

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651219

研究課題名(和文)多動症は遺伝子疾患か? CIN85異常による多動症の遺伝子診断法の確立

研究課題名(英文) Whether hyperactivity disorder is genetic diseases or not? The establishment of gene diagnosis for hyperactivity disorder due to CIN85 abnormality.

研究代表者

下川 哲昭 (Shimokawa, Noriaki)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90235680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CIN85遺伝子はヒトX染色体短腕に存在しX染色体に連鎖した精神遅滞の原因遺伝子であるオリゴフレニン1や足場タンパク質であるPSD-95と神経細胞樹状突起棘で共存していることを発見した。さらにゲッチンゲン大学から提供された多動症及びX染色体連鎖性精神遅滞家系の患者のゲノムDNAからCIN85遺伝子領域約360.7 kbpの塩基配列を解読し正常者の配列と比較した。その結果、男性患者の13番エクソンに31塩基の欠損を発見した。この欠損は他のタンパク質との結合に必要なプロリン-リッチ領域のプロリン残基を消失させる。この機能消失が正常な細胞内情報伝達機構を攪乱し精神遅滞を発症させると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that human CIN85 gene exists to the short-arm of X chromosome. We also found that CIN85 co-localizes in neuronal dendritic spines with Oligophrenin 1 that is a responsible gene for X-linked mental retardation and with PSD-95 that is one of scaffold protein. Moreover, we had read the DNA sequence of CIN85 gene (approximately 360.7 kbp) from the genome of patients of hyperactivity disorder and X-linked mental retardation family that has been provide from Göttingen University and compared the sequence with that of normal person. As a result, we found a deficit of 31 bases to 13th exons of several male patients. This defect was deleted proline residues of the Proline-rich region required for binding with other proteins. In patients with X-linked mental retardation, loss of function of the Proline-rich region seems to be induced the disturbance to intracellular signal transduction of normal brain function.

研究分野：神経内分泌

キーワード：CIN85 多動症 精神遅滞

### 1. 研究開始当初の背景

落ち着きがなく教室を走り回るなどの行動をとる子供にみられる「注意欠陥・多動性障害 (ADHD)」に代表される多動症はその原因遺伝子も含め全貌が明らかでない。現在まで報告された多動症の発症原因はいずれも多くの症例を説明するに至っていない。最近、申請者らは、ADHDの原因について、CIN85 という膜受容体発現を制御する遺伝子の欠損や異常が、神経伝達物質ドーパミンの受容体発現異常を誘起し多動症を引き起こすという新たな発症メカニズムを発見した (EMBO Journal, 2010)。この成果は、「日本経済新聞」「読売新聞」等に掲載された。この発見は、神経伝達物質の分泌量や受容体自体の遺伝子異常ではなく、受容体の分解を制御する分子の異常によるもので全く新しい発症メカニズムである。

### 2. 研究の目的

本研究の目標は「多動症の家系における遺伝子の解析により、CIN85 異常によるヒト多動症の遺伝子診断法の確立」にある。これまでに明らかになった、CIN85 欠損マウスの多動性や発症の性差、ヒトCIN85 の染色体上の位置などを考え合わせると、多動症患者におけるCIN85遺伝子異常の可能性は高い。CIN85 遺伝子の塩基配列を同定しその情報を基に、「遺伝子欠損」、「部分欠損」、「塩基変異」、「タンパク質変異」等による機能欠失や機能低下などの異常の同定を研究開発期間の目標とする。女兒の精神遅滞であるレット症候群 (Rett Syndrome) では患者の80%で遺伝子変異が検出される (Brandt and Zoghbi, Gene Review, 2004)。多動症における本遺伝子診断法の検出精度については、複数のプライマーセットで検査することで70-80%以上の精度を目指したい。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒトCIN85遺伝子の解析

ドイツ ゲッチンゲン大学 医学部附属病院 人類遺伝学研究所のShoukier 博士から多動症患者のゲノムDNAの供給を受け常法によりDNA解析を行う。

GenBankから提供されているCIN85遺伝子の塩基配列から、遺伝子領域を全て網羅するプライマーを設計し合成する。

Shoukier 博士から提供された多動症患者のDNAと設計・合成されたプライマーを用いてCIN85遺伝子領域の断片をPCRにて増幅、クローニングベクターにクローニングする。

群馬大学 生体情報ゲノムリソースセンターの3130xI ジェネティックアナライザーションシステム (アプライドバイオシステム社) を使って塩基配列を決定する。

塩基配列の「相関解析」を (独) 理化学研究所 ゲノム医科学研究センターにておこない、ゲノム中の一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) の中から、ADHD等の行動異常疾患との相関が強い領域を絞りこむ。

疾患群と対照群間での遺伝子型頻度の差を利用して遺伝統計学的に疾患関連遺伝子領域を同定する。

遺伝子診断のためのプロトコールを作成する。

### 4. 研究成果

(1) CIN85 遺伝子はヒト X 染色体短腕 (Xp22.1-21.3) に存在し X 染色体に連鎖した精神遅滞の原因遺伝子である Oligophrenin 1 (オリゴフレニン 1) や細胞内の Scaffold protein (足場タンパク質) である Post-synaptic density-95 (PSD-95) と神経細胞樹状突起棘で共存していることを発見した (図 1 参照)。これは CIN85 が X 染色体にリンクした精神疾患の発症メカニズムに深く関与していることを示唆している。

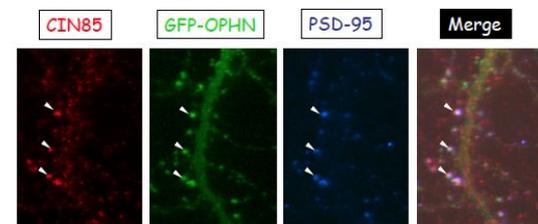


図 1. マウス海馬培養神経細胞で CIN85 を赤色、X 関連精神遅滞の原因遺伝子の一つである Oligophrenin 1 を緑色、Scaffold protein である PSD-95 を青色で蛍光染色した。CIN85 は Oligophrenin 1、PSD-95 と神経細胞の棘突起に局在していた。

(2) ドイツ ゲッチンゲン大学から提供された多動症及び X 染色体連鎖性精神遅滞家系の患者 (XLMR) のゲノム DNA から CIN85 遺伝子領域約 360.7 kbp の塩基配列を解読し、正常者の配列と比較・検討した。その結果、複数の男性患者の 13 番エクソンに 31 塩基の欠損を発見した (図 2 参照)。

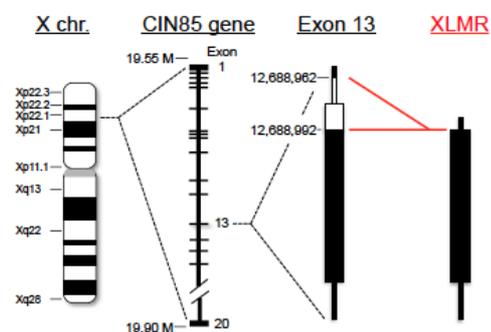


図 2. 多動症及び X 染色体連鎖性精神遅滞家系の患者の CIN85 遺伝子 13 番エクソンに 31 塩基の欠損が認められた。

この欠損はアミノ酸翻訳のフレームを変化させ、他のタンパク質との結合に必要な Proline-rich 領域 (Pro-rich) の Proline (プロリン) 残基を消失させる。X 染色体連鎖性精神遅滞 (XLMR) の患者では、この Proline-rich 領域の機能消失が正常な脳機能、例えば他の分子との結合など、における細胞内情報伝達機構を攪乱し精神遅滞を発症させると考えられる (図 3 参照)。この結果は、本症の発症メカニズムを理解するうえで極めて重要な知見である。

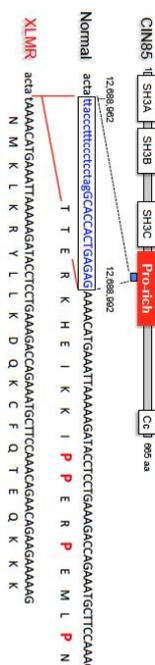


図 3. 多動症及び X 染色体連鎖性精神遅滞家系の患者に認められる CIN85 のフレームシフトによる Proline-rich 領域の消失。

多動性障害と X 連鎖精神遅滞のための遺伝子診断を確立することを目的としたこのプロジェクトであったが、我々は患者から十分な試料を得ることができなかった。近い将来、多くの試料のさらなる分析により、我々は、これらの疾患の遺伝子診断に確立したいと考えている。

#### 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 10 件)

1. Lesmana R, Shimokawa N, Takatsuru Y, Iwasaki T, Koibuchi N. Lactational exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyl (OH-PCB 106) causes hyperactivity in male rat pups by aberrant increase in dopamine and its receptor. *Environ. Toxicol.* 29, 876-883, 2014. doi: 10.1002/tox.21815. 査読有

2. Ichinose T, Lesmana R, Yamamoto A, Kobayashi T, Shitara F, Shimoyama D, Yusuke Takatsuru Y, Iwasaki T, Shimokawa N, Takagishi K, Koibuchi N. Possible involvement of IGF-1 signaling on compensatory growth of the infraspinatus muscle induced by the supraspinatus tendon detachment of rat shoulder. *Physiological Report* 2, e00197, doi: 10.1002/phy2.197, 2014. 査読有

3. Shimokawa N, Yousefi B, Morioka S, Yamaguchi S, Ohsawa A, Hayashi H, Azuma A, Mizuno H, Furudate S, Haijima A, Takatsuru Y, Iwasaki T, Umezu M, Koibuchi N. Altered cerebellum development and dopamine distribution in a rat genetic model with congenital hypothyroidism. *J. Neuroendocrinol.* 26, 164-175, 2014. doi: 10.1111/jne.12135. 査読有

4. Toya S, Takatsuru Y, Amano I, Shimokawa N, Koibuchi N. Early-life-stress affects the homeostasis of glutamatergic synapses. *E. J. Neurosci.* 40, 3627-3634, 2014. doi: 10.1111/ejn.12728. 査読有

5. Shimokawa N, Masuda S, Masuda H, Koibuchi N. CIN85 defect in brain and neurobehavioral disorder: involvement in excess dopamine signaling. *Hormonal Studies*, doi: 10.7243/2052-8000-1-2, 2013. 査読有

6. Itoh M, Shimokawa N, Tajika Y, Murakami T, Aotsuka N, Lesmana R, Farenia R, Iwasaki T, Okada J, Yorifuji H, Koibuchi N. Alterations of biochemical marker levels and myonuclear numbers in rat skeletal muscle after ischemia-reperfusion. *Mol. Cell. Biochem.* 373, 11-18, 2013. doi: 10.1007/s11010-012-1470-0. 査読有

7. Takatsuru Y, Eto K, Kaneko R, Masuda H, Shimokawa N, Koibuchi N, Nabekura J. Critical role of the astrocyte for functional remodeling in contralateral hemisphere of somatosensory cortex after stroke. *J. Neurosci.* 33, 4683-4692, 2013. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2657-12.2013. 査読有

8. Hirooka-Masui K, Lesmana R, Iwasaki T, Xu M, Hayasaka K, Haraguchi M, Takeshita A, Shimokawa N, Yamamoto K, Koibuchi N. Interaction of silencing mediator for retinoid and thyroid receptors with steroid and xenobiotic receptor on multidrug resistance 1 promoter. *Life Sci.* 92, 911-915, 2013. doi: 10.1016/j.lfs.

2013.03.007. 査読有

9. Xu M, Sulkowski ZL, Parekh P, Khan A, Chen T, Midha S, Iwasaki T, Shimokawa N, Koibuchi N, Zavacki AM, Sajdel-Sulkowska EM. Effects of Perinatal Lipopolysaccharide (LPS) Exposure on the Developing Rat Brain; Modeling the Effect of Maternal Infection on the Developing Human CNS. *Cerebellum* 12, 572-586, 2013. doi: 10.1007/s12311-013-0465-z. 査読有

10. Xu M, Iwasaki T, Shimokawa N, Sajdel-Sulkowska EM, Koibuchi N. The effect of low dose lipopolysaccharide on thyroid hormone-regulated actin cytoskeleton modulation and type 2 iodothyronine deiodinase activity in astrocytes. *Endocr. J.* 60, 1221-1230, 2013. doi: 10.1507/endocrj.EJ13-0294. 査読有

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Shimokawa N, Sairenji T, Kaneko R, Koibuchi N. Lack of CIN85 causes impairment of maternal behaviour. 16th Congress of the European Neuroendocrine Association. September 10-13, 2014, Sofia, Bulgaria

2. Srour M, Shimokawa N, Hamdan FF, Dobrzaniecka S, Rouleau GA, Poulin C, Michaud JL. The cerebral glucose transporter SLC45A1 is mutated in individuals with non-syndromic intellectual disability and epilepsy. American Society of Human Genetics 2013 October 22-26, 2013, Boston, MA, USA

3. Koibuchi N, Iwasaki T, Haijima A, Takatsuru Y, Shimokawa N. The effect of low dose lipopolysaccharide on thyroid hormone-regulated actin cytoskeleton modulation and type 2 iodothyronine deiodinase activity in astrocytes. 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology. March 10-14, 2013, San Antonio, TX, USA

4. Shimokawa N, Ikezawa J, Masuda S, Koibuchi N. Impairment of maternal behaviour by lack of CIN85. FENS Featured Regional Meeting. September 11-14, 2013, Prague, Czech Republic

5. Shimokawa N. Decision mechanisms to child-rearing in fetal period. International Symposium on Prediction and Decision Making 2013. October 13-14, 2013, Kyoto, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下川 哲昭 (SHIMOKAWA, Noriaki)  
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：90235680

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：