 例(家族含め合計 78 例)においてエクソーム解析を実施し、機能解析したのものも含め 12 例(31.6%)で診断にいたった。実施した内訳では、知的障害、発達障害:12 例(31.6%)、心疾患:5 例(13.2%)、血液、免疫関連:5 例(13.2%)、てんかん:4 例(10.5%)、骨異常を含む奇形症候群:3 例(7.9%)などであった。

【てんかんの症例】

DYNC1H1 遺伝子は細胞質ダイニンの複合体のコア構造の細胞質ダイニン 1 の重鎖をコードしていて、神経細胞移動障害、知的障害、自閉症の原因遺伝子である。皮質形成異常があり難治性てんかんの症例、および、皮質形成異常は見られないが難治性てんかん、ASD の症例を検出し

経過とともに報告した。

てんかん症例において*DNM1L* (Dynamin 1-like)の新規バリエーションを検出した。*DNM1L*は細胞分裂過程で膜のリモデリングを仲介し、ペルオキシソームやミトコンドリア分裂に重要な役割を果たす。既知のバリエーションと検出バリエーションをベクターに導入し、ミトコンドリア、ペルオキシソームの形態について検討した。患者の検体では、ミトコンドリアの結節や枝分かれ等を多数認め、腫大がみられた。ペルオキシソームも腫大がみられ、本バリエーションがてんかんの原因であると考えられ、投稿準備中である。

難治性のミオクロニー失てんかん (MAE) の症例で同定したコンパウンドヘテロの*CACNA1H*のバリエーションについて、電位的な機能解析を追加した。*CACNA1H*はCav3.2 T-type Ca²⁺チャネルをコードし、*CACNA1H*は、高アルドステロン症、小児欠神てんかんおよび特発性全般てんかんの感受性の原因遺伝子で、MAEでの報告は見られなかった。本症例は既知のGain of function、新規のloss of functionのバリエーションの組み合わせにより難治性のMAEを発症したと考えられ投稿準備中である。

【てんかん以外の解析】

低身長と知的障害、手指の弯曲、下肢の脚長差の症例でバリエーションを同定したGAP43は成長因子関連蛋白で、神経の再生において重要な蛋白である。この症例はSilver-Russell症候群 (SRS) に類似しており、SRSが疑われる症例で、このメチル化の有意差が見られたとの報告もあったため、60例のSRS疑い例で通常H19/IGF 2のメチル化異常が見られなかった症例についてGAP43のシーケンスを行ったが、変異は同定できなかった。欠失例の報告で知的障害や発達障害、下肢の脚長差の報告あり。GAP43が本症例の原因遺伝子と考えて機能解析を行った。GAP43のノックダウンでは樹状突起の形成や軸索の伸長が障害され、本症例の原因遺伝子と考えられ、論文投稿準備中である。

X染色体のメチル化による不活化の極端な偏りのために発症したMenkes病女児を経験した。その母、祖母を含む3世代の全ゲノムとRNAシーケンシング解析を実施し、X染色体不活化の偏りの原因について解析した。X染色体短腕テロメア近傍のp21-22、X染色体長腕のテロメア近傍のq26-28で組み換えが起こっていたことを明らかにし、同部位にcis-acting genetic factorが存在し、X染色体不活化を増強または抑制する可能性を報告した。その他、知的障害や発達の遅れの症例で*ANK11*のバリエーションや*MECP2*のバリエーションを同定し、診断に結び付いた。

【引用文献】

- [1] Matsumoto A, Mizuno M, Hamada N, Nozaki Y, Jimbo EF, Momoi MY, et al. LIN7A depletion disrupts cerebral cortex development, contributing to intellectual disability in 12q21-deletion syndrome. PLoS One 2014;9:e92695.
- [2] Mizuno M, Matsumoto A, Hamada N, Ito H, Miyauchi A, Jimbo EF, et al. Role of an adaptor protein Lin-7B in brain development: possible involvement in autism spectrum disorders. J Neurochem 2015;132:61-9.
- [3] Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo EF, Kojima K, Nagata K, et al. Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. Brain Dev 2016;38:91-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Matsumoto Ayumi, Tsuda Hidetoshi, Furui Sadahiro, Kawada Nagashima Masako, Anzai Tatsuya, Seki Mitsuru, Watanabe Kazuhisa, Muramatsu Kazuhiro, Osaka Hitoshi, Iwamoto Sadahiko, Nishino Ichizo, Yamagata Takanori	4. 巻 10
2. 論文標題 A case of congenital fiber type disproportion syndrome presenting dilated cardiomyopathy with <i>ACTA1</i> mutation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e2008
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mgg3.2008	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 Yamane Hiroaki, Seki Mitsuru, Ikeda Takahiro, Matsumoto Ayumi, Furui Sadahiro, Sato Tomoyuki, Muramatsu Kazuhiro, Tajima Toshihiro, Yamagata Takanori	4. 巻 63
2. 論文標題 An Adolescent Patient with Sick Sinus Syndrome Complicated by Hypothyroidism Carrying <i>SCN5A</i> Variant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 627 ~ 632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.21-722	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 -

1. 著者名 Watanabe Kazuhisa, Matsumoto Ayumi, Tsuda Hidetoshi, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 12
2. 論文標題 KBTBD11, encoding a novel PPAR target gene, is involved in NFATc1 proteolysis by interacting with HSC70 and HSP60	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-24929-5	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 Kutsuwada Yukinobu, Yokota Kazuha, Yoshida Ken, Tsuda Hidetoshi, Watanabe Kazuhisa, Matsumoto Ayumi, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 105
2. 論文標題 Association of HLA-DPB1, NLRP10, OVOL1, and ABCC11 with the axillary microbiome in a Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 98 ~ 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2022.01.003	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 Ayumi Matsumoto , Karin Kojima , Fuyuki Miya , Akihiko Miyachi , Kazuhisa Watanabe , Sadahiko Iwamoto , Kensuke Kawai , Mitsuhiro Kato , Yukitoshi Takahashi , Takanori Yamagata	4. 巻 43
2. 論文標題 Two cases of DYNC1H1 mutations with intractable epilepsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Dev	6. 最初と最後の頁 857-862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.braindev.2021.05.005	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 -

1. 著者名 Miyana, Kaori Hayakawa, Itaru Muromoto, Jin Ayumi, Matsumoto Muramatsu, Kazuhiro Kubota, Masaya	4. 巻 8
2. 論文標題 Diffuse Cortical Dysplasia in the Donor of Twin-to-Twin Transfusion Syndrome Following Fetoscopic Laser Photocoagulation: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Fetal Medicine	6. 最初と最後の頁 151-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s40556-021-00304-8	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 -

1. 著者名 Yoshida Ken, Yokota Kazuha, Kutsuwada Yukinobu, Nakayama Kazuhiro, Watanabe Kazuhisa, Matsumoto Ayumi, Miyashita Hiroshi, Khor Seik soon, Tokunaga Katsushi, Kawai Yosuke, Nagasaki Masao, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 4
2. 論文標題 Genome Wide Association Study of Lean Nonalcoholic Fatty Liver Disease Suggests Human Leukocyte Antigen as a Novel Candidate Locus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep4.1529	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 Matsumoto Ayumi, Kano Shintaro, Kobayashi Natsumi, Matsuki Mitsuru, Furukawa Rieko, Yamagishi Hirokazu, Yoshinari Hiroki, Nakata Waka, Wakabayashi Hiroko, Tsuda Hidetoshi, Watanabe Kazuhisa, Takahashi Hironori, Yamagata Takanori, Matsumura Takayoshi, Osaka Hitoshi, Mori Harushi, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 14
2. 論文標題 Unfavorable switching of skewed X chromosome inactivation leads to Menkes disease in a female infant	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-50668-2	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 -

1. 著者名 Miyake Noriko, Tsurusaki Yoshinori, Fukai Ryoko, Kushima Itaru, Okamoto Nobuhiko, et. al.	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Molecular diagnosis of 405 individuals with autism spectrum disorder	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41431-023-01335-7	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 Yoshida Ken, Yokota Kazuha, Watanabe Kazuhisa, Tsuda Hidetoshi, Matsumoto Ayumi, Mizukami Hiroaki, Iwamoto Sadahiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Lack of GPR180 ameliorates hepatic lipid depot via downregulation of mTORC1 signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29135-5	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 Wakabayashi Kei, Osaka Hitoshi, Yamagishi Hirokazu, Kuwajima Mari, Ikeda Takahiro, Matsumoto Ayumi, Muramatsu Kazuhiro, Yamagata Takanori	4. 巻 144
2. 論文標題 Investigation of the efficacy and adverse effects of lacosamide over 36?months	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Epilepsy & Behavior	6. 最初と最後の頁 109227 ~ 109227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yebeh.2023.109227	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 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本 歩, 津田 英利, 池田 尚広, 宮内 彰彦, 橋口 万里奈, 門田 行史, 嚮田 行信, 渡邊 和寿, 村松 一洋, 小坂 仁, 岩本 禎彦, 山形 崇倫
2. 発表標題 難治性てんかん、光、音過敏を呈したDNM1L変異の1歳男児例.
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsumoto Ayumi, Tsuda Hidetoshi, Furui Sadahiro, Kawada Masako, Anzai Tatsuya, Seki Mitsuru, Watanabe Kazuhisa, Nishino Ichizo, Osaka Hitoshi, Iwamoto Sadahiko, Yamagata Takanori
2. 発表標題 A case of fiber type disproportion syndrome presenting dilated cardiomyopathy with ACTA1 mutation
3. 学会等名 人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本 歩
2. 発表標題 シンポジウム1: マイクロアレイ染色体検査で明らかになる微細欠失構造異常症候群の診療体制を考える S1-03
3. 学会等名 第65回小児神経学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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