

表 題 発達障害の原因遺伝子の同定・解析

論文の区分 博士課程

著 者 名 松本 歩

担当指導教員氏名 山形 崇倫 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系 専攻  
生殖発達医学 分野  
成育医学

2014 年 1 月 10 日申請の学位論文

## 目次

1. 序論	1
2. 対象と方法	
2-1. 対象	
1) 患者解析	
a) 対象患者	5
b) コントロール	5
2) マウス、ラット	6
2-2. 方法	
1) リンパ球培養と DNA 抽出	6
2) array comparative genomic hybridization (aCGH)	6
3) DNA 変異解析	
a) PCR	7
b) ダイレクトシーケンス	8
4) ラット脳におけるシナプトソーム分画抽出	8
5) Western blot 解析	
a) マウス脳における Lin7 蛋白の発現解析	9
b) ヒト RPS6KA3 発現解析	10
6) 細胞へのプラスミド導入法	11
7) 子宮内エレクトロポレーション法	12
8) X-chromosome inactivation (XCI) assay	13
3. 結果	
3-1. 発達障害患者 (ASD 患者および ID 患者)における aCGH	14
3-2. aCGH 解析で検出されたシナプス足場蛋白遺伝子の解析	
1) 足場蛋白 SHANK3 解析	
(ASD 患者における <i>SHANK3</i> 欠失の同定)	15
2) 足場蛋白 LIN7A および LIN7B 解析	
a) ID 患者における <i>LIN7A</i> 欠失の同定	16
b) ASD 患者における <i>LIN7B</i> 重複の同定	18
c) ASD 患者における <i>LIN7B</i> 遺伝子変異解析	19
d) LIN7A, LIN7B の蛋白機能解析	
① マウス胎児の発達過程における脳での Lin7 蛋白	
の発現量の変化	20
② 成ラットにおけるシナプスでの Lin7 の局在	20
③ <i>mLin7A</i> RNAi のノックダウンの確認	21

④Lin7A ノックダウンによる神経細胞の障害	
④-1. 大脳皮質における Lin7A の神経細胞の移動障害-----	22
④-2. Lin7A 欠失における axon の伸長障害-----	23
⑤ <i>mLin7B</i> RNAi のノックダウンの確認-----	24
⑥ 大脳皮質における Lin7B の神経細胞の移動障害-----	25
3-3. <i>RPS6KA3</i> 重複家系の解析	
a) 軽度 ID 家系における <i>RPS6KA3</i> 重複の検出-----	26
b) <i>RPS6KA3</i> の発現-----	27
c) XCI 解析-----	28
4. 考察 -----	30
5. まとめ -----	37
6. 参考文献-----	38
7. 謝辞-----	45

略語

〈日本語〉

自閉性障害、自閉症スペクトラム障害 (Autism spectrum disorder, ASD)

広汎性発達障害 (pervasive developmental disorder, PDD)

特定不能の広汎性発達障害 (pervasive developmental disorder-not otherwise specified, PDD-NOS),

染色体微細構造異常 (copy number variation; CNV)

知的障害 (Intellectual disability; ID)

足場蛋白 (scaffold protein)

知能指数 (Intelligence quotient; IQ)

〈英語〉 アルファベット順

aCGH (array comparative genomic hybridization)

ADHD (attention-deficit hyperactivity disorder)

AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)

CADM1 (cell adhesion molecule 1)

CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase)

CLS (Coffine Lowry Syndrome)

DIMS-IV (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fourth Edition)

CREB (cAMP response element-binding protein)

CREBm (CREB-response elements)

DSM-5 (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fifth Edition)

*GRIN2B* (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate subunit 2B)

human X-linked androgen receptor gene (HUMARA)

mGluR (metabotropic glutamate receptor)

*NRXN* (neurexin)

*NLGN* (neuroligin)

NMDAR (N-methyl-D-aspartate-receptor)

PDD (Pervasive developmental disorder)

PBS (Phosphate Buffered Saline)

PSD (postsynaptic density)

*RPS6KA3* (The ribosomal protein S6 kinase, 90-kb, polypeptide 3 gene)

*SHANK3* (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3)

XCI (X-chromosome inactivation)

## 1. 序論

発達障害とは、発達過程において発現する脳機能の障害であり、自閉性障害などの広汎性発達障害（PDD）、学習障害、注意欠陥多動性障害（ADHD）、知的障害（ID）などに分けられる。このうち、自閉性障害は、社会性やコミュニケーションの障害、常同性などの行動異常を特徴とし、小児の約1%の頻度で見られる[1-3]。男性では女性の約4倍の発症頻度である[4]。1994年から適用されているDMS-IV（The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fourth Edition）では社会性の障害、コミュニケーションの障害と、限定された行動や常同性の3つの主要症状を示すものが自閉性障害で約7~8割を占め[5]、言語障害を欠くものがAsperger障害、一部を示すが診断基準を満たさないものが特定不能の広汎性発達障害（PDD-NOS）と分類されていた。近年は、自閉症の特徴がspectrumに存在していることから、すべてが自閉症スペクトラム障害（Autism Spectrum disorder, ASD）[5]として扱われ、2013年に発表されたDSM-5（The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fifth Edition）ではすべての細分化が取り除かれ、自閉症スペクトラム障害（Autism Spectrum disorder, ASD）という診断名が採用された。ASDは、同胞の罹患率は約6%で、一卵性双胎での一致率は60~92%、二卵性双胎では0~28%であることから[4, 6]、遺伝性疾患であることが示唆されている。ASDの原因疾患として、結節性硬化症、Fragile X症候群、Rett症候群、15q欠失や重複など、ASD症状を示す疾患の遺伝子に関連するものが約5%を占める[4, 7]。非症候性のASDの遺伝的背景として、染色体微細構造異常（copy number variation; CNV）によるものが5~20%[8, 9]、単一遺伝子変異によるものが10~20%を占めている。ASDの原因遺伝子は多岐にわたり[10]、いずれも報告されている原因遺伝子の頻度は約1%以下と低い。ASDの原因遺伝子同定の難しさには、原因遺伝子の多

様性や、環境因子や複数の遺伝子が発症に関与する多因子遺伝、あるいは数個の感受性遺伝子の相互作用によって発症するというoligogenic model [11]の可能性があげられる。これらが複雑に絡み合い、同一の遺伝子異常を持っていながら、一方ではASDを発症し、一方では発症しないという報告[12, 13]がある。

自閉性障害の病因遺伝子として最初に報告された代表的なものは2003年にJamainらが同定した*NLGN3 (neuroligin 3)* (Xq13) と*NLGN4* (Xp22.3)である[14]。NLGNsは、細胞接着分子でシナプス後膜側に局在する。その後NLGNと結合するシナプス前蛋白の*neurexin (NRXN)* の変異も同定された[15]。2008年には自治医科大学小児科学から、同様に、シナプス結合に関与する*CADM1* (cell adhesion molecule 1) の変異が報告された[16]。さらに、22q13.3欠失部位からASDの責任遺伝子としてシナプス後膜でNLGN－PSD95と結合する*SHANK3* (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3) が同定された。*SHANK3*の欠失、重複、塩基置換はASDの1.0~2.3%に検出され、比較的頻度の高い病因遺伝子である[17, 18]。SHANKはSHANK familyとして SHANK1～SHANK3があり、PDZ domainを持ち、主な足場蛋白 (Scaffolds) として樹状突起棘のpostsynaptic density (PSD) に局在している。SHANKsはNLGN、グルタミン酸受容体の mGluR (metabotropic glutamate receptor)、NMDAR (N-methyl-D-aspartate-receptor)、AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) 等がシナプス後膜で結合しシナプスが安定して存在するのに必須であり、変異によりシナプス結合やグルタミン酸情報伝達が不安定になり発症すると考えられている[19-21]。さらに、近年には大規模な全エクソーム解析が行われ[22-24]、軸索樹状突起伸長のガイダンスに働く*NTNG1* (nectin G1) や、 $\beta$ -catenin や P53 のシグナルを調整する*CDH8*(chromodomain helicase DNA binding protein8) など[22]の新たな変異

が多数検出されてきている。シナプスに関わる病因遺伝子産物の局在を図1に示す。

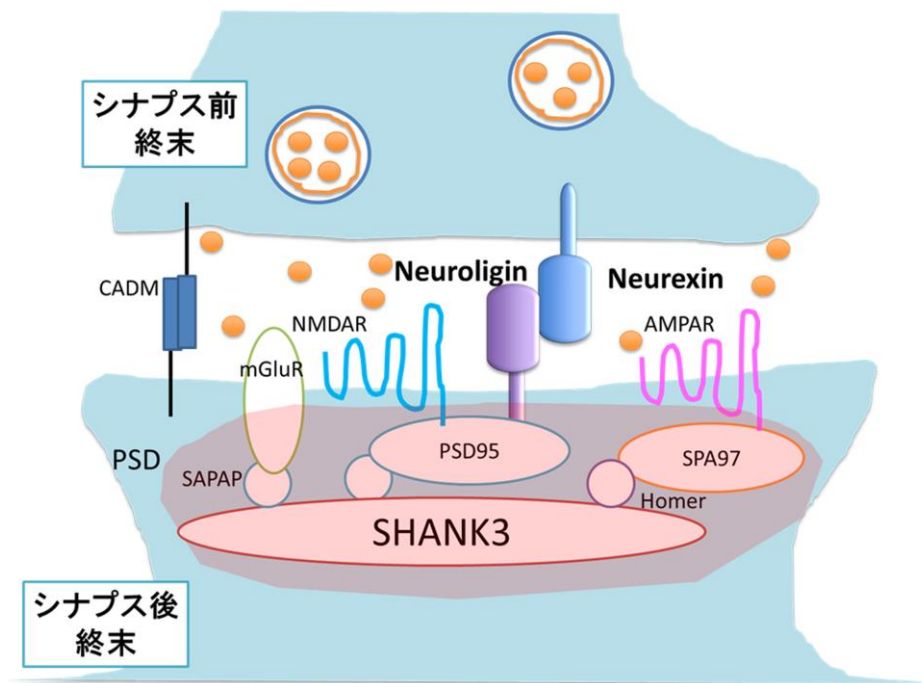


図 1. シナプス結合と機能に関与する分子

Neurexin、Neuroligine、SHANK3をはじめシナプスに関連する分子の多くが自閉症との関連が示唆されている。略語：SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3)、mGluR (metabotropic glutamate receptor)、CADM1 (cell adhesion molecule 1)、PSD (postsynaptic density)。

ID は、知的能力全般の遅れを示し知能指数 70 未満で診断する。罹患率は 2~3%の頻度で[25]、Rho GTPase、Ras/MAPK、シナプス関連等の分子機構に関連する遺伝子が病因であることが報告されている[26]。ASD の 60~80%に ID が合併する[26, 27]。ASD でのエクソーム解析の報告でも *MBD5* (methyl-CpG-binding domain 5, mental retardation: autosomal dominant 1)、*RPS6KA3* (Coffin-Lowry syndrome)、*DYRK1A* (dual-specificity tyrosine

phosphorylation regulated kinase 1A: the Down's syndrome candidate gene) などの ID の原因遺伝子が含まれており [22]、両者とも共通する病態が推定される。

近年、ASD と ID を示す結節性硬化症で mTOR、脆弱 X 症候群で mGluR を標的とした治療薬の脳機能改善効果が報告されており [28, 29]、結節性硬化症、脆弱性 X 症候群のみならず ASD への効果も検証され始めている。他にも、特定の分子機構に関連する病因を持つ患者がグループ化されると考えられる。治療標的となる分子基盤の同定は ASD の病態理解、治療法開発において必要不可欠である。

上記背景から ASD、ID の aCGH (array comparative genomic hybridization) 解析による CNV 検出を行い、候補遺伝子を同定し、さらに機能解析することで原因遺伝子の同定、病態解明と、各病因遺伝子間の共通した分子機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

本研究では、ID、ASD 患者の aCGH 解析により足場蛋白である *SHANK3* の欠失、*LIN7A* の欠失例、*LIN7B* の重複例を検出した。足場蛋白として機能する *LIN7* は有力な ID、ASD の候補遺伝子であると考え変異解析、機能解析を行った。また、軽度 ID の一家系において *RPS6KA3* (The ribosomal protein S6 kinase, 90-kb, polypeptide 3 gene) の重複を検出し、本家系の ID の原因遺伝子の可能性を調べるために、発現を解析した。

## 2. 対象と方法

### 2-1. 対象

#### 1) 患者解析

a)対象患者: DSM-IV で診断した ASD および知能指数 70 以下の ID で、親権者に説明し書面にて同意が得られた患者を対象とし、aCGH 解析を行った。また、研究にあたり自治医科大学の倫理委員会の許可を得た。

ASD 例 49 例（自閉性障害: 36 例、Asperger 障害: 2 例、PDD-NOS: 11 例）、男性 40 名、女性 9 名、採血時の年齢平均 8.9 歳（3~36 歳）であった。ID 合併なしは 6 例で、ID 合併は 40 例（81.6%）であった。3 例は詳細が不明であった。合併症として、てんかんが 16 例（32.7%）であった。その他、ADHD、うつ状態、小頭症、低身長、単純性肥満、Duchenne 型筋ジストロフィー、多発性外骨腫各々 1 例ずつ見られた。

ID 例は IQ70 未満の診断基準を満たした 40 例について検討した。男性 21 名、女性 19 名、採血時の年齢平均 3.3 歳であった。ID の重症度では重度 23 例（57.5%）、中等度 6 例（15.0%）、軽度 11 例（27.5%）であった。合併疾患では、小頭症、大頭症、脳構造異常は 15 例（37.5%）、てんかん 17 例（42.5%）、多発小奇形 13 例（32.5%）、心疾患 7 例（17.5%）、骨格異常 7 例（17.5%）であった。

変異解析については、ASD 日本人 87 名、白人 79 名について解析した。白人サンプルは、The Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) (CA, USA) から購入した。

b)コントロール: 変異解析のコントロールは白人 114 人（男性 59 名、女性 55 名）について行った。なお、検体は、Coriell Institute for Medical Research (NJ, USA) より購入した。

## 2)マウス、ラット

マウスは系統 ICR を使用、ラットは系統 SD で生後 40 日を用いた。

### 2-2. 方法

#### 1) リンパ球培養と DNA 抽出

末梢血リンパ球を分離し、Epstein-Barr virus (EBV) で芽球化し、RPMI 1640 (Life technology, CA, USA) に 10% fetal bovine serum (Equitech-BIO, Tokyo, Japan)、penicillin-streptomycin (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml) を加えた培地で、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で培養した。リンパ芽球から genomic DNA を抽出した。濃度測定は Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いた。

#### 2) Array comparative genomic hybridization (aCGH)

Genomic DNA 1.0 µg を、ヌクレアーゼフリーウォーターと合わせて 26.0 µl に調整し Sure Tag DNA Labeling kit (Agilent technologies, CA, USA) の random primer 5.0 µl と 95°C で 10 分間反応させた。次に氷上で、5× Reaction buffer 10 µl, 10×dNTP 5 µl、Exo-Klenow 1.0 µl を加えた。患者検体は Cy5、正常対照検体は Cy3 を 3.0 µl ずつ加え蛍光標識し、37°C で 2 時間加温し、genomic DNA を増幅した。Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Millipore, MA, USA) を用いて蛍光標識サンプルを精製した。ASD 患者検体と性別を一致させた正常対照検体の蛍光標識サンプル各 19.5 µl をあわせ、Agilent Oligo aCGH Hybridization kit (Agilent technologies) でハイブリダイゼーション液を作成し、Human Genome CGH Microarray 4×180K (Agilent

technologies) 上で 65°C, 20rpm で振盪しながら 24 時間加温した。ハイブリダイズさせた array を Oligo aCGH Wash Buffers 1, 2 で洗浄した。

アレイは、Agilent G2365BA マイクロアレイスキャナで読み取り、画像ファイルを作成した。画像ファイルはソフト Feature Extraction で数値化し、数値化したデータを解析ソフト (Agilent genomic workbench) で解析した。

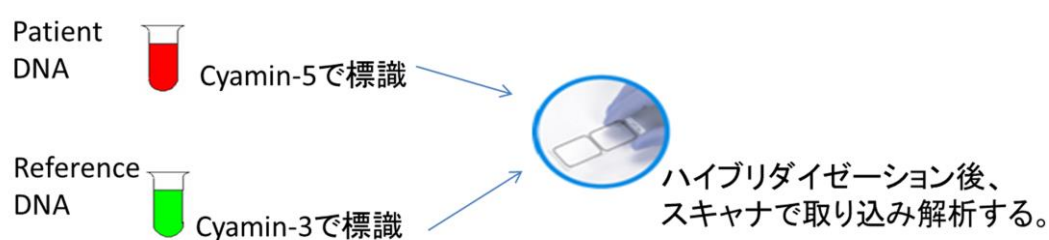


図 2. アレイ CGH

患者 DNA を Cyamin 5, Reference DNA を Cyamin 3 で標識し、共にハイブリダイゼーションし、遺伝子の数の異常 (欠失、重複) を検出する。

### 3) DNA 変異解析

#### a) PCR

リンパ芽球から抽出した genomic DNA を用い、*LIN7B* の全エクソンとその近傍を PCR で増幅した。PCR 反応液は、DNA 50 ng、10X PCR Buffer (Takara, Shiga, Japan) 2.0  $\mu$ l、dNTPs 200 mM (Takara) 1.6 $\mu$ l、プライマー各 0.2  $\mu$ M、Taq DNA polymerase (Takara) 0.1  $\mu$ l に純水を加え、総量 20  $\mu$ l に調整した。PCR 反応は、Gene Amp PCR System 9700 (Life technology) を使用し、94°C で 3 分反応後、94°C 30 秒、各プライマーの annealing 温度 30~60 秒、72°C 30~60 秒を 35 サイクル行い、その後伸長反応を 72°C 10 分行なった(表 1)。また、Exon1、2、3、6 は、2 $\times$ GC bufferI (Takara) 10  $\mu$ l、Takara LA taq 0.1  $\mu$ l

を用いた。

表 1. *Lin7B* の primer とアニーリング温度

	Primer	Product size (bp)	Anneling tempreture (°C)
Exon1	F:aaaggtacacacagaccgaacctg R:agaaaccccgagtgtcagagacc	665	65
Exon2	F:gctctccttgcttctctgcgtc R:aactcccgaagaaccctgag	345	65
Exon3	F:gggttcttcgggagttgtagttttc R:tctgtggagacgggggtttcac	718	67
Exon4	F:gggtattcaagacacacaccaaattg R:tactgccctcccagagagagaaggttg	623	60
Exon5	F:tgggagggttttgaggaggacac R:cagtaggttcgtatcttgggatg	557	65
Exon6	F:taaccccaggctcccaaaccag R:ggaaaaggcttctcaacggc	498	62

#### b)ダイレクトシーケンス

PCR 産物をカラム処理にて精製し、精製後電気泳動にて PCR product 30 ng にシーケンス primer 9.6 pmol を加え超純水で合計 21  $\mu$ l にし、シーケンスはオペロンバイオテクノロジー (Tokyo, Japan) に外注した。疾患との関連が推定された変異に関しては、対照群で同様に塩基配列を解析した。

#### 4) ラット脳におけるシナプトソーム分画抽出

成ラットの大脳皮質の subcellular fractionation 発現解析

成ラット脳を ice Buffer A (5 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM  $MgCl_2$ , 0.5 mM  $CaCl_2$ , phosphatase inhibitors (1 mM NaF, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate)、protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM benzamidine, 0.1 mM pepstatin) を Teflon homogenizer (12 strokes)で 1,400 $\times g$ , 10 分で遠心分離した。上清 (S1)を 13,800 $\times g$ , 10 分で遠心分離した。

その上清 (S2) を取り除き、そのペレット (P2) を Buffer B (0.32 M sucrose, 6 mM Tris (pH 8.0), phosphatase proteases inhibitor) を Teflon homogenizer (5 strokes) で再懸濁した。再懸濁した P2 は discontinuous sucrose gradient (0.85 /1.0 /1.15 M, 6 mM Tris (pH 8.0)) に loading して、 $82,500\times g$ 、2 時間遠心分離した。1~1.15 M sucrose 間の synaptosome 分画 (Synaptosome) を採取し、4ml の Buffer B に加えた。さらに同量の Buffer C (6 mM Tris (pH 8.1), 1% Triton X-100) を加え 15 分間混合し、 $32,800\times g$  で 20 分間遠心分離した。得られたペレット (PSD I) に Buffer D (6 mM Tris (pH 8.1), 0.5% Triton X-100) で 15 分間抽出し、 $201,800\times g$  で 1 時間遠心分離し、ペレット (PSD II) を得た。各分画を後述の Western blot 法で Lin7 の発現量を解析した。

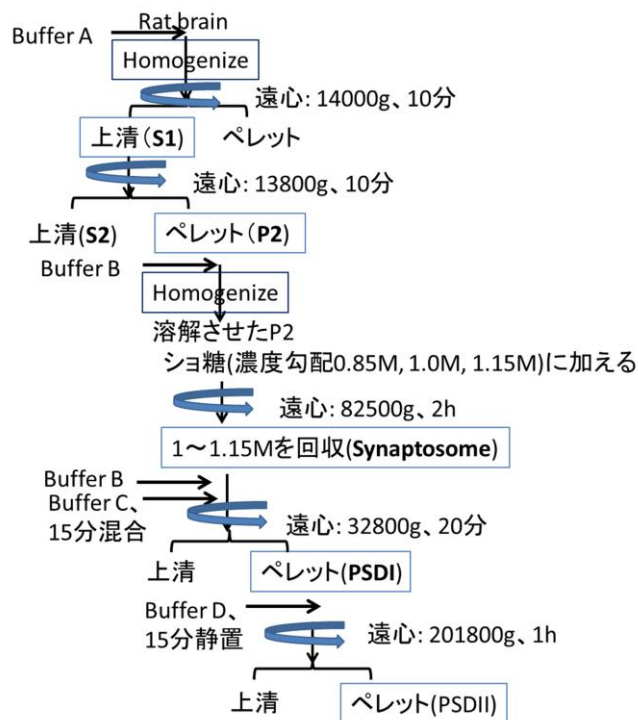


図 3. シナプトソーム分画法

## 5) Western blot 解析

### a) マウス脳における Lin7 蛋白の発現解析

発達期脳（胎生 13.5, 15.5, 17.5 日、生後 0, 15, 30 日）の脳皮質は、溶解液（50mM Tris-HCl buffer, pH7.5, 0.1M NaF, 5mM EDTA, 10 $\mu$ g/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 2% SDS）を用いて抽出し、15,000 r.p.m.で 30 分遠心した。なお、蛋白濃度には micro BCA protein assay reagent kit (Thermo Fisher scientific) を用いた。Western blot 法により Lin7 発現を解析した。一次抗体に polyclonal rabbit anti-Lin7A, Lin7B/C antibody[30]、mouse monoclonal glial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (Chemicon, CA, USA) を用いた。

#### b) ヒト RPS6KA3 発現解析

リンパ芽球ペレットに冷却した NP 40 lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 1%NP40, 0.5% Triton 1-100, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1 $\times$ protease inhibitor cocktail) [31]を100  $\mu$ lずつ加え、溶解させた。30分間アイス上に静置した後、13000 rpm、4 $^{\circ}$ Cで30分遠心した。抽出液は、Qubit-iT Protein Assay (Life technology) を用い蛋白濃度を測定した。7.5%ミニプロテインTGXゲル (BIO-RAD, Tokyo, Japan) の1ウェルあたり蛋白40 $\mu$ gにアプライし、電気泳動した。泳動後、セルロース泳動層でゲルからセルロース膜に転写させた。終濃度0.1% Tween20, 5%スキムミルクを含むPBS溶液でブロッキング後、RPS6KA3を検出する1次抗体としてmouse monoclonal E1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)、内因性のコントロールとしてMouse polyclonal anti-tubulin antibody (Sigma, Tokyo, Japan) を用い4 $^{\circ}$ Cで24時間反応後、2次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識されたanti-mouse IgG antibody (promega, WI, USA) を用い反応させた。Bufferで洗浄後、NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)、BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Roche Diagnostics) で発色させた。

データはImage J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) で解析した。

#### 6) 細胞へのプラスミド導入法

マウスの *Lin7A* の発現を抑制するための *Lin7A* RNAi 発現プラスミドとして、pSUPER-puro vector (OligoEngine, WA, USA) を用いて、pSUPER-mouse (m) *Lin7A*#1 と pSUPER-m*Lin7A*#2 の 2 種類を、また、*Lin7B* RNAi 発現プラスミドとして、pSUPER-m*Lin7B*#1 と pSUPER-m*Lin7B*#2 の 2 種類を作製した (表 2)。 *mLin7A* RNAi のノックダウンの確認は、COS 細胞に pCAG-Myc-m*Lin7A* を導入し、同時に、コントロールとしての pSUPER-puro vector、pSUPER-m*Lin7A*#1、あるいは pSUPER-m*Lin7A*#2 (表 2) を導入し、抗 Myc 抗体による Western blot 法で Myc-m*Lin7A* の発現を検出した。次に、*mLin7A* RNAi がヒトの *Lin7A* である human (h) *Lin7A* をノックダウンしないことを確認するために、COS 細胞に、pCAG-Myc-h*Lin7A* と pSUPER-puro vector、pSUPER-m*Lin7A*#1、あるいは pSUPER-m*Lin7A*#2 を導入し、抗 Myc 抗体による Western blot 法にて発現を検出した。最後に、*mLin7A* RNAi が *mLin7B* をノックダウンしないことを確認するために COS 細胞に、pCAG-Myc-m*Lin7B* と pSUPER-puro vector、pSUPER-m*Lin7A*#1、あるいは pSUPER-m*Lin7A*#2 を導入し、抗 Myc 抗体による Western blot 法にて発現を検出した。同様に、*mLin7B* RNAi についても確認した。

表 2. pSUPER-mLin7A#1, #2 と pSUPER-mLin7B#1, #2 の塩基配列と転写開始部位からの塩基番号 (hLin7A, hLin7B の下線は mLin7A と mLin7B と異なる配列を示す。)

pSUPER-mLin7A#1	5'-GTG TAT CAA TAC ATG CAT G-3'	202-220
pSUPER-mLin7A#2	5'-GTT GAA CTG CCA AAG ACT G-3'	325-343
hLin7A	5'-GTG TAT CAA T <u>A</u> T ATG CAT G-3'	
pSUPER-mLin7B#1	5'-GTG TAT GAA CAG CTC TAT G -3'	156-174
pSUPER-mLin7B#2	5'-TCT GTG AAT GGT GTG AGT G-3'	425-443
hLin7B	5'-GTG TAT G <u>A</u> G CAG C <u>T</u> T TAT G -3'	
hLin7B	5'-T <u>C</u> G GTG A <u>A</u> C GGT GTG A <u>G</u> C G-3'	

#### 7) 子宮内エレクトロポレーション法

子宮内エレクトロポレーション法を用いて、Lin7A、7B をノックダウンし機能の変化を観察した。子宮内で胎生 14.5 日マウスの側脳室に *Lin7A* の siRNA および EGFP 発現プラスミドを CUY21 electroporator (NEPA Gene, Chiba, Japan)、50ms、30V electronic pulse を 950ms 間隔、6 回で導入し、生後 2 日に神経細胞局在について共焦点顕微鏡で観察した。大脳皮質における神経細胞移動については生後 2 日において n=3 で解析した。Lin7A における axon 伸長障害については、同じく子宮内で胎生 14.5 日マウスの側脳室に Lin7A の siRNA および EGFP 発現プラスミドを導入し、生後 7 日における axon 伸長について冠状断で検討した (n=3)。

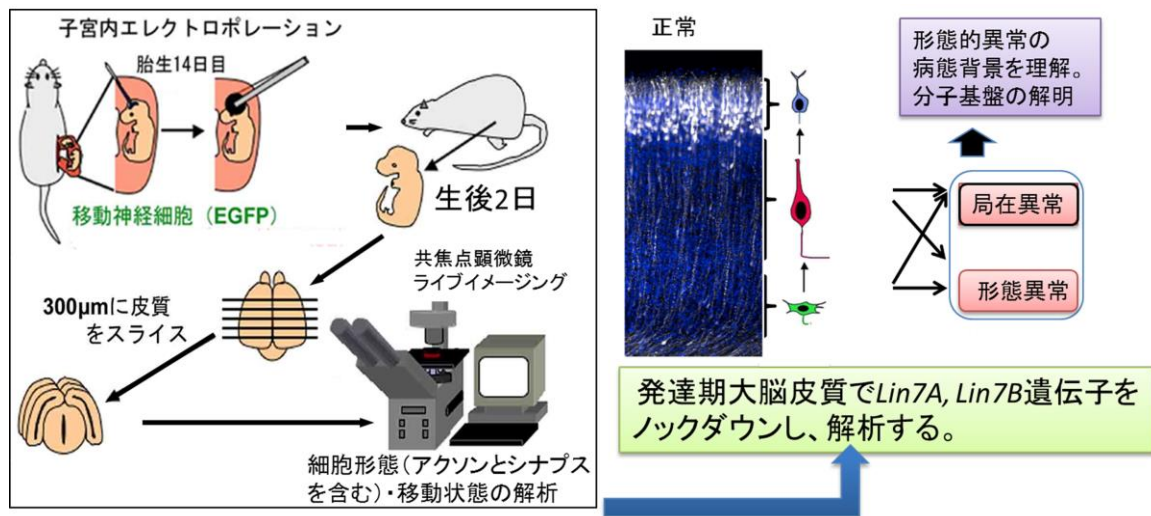


図 4.子宮内エレクトロポレーション法

胎生 14.5 日の子宮内マウス側脳室に *mLin7A*, *mLin7B* の RNAi プラスミドおよび移動神経細胞を検出する EGFP プラスミドを導入し、出生後 2 日における神経細胞局在について共焦点顕微鏡で検討した。

#### 8) X-chromosome inactivation (XCI) assay

XCI patterns は methylation-specific PCR-based assay を用いて解析した。

DNA は sodium bisulfite で処理し、HUMARA (human X-linked androgen receptor gene) の CAG 反復配列多型を増幅する様に設計したプライマーで増幅した[32]。その後、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Life technology) でシーケンスを行い、Genome Scan software (Life technology) で解析した。

### 3. 結果

#### 3-1. 発達障害患者(ASD 患者および ID 患者)における aCGH 解析

ASD 49 例、ID 40 例の aCGH を解析した。疾患と関連しないまたは頻度の高い benign CNV は解析から除外した。ASD では重複 5 例 (10.2%)、欠失 11 例 (22.4%) であった。このうち 3 例が *de novo*、1 例が母親由来の CNV (X 染色体)で、この 4 例 (8.2%) については ASD の病因 (pathogenic) CNV と考えられた。また、1 例が父親由来の CNV、2 例については片親のみの解析、9 例については両親の検査ができなかった。ID 40 例では重複 7 例 (25.0%)、欠失 9 例 (22.5%) であった(表 3)。このうち、1 例が *de novo*、3 例が母親由来 (X 染色体) であった。また 5 例は既知の遺伝子や症候群または欠失領域が広く両親の解析を要しなかった。これら 9 例 (22.5%) については病因 CNV と考えられた。7 例については両親の検査ができなかった。

表 3. aCGH 解析結果

	欠失例 (%)	重複例 (%)	病因確定例 (%)
ASD 49 例	11 例 (22.4%)	5 例 (10.2%)	4 例 (8.2%)
ID 40 例	9 例 (22.5%)	7 例 (17.5%)	9 例 (22.5%)

ASD 患者で検出された CNV のうち 1q21、1q22 の重複、1q25 の欠失、および 7q31.1 の欠失は Yang らの連鎖解析の review で[33]、ASD との関連が示されている遺伝子座 1q21-q44、7q21.2-q36.2 に局在していた (図 5)。また、検出した遺伝子の機能としては、シナプス関連遺伝子の他、中枢神経の発達に関連する遺伝子、細胞接着に関連する遺伝子、シグナル伝達に関連する遺伝子、神経細胞移動、投射、増殖、細胞骨格に関連する遺伝子等が検出された。

一方、IDに関連する CNV ではシナプス関連遺伝子その他、epigenetics に関連する遺伝子、細胞接着に関する遺伝子、シグナル伝達に関する遺伝子等が検出された。

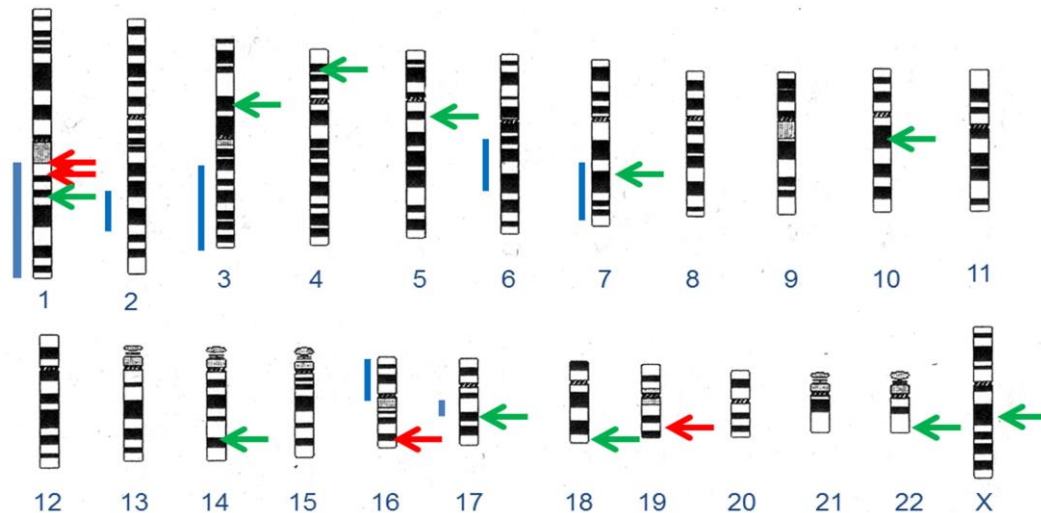


図 5. ASD 患者における CNV 検出部位

青線は、ASD との関連の報告がある遺伝子座。緑の矢印は欠失、赤の矢印は重複を示した部位。

### 3-2. aCGH 解析で検出されたシナプス足場蛋白遺伝子の解析

#### 1) 足場蛋白 SHANK3 解析 (ASD 患者における *SHANK3* 欠失の同定)

ASD の 6 歳男児例で 22q13.33 に局在する *SHANK3* の約 54 Kb の *de novo* の欠失を検出した (図 6)。Exon4 から 22 が欠失していると推定される。この患児は、社会性の障害、コミュニケーション障害とこだわり行動などの自閉症の主要症状を満たし、中等度の ID である。発語が出た後に一時消失し、現在は単語と非常に簡単な二語文を話している。

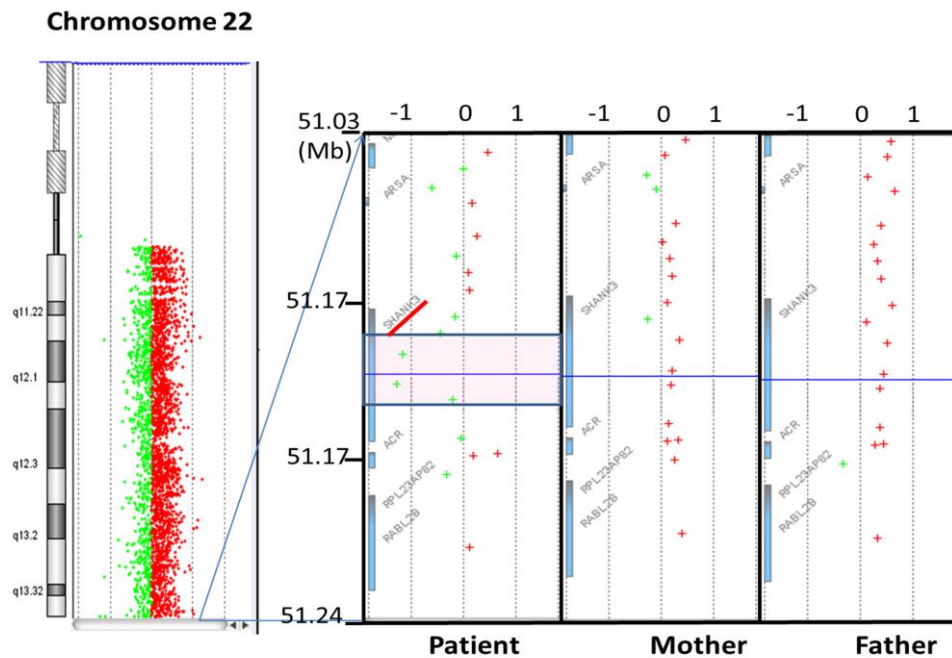


図 6. ASD 例における *SHANK3* の欠失

ASD 患者で 22q13.33 に局在する *SHANK3* の約 54 Kb の欠失を検出した。両親には欠失がなく、*de novo* の欠失である。

## 2) 足場蛋白 LIN7A および LIN7B 解析

### a) ID 患者における *LIN7A* を含む欠失の同定

ID、痙性麻痺、脳梁低形成の男児例で 12q21 に 46,XY,del(12)(q21.2q21.33) inv(12)(q13.1q21.2) の約 14 Mb の欠失を検出した。欠失部位にはシナプスの足場蛋白である *LIN7A* が局在していた (図 7)。

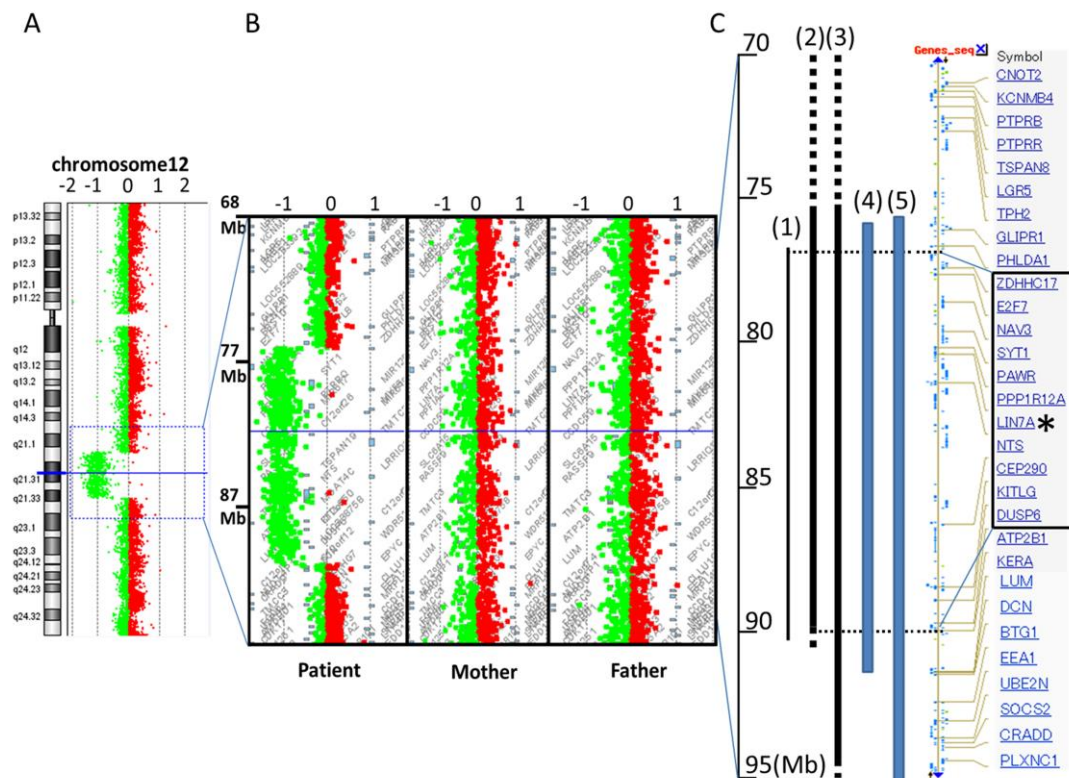


図 7. ID 例における *LIN7A* 欠失

A. chromosome 12 全体の aCGH 結果。12q21.2-q21.33 (77.2~91.2 M) の約 14Mb の欠失を示す。縦軸はセントロメアからの距離を示し、横軸は fold change を示す。-1 はヘテロの欠失を示し、+1 はヘテロの重複を示す。q21.2 から q21.33 が欠失していた。B. 欠失部位の拡大図。縦軸は 12q のテロメアからの距離(Mb)を示し、横軸はコピーナンバーの fold change を示す。-1 は 1 つのアレルの欠失を示し、+1 は 1 つのアレルの重複を示す。両親には欠失はなかった。C. 12q21.2 欠失の既報告例と主な局在遺伝子。(1)本例。(2) Rauen et al., 2002。(3) Klein et al. 2005。(4) Rauen et al. 2002。(5) Brady et al. 1999。(2),(3)は BAC array CGH で解析、点線は欠失の可能性のある範囲を示す。(4),(5)は G-banding での解析結果。

主な遺伝子は NCBI のデータを改変したもので、*ZDHHC17* から *DUSP6* は共通の欠失遺伝子を示す。※は *LIN7A* を示す。

b) ASD 患者における *LIN7B* 重複の同定

ASD の男児例で 19q31.33 の約 73 Kb の重複を検出した。検出部位に同じくシナプスの足場蛋白である *LIN7B* が含まれていた (図 8)。次に既知の ASD 遺伝子と我々の検出した ASD 遺伝子を Ingenuity にて機能図を作成した (図 9)。*LIN7B* は *GRIN2B* と蛋白結合する[34]ことから、*LIN7B* および *LIN7A* を ASD、ID の候補遺伝子と考え、次に変異解析、機能解析を行った。

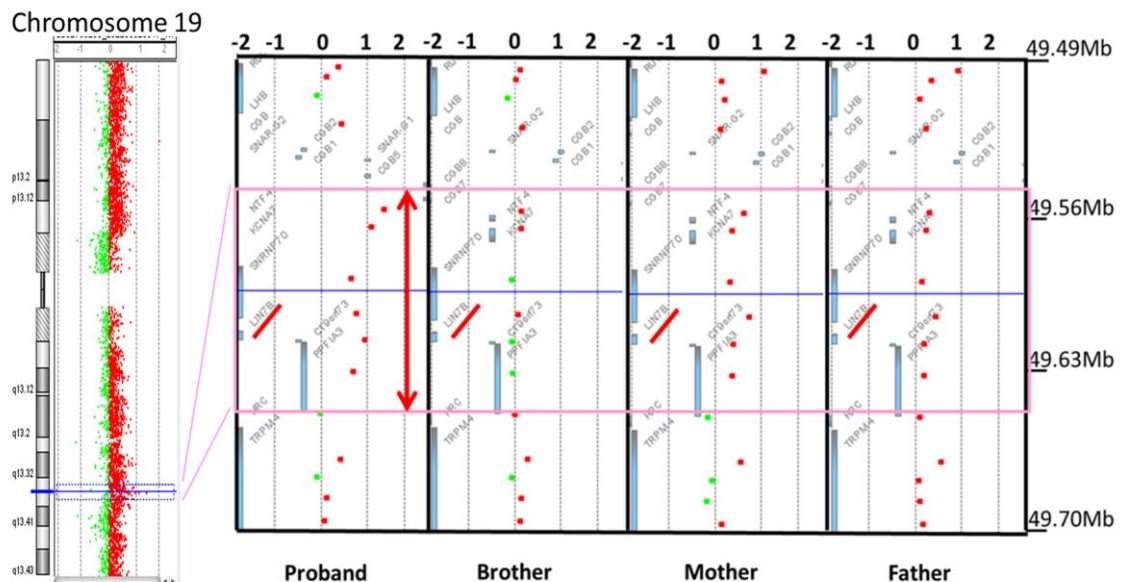


図 8. ASD 例における *LIN7B* 重複

Chromosome 19q31.33 の約 72 Kb の重複を検出した。重複部位に *LIN7B* が存在していた。両親、弟 (ASD) は重複を認めない。

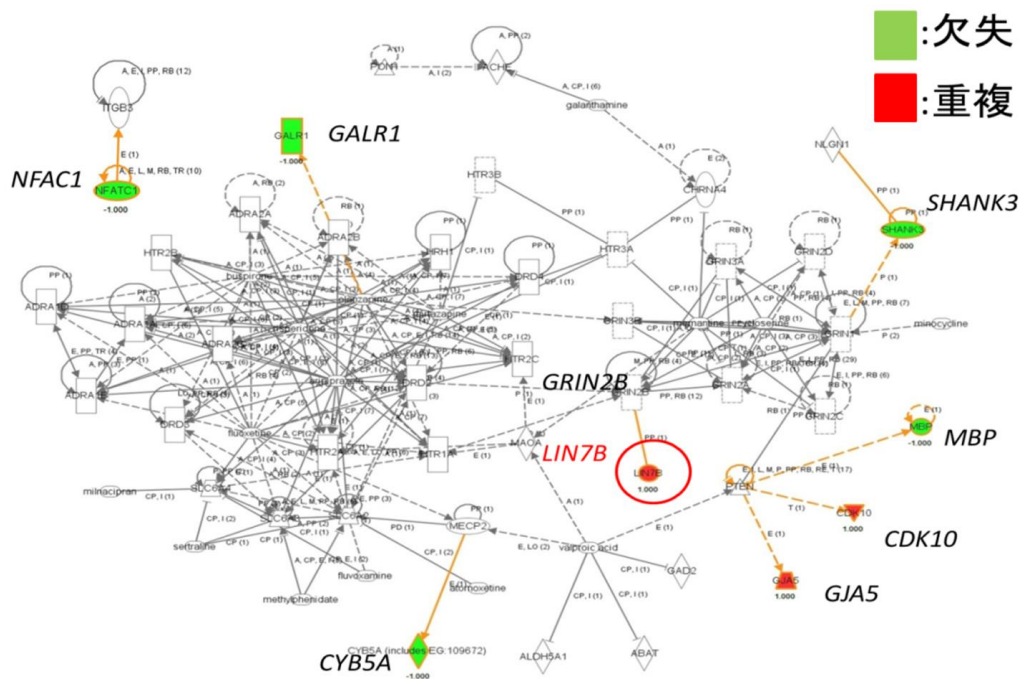


図 9. 既知の ASD の genes との機能図

本研究の ASD 例で検出した遺伝子で、欠失は緑、重複は赤で示す。  
*LIN7B*は *GRIN2B*と蛋白相互作用を示す。(Analyzed by Ingenuity)

### c) ASD 患者における *LIN7B* 遺伝子変異解析

ASD 166 例について *LIN7B* のシーケンス解析を行い、1 例に c. 602+1G>C、Exon5 のドナーサイトの変異を検出した (図 10)。cDNA を用い、Exon4 および Exon6 に primer を設計し、RT-PCR を行った。非罹患例では 300 bp に 1 本のバンドが濃く見られたのに対し、変異例では 300 bp と 150bp の 2 本のバンドが検出された。クローニングの後、バンドをシーケンスすると非罹患例では、Exon4、Exon5、Exon6 と順に連結しているのに対して、変異例では Exon4 と Exon6 が連結し、Exon6 が frame shift していた。これら Exon5 の欠失は蛋白レベルでは PDZ domain の C 端側から約 1/3 に相当していた。

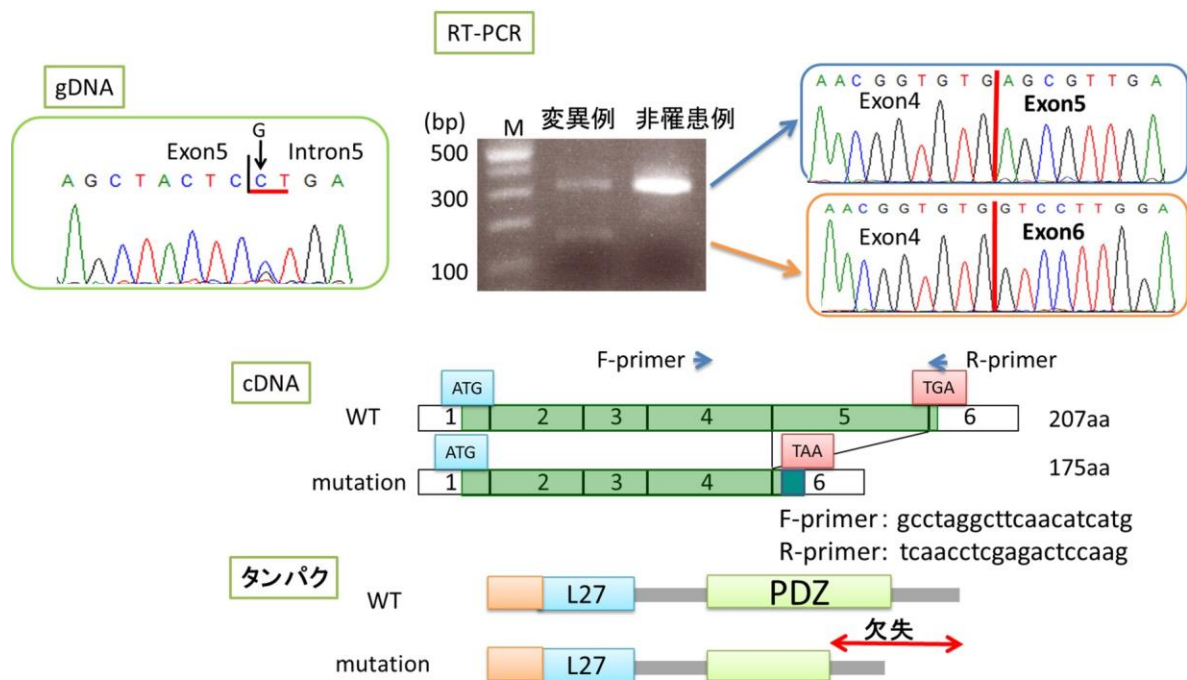


図 10. *LIN7B* の変異例 (c. 602+1G>C)

gDNA では、Exon5 のドナーサイト GT が CT に変異していた。

cDNA の RT-PCR では非罹患例では、300bp 台に濃いバンドが 1 本検出されたが、変異例では、300bp 台と 150bp 台に 2 本のバンドが薄く検出された。シーケンスでは、変異例は Exon5 が飛ばされ、Exon4 と Exon6 が連結し、Exon6 が frame shift していた。蛋白レベルでは Exon 5 の欠失部位は PDZ domain の C 端側約 1/3 に相当していた。

#### d) LIN7A および LIN7B 蛋白の機能解析

##### ①マウス胎仔の発達過程における脳での Lin7 蛋白の発現量の変化

Lin7A は胎生 13.5 日から発現が見られ、その後徐々に増加し、生後 15 日から劇的に増加した。Lin7B/C は胎生 13.5 日から発現し、その後徐々に増加した (図 11A)。

##### ②成ラットにおけるシナプスでの Lin7 の局在

Lin7A はシナプス前膜のマーカである synaptophysin が多く含まれる P2、Synaptosome の分画に比較的多く発現していた (図 11B)。Lin7B はシナプス

後膜のマーカである PSD95 が多く含まれる PSD-I、PSD-II の分画に比較的多く発現していた。

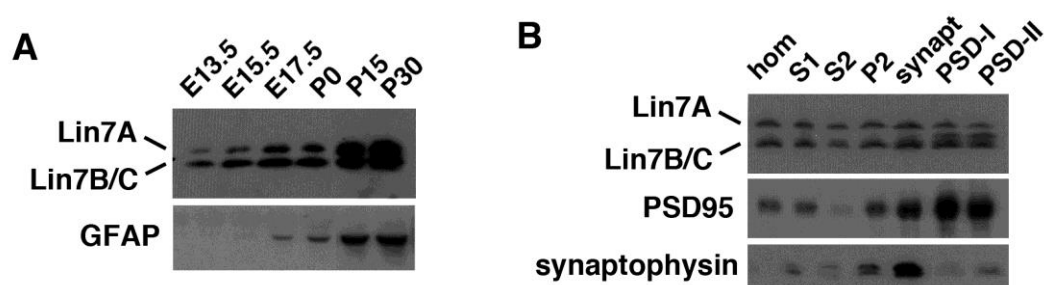


図 11. A. マウス胎仔の発達過程における脳での Lin7 蛋白の経時的発現変化

A. GFAP (glial fibrillary acidic protein) は大脳発生に伴ってアストロサイトが増加の指標。Lin7A、Lin7B/C とも E13.5 日より発現が見られ、その後増加した。

B. シナプスでの局在。PSD95 はシナプス後膜、synaptophysin はシナプス前膜のマーカ。Lin7A は P2、Synaptosome、Lin7B は PSD-I、PSD-II の分画に比較的多く発現していた。

### ③ *mLin7A* RNAi のノックダウンの確認

2 つのマウスの Lin7A に対する RNAi ベクター pSUPER-mLin7A#1、#2 は COS 細胞に導入した mLin7A をほぼノックダウンしたため (図 12A)、RNAi として用いた。次に COS 細胞に導入したヒトの hLin7A は、pSUPER-mLin7A#1、#2 にノックダウンされなかった (図 12B)。このため、hLin7A はエレクトロポレーション法で mLin7A をノックダウンした際の rescue に用いることとした。最後に、これらのベクターは mLin7B の発現をノックダウンしないことを確認した (図 12C)。

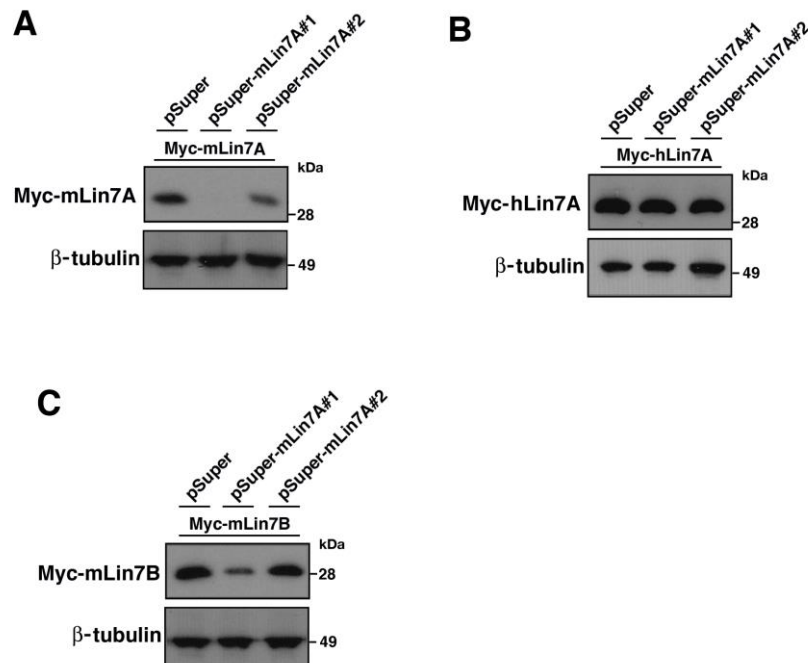


図 12. pSUPER-mLin7A#1、#2 のノックダウンの確認

Myc-mLin7A (A)、Myc-hLin7A (B)、Myc-mLin7B(C)をそれぞれ導入し、pSUPER、pSUPER-mLin7A#1、pSUPER-mLin7A#2 によるノックダウンの有無を抗 Myc 抗体で見た。β-tubulin は内因性のコントロールを示す。

A. pSUPER-mLin7A#1、#2 は mLin7A をノックダウンした。

B. pSUPER-mLin7A#1、#2 は hLin7A の発現をノックダウンしなかった。

C. pSUPER-mLin7A#1、#2 は mLin7B の発現のノックダウンしなかった。

#### ④Lin7A ノックダウンによる神経細胞の障害

##### ④-1. 大脳皮質における Lin7A の神経細胞の移動障害

子宮内胎児エレクトロポレーション法で *mLin7ARNAi* を胎生 14.5 日マウス脳に導入して、Lin7A の発現を抑制した結果、コントロール例では神経細胞が大脳皮質第 II~IV 層に約 9 割が局在して見られたのに対し、ノックダウン例では 2 割のみで、約 8 割が II~IV 層以下に見られた (図 13(b),(c))。次に、この *mLin7A* RNAi でノックダウンに対し、hLin7A を導入すると、神経細胞は II~IV 層に約 8 割が局在し、移動障害が改善した (図 13(d))。

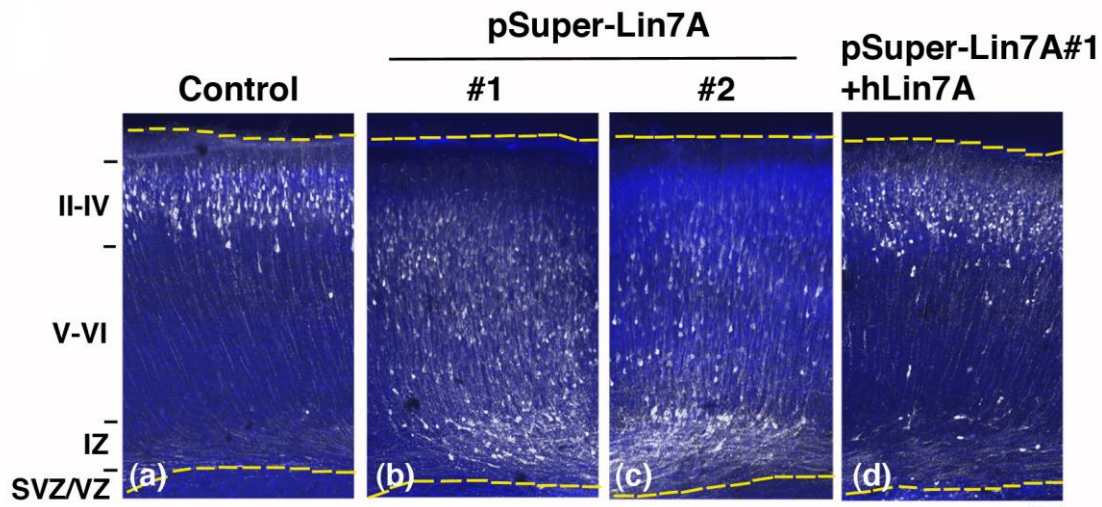


図 13. 大脳皮質における Lin7A の神経細胞の移動障害  
 大脳皮質の冠状断。移動神経細胞は anti-GFP (白)、核は DAPI (青)。  
 II-IV:大脳皮質 II-IV 層、V-VI:大脳皮質 V-VI 層、IZ: Intermediate zone、  
 SVZ:Subventricular zone、VZ:Ventricular zone。  
 pSuper-Lin7A#1,#2 では神経細胞の移動障害が見られた。pSuper-Lin7A#1  
 に hLin7A を導入すると障害は改善した。

#### ④-2. Lin7A 欠失における axon の伸長障害

次に、神経細胞の axon の伸長について調べるために、④-1. と同様に E14.5 に pSUPER-mLin7A#1 を用い Lin7A をノックダウンした神経細胞において脳梁からの対側への axon の伸長を P7 で観察した。ノックダウンした axon の対側半球への伸長は、コントロールと比べ半分に障害されていた (図 14A(b), 14B)。hLin7A の導入により、axon の伸長障害は改善がみられた (図 14A(c), 14B)。

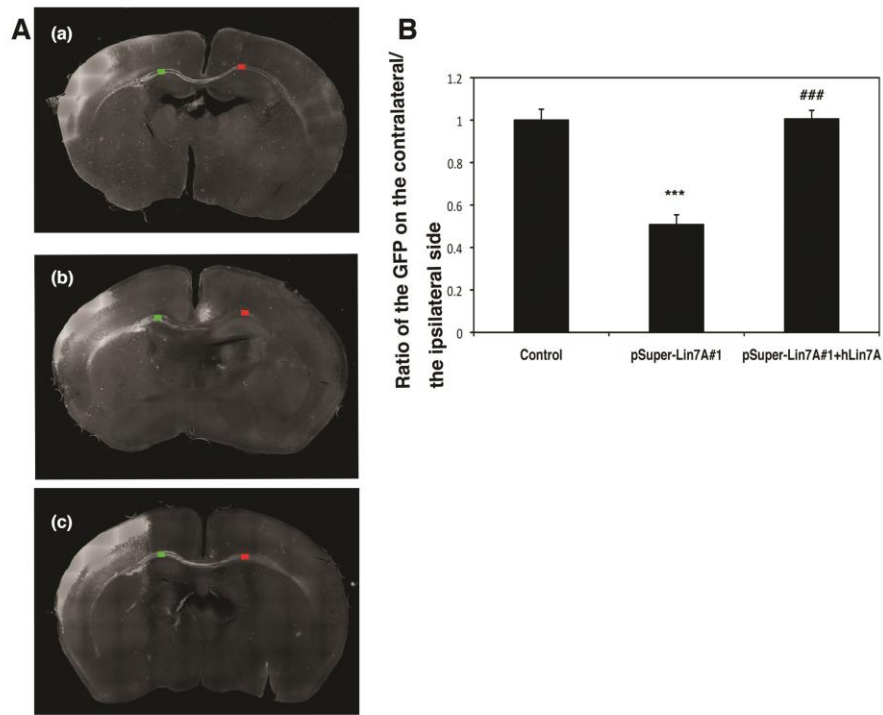


図 14. Lin7A 欠失による axon の伸長障害

A. P7 での冠状断。下の Bar は 1mm を示す。(b) pSUPER-Lin7A では脳梁を出た後 axon の density は薄く、伸長障害がみられた。(c) hLin7A を導入すると axon の伸長障害は改善した。

B. 同側の axon (A の緑) と対側の axon (A の赤) の比を示す。pSUPER-Lin7A では、約 0.5 を示した。hLin7A を導入したものではほぼ 1 に改善した。

#### ⑤ *mLin7B* RNAi のノックダウンの確認

2 つのマウスの *Lin7B* に対する RNAi ベクター pSUPER-*mLin7B*#1、#2 は、COS 細胞の *mLin7B* の発現をほぼノックダウンしたため (図 15A)、RNAi として用いることとした。次にヒトの *hLin7B* は pSUPER-*mLin7B*#1、#2 にノックダウンされなかった (図 15B)。このため、*hLin7B* はエレクトロポレーション法で *mLin7B* をノックダウンした際の rescue に用いることとした。最後にこれらのベクターは *mLin7A* の発現をノックダウンしないことを確認した (図 15C)。

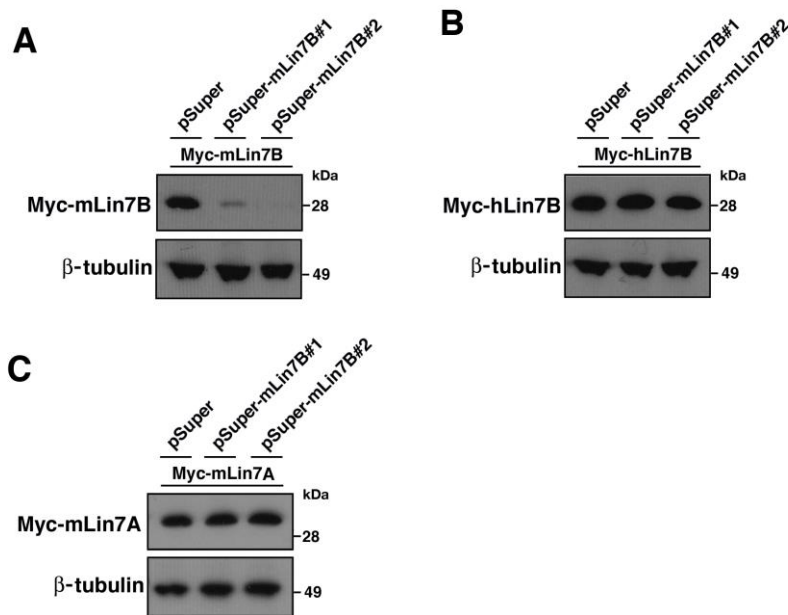


図 15. pSUPER-mLin7B#1、 #2 のノックダウンの確認

A. Myc-mLin7B、B. Myc-hLin7B、C. Myc-mLin7A をそれぞれ導入し、pSUPER、pSUPER-mLin7A#1、pSUPER-mLin7A#2 によるノックダウンの有無を抗 Myc 抗体で見た。β-tubulin は内因性のコントロールを示す。

- A. pSUPER-mLin7B#1、#2 は mLin7B をノックダウンした。
- B. pSUPER-mLin7B#1、#2 は hLin7B の発現をノックダウンしなかった。
- C. pSUPER-mLin7B#1、#2 は mLin7A の発現のノックダウンしなかった。

#### ⑥ 大脳皮質における Lin7B の神経細胞の移動障害

Lin7B についても同様に、子宮内胎児エレクトロポレーション法で *mLin7B* RNAi 導入し、胎生 14.5 日に Lin7B の発現を抑制した結果、コントロール例では神経細胞が大脳皮質第 II~IV 層に約 9 割が局在して見られたのに対し、ノックダウン例では神経細胞が II~IV 層以下に 4 割が見られた (図 16)。次に、この *mLin7B* RNAi でのノックダウンに対し、hLin7B を導入すると、神経細胞は II~IV 層に約 8 割が局在し、移動障害が改善した (図 16)。

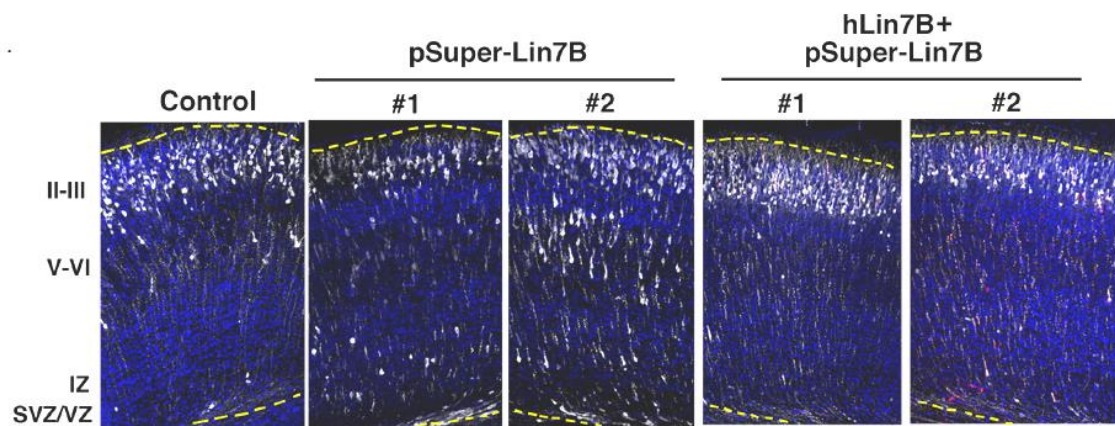


図 16. 大脳皮質における Lin7B の神経細胞の移動障害  
大脳皮質の冠状断。移動神経細胞は anti-GFP (白)、核は DAPI (青)。  
II-IV:大脳皮質 II-IV 層、V-VI:大脳皮質 V-VI 層、IZ:Intermediate zone、  
SVZ: Subventricular zone、VZ: Ventricular zone。  
pSUPER-Lin7B#1,#2 は神経細胞の移動障害が見られたが hLin7B を導入  
すると移動障害は改善した。

### 3-3. *RPS6KA3* 重複家系の解析

#### a) 軽度 ID 家系における *RPS6KA3* 重複の検出

軽度 ID の 1 家系 (図 17) において、境界知能から軽度 ID の男児 3 名、母親を含む女性同胞の計 3 名に ChrXp22.12 に約 584 Kb の重複を検出した (図 18A, B)。重複部位に *RPS6KA3* が含まれていた。

#### 【家族の病歴】

(IV-6) 発端者。15 歳の男子で顔貌、骨格の異常なし。軽度 ID あり、6 歳時の知能指数 (IQ) 63 (田中ビネー式知能検査)。多動、衝動性など ADHD あり。13 歳時に歩行中意識消失し転倒する複雑部分発作を発症。

(IV-7) 13 歳男子。軽度 ID あり、10 歳時の IQ52 (Wechsler Intelligence Scale for Children-Third Edition, WISC-III)。ADHD なし。11 歳時から複雑部分発作を

発症。

(IV-8) 11 歳女子。ID なし。ADHD なし。

(IV-9) 6 歳女子。ID なし。ADHD なし。保育園時に集団不適応、こだわりあり。DSM-IV で PDD (Pervasive developmental disorder) と診断された。

(IV-10) 4 歳男子。発達は境界域で、多動、衝動性など ADHD あり。

(III-4) 母。20 歳台にうつ病と診断されているが詳細不明。知的障害、学習障害の既往はなし。ADHD なし。

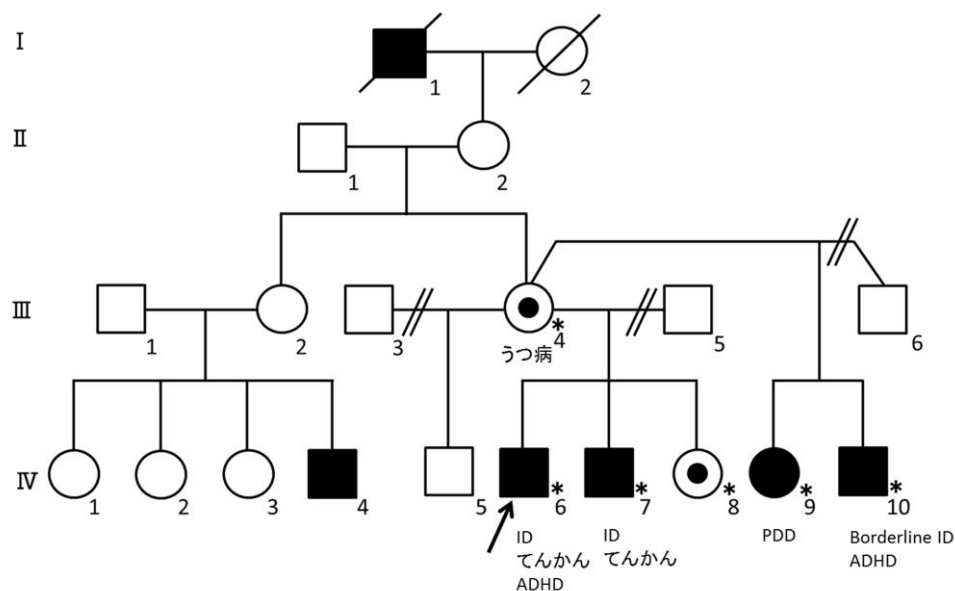


図 17. ID の家系図

矢印は発端者、■は罹患者、男性は ID、女性は Pervasive developmental disorder (PDD) を示した。

## b) RPS6KA3 の発現

RPS6KA3 の発現量と症状との関連性の有無を確認するために、Western Blot 法による発端者 (IV-6)、母 (III-4)、弟 (IV-7)、妹 (IV-8)、弟 (IV-10) について発現解析を行った。非罹患者コントロール (C1, C2, C3) の RPS6KA3 を Tubulin で補正した値の平均を 1 とした場合の fold change では、発端者

(IV-6):2.12-fold、母 (III-4):1.77-fold、弟 (IV-7):1.91-fold、妹 (IV-8):2.14-fold  
弟 (IV-10):1.53-fold であった (図 18D)。

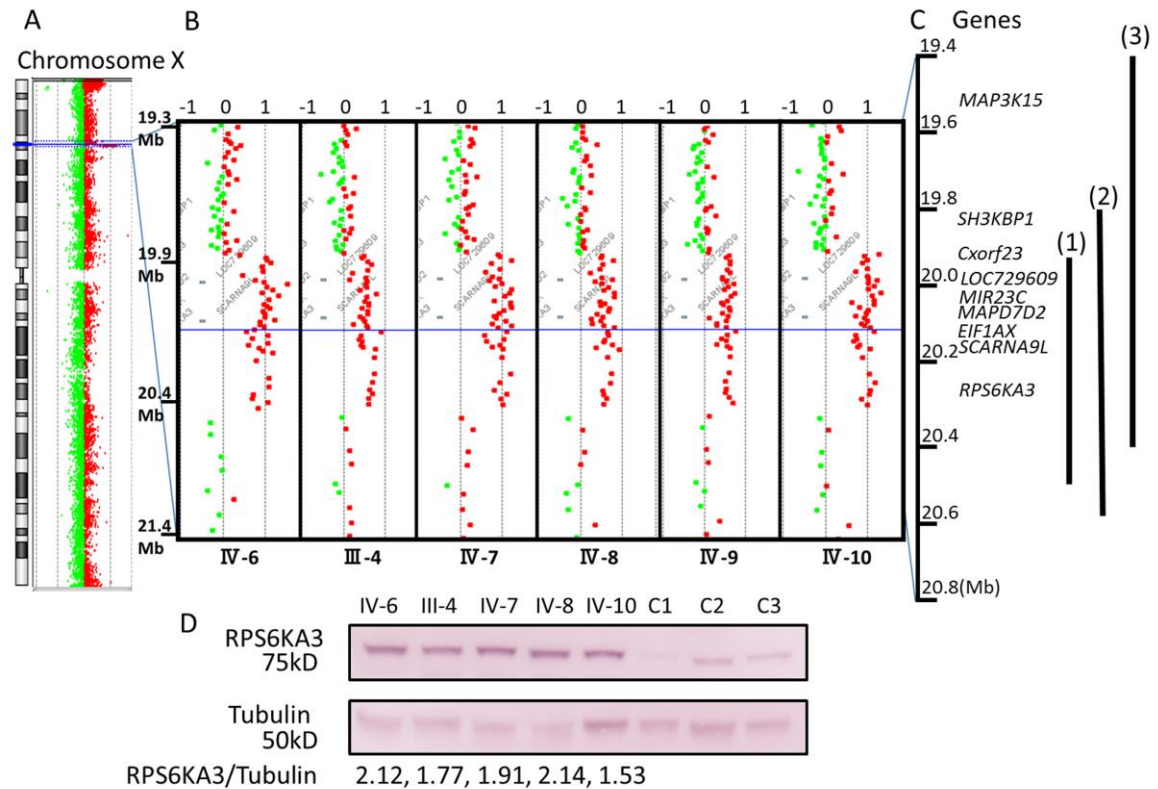


図 18. aCGH および RPS6KA3 の Western blot 解析の結果

A. chromosomeX の全体像。Xp22.12 (19.92-20.50 Mb) の重複を示した。B. 重複部位の拡大像。縦軸は Xp のテロメアからの距離 (Mb) を示し、横軸はコピーナンバーの fold change を示す。-1 は 1 つのアレルの欠失を示し、+1 は 1 つのアレルの重複を示す。C. これまでの Xp22.12 の重複例の報告と存在遺伝子。(1)は本例、(2) Madrigal らの報告、(3) は Tejada らの報告を示す。D. リンパ芽球を用いた Western blot の結果。上段は RPS6KA3 蛋白、下段は Tubulin 蛋白の発現量を示す。RPS6KA3/Tubulin の fold change は、コントロール比で IV-6 は 2.12、III-4 は 1.77、IV-7 は 1.91、IV-8 は 2.14、IV-10 は 1.53 であった。

### c) X-chromosome inactivation (XCI) patterns

母親の XCI pattern は (41:59)、妹 (IV-8)の XCI pattern は (67:33)であった。

PDD の妹 (IV-9) は HUMARA アレルがホモであったため、不活化率に対する

得情報がられなかった。母親のアレルは 198 bp と 207 bp であり、発端者 (IV-6)、弟 (IV-7)、2 人の妹 (IV-8, IV-9) は 198 bp のアレルを持っていたが、弟 (IV-10) は 207 bp のアレルを持っていた (図 19)。

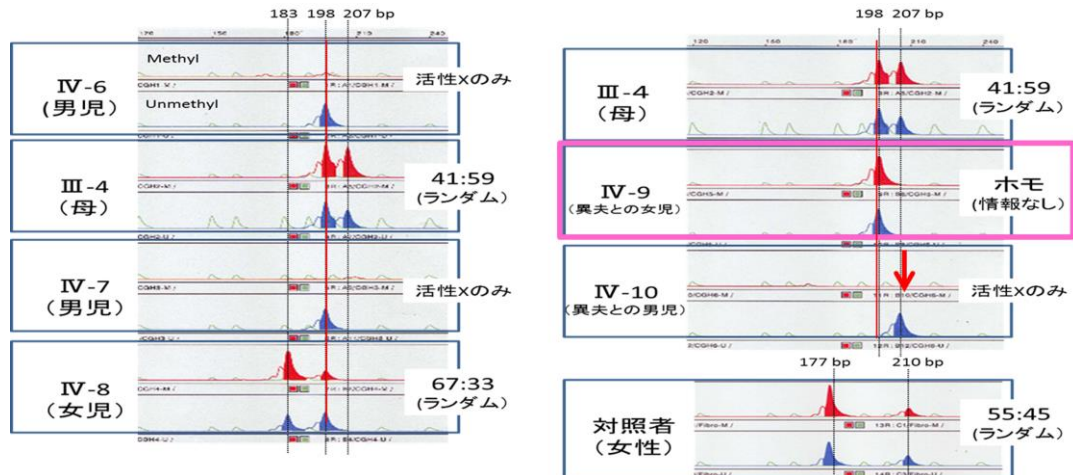


図 19. X-chromosome inactivation (XCI) patterns

上段 (赤) は不活化 (Methyl 化) X 染色体を示す、下段 (青) は活性化 (Unmethyl 化) X 染色体のパターンを示す。一番上の段の数値は HUMARA アレルの値 (bp) を示す。

III-4, IV-6, IV-7, IV-8, IV-9 は全て 198bp のアレルを持っている。IV-9 は 198bp をホモで持っていた。IV-10 は 207bp のアレルを持っていた。

## 4. 考察

シナプス関連遺伝子、足場蛋白、およびシグナル伝達にかかわる遺伝子が ASD および ID の原因遺伝子、候補遺伝子として次々と同定されている。

本研究において、ASD 16/49 例 (32.7 %)、ID 16/40 例 (40 %) と、高頻度に CNV が検出された。このうち病因と考えられたものは ASD 例で 4 例 (8.2%)、ID で 9 例 (22.5%) あり、ASD、ID の遺伝学的背景として、CNV が重要な位置を占めることが確認された[8, 24, 35, 36]。重複例が多く検出された。一般に、遺伝子欠失より重複は軽度な症状になることも言われており[37]、発達障害の病因として、重複にも注目する必要がある。また、正常ヒトゲノムの約 5%が benign CNV を有する[38, 39]ため、両親とのトリオ解析が必要である。両親検体が得られなかった症例や父由来の CNV が検出された症例は病因の確定が困難であった。ASD では、症状がスペクトラムであること、多因子遺伝、浸透率の問題等、複雑な遺伝学的機序が関与している。家系内で非罹患者に変異が検出された報告[13, 40]もあり、非罹患の家族が変異を共有していたとしても、候補遺伝子として機能を詳細に検討する必要がある。

本研究では、ID 例で *LIN7A* の欠失例、*RPS6KA3* の重複例、また、ASD 例で *SHANK3* の欠失例、*LIN7B* の重複例及び変異例 (c. 602+1G>C) を検出した。これらの遺伝子は、シナプス機能との関連で、病因として関心が持たれ、さらに解析を実施した。特に、シナプスで機能する蛋白と結合して安定化させ、あるいは機能調節をしている、足場蛋白と言われる分子に属する、*SHANK3*、*LIN7A* と *LIN7B* に注目した。また、*RPS6KA3* は cAMP response element-binding protein (*CREB*) をリン酸化する遺伝子であるが ASD のエクソーム解析でも変異例が報告されており、ASD と ID の原因遺伝子には overlap が見られる。

SHANK3 は、代表的な足場蛋白の一つであり、Neuroline、mGluR、NMDAR や AMPAR 等とシナプスで蛋白結合しており遺伝子発現量に敏感で欠失、重複、変異において ASD の病因となる[19]。欠失領域に *SHANK3* を含む 22q13.3 症候群では高率に発達の遅れ、言葉の遅れが合併する[41]。当例においても ASD および中等度の ID を認めた。*SHANK3* の変異の種類と症状の相関に関しても興味を持たれ、さらに症例の蓄積が重要である。

#### 足場蛋白 (Scaffold protein) : LIN7A, LIN7B

LIN7A、LIN7B の発現解析と RNAi を用いたエレクトロポレーション法による解析では、シナプスでの局在および発達期における発現と大脳皮質での神経細胞の移動障害、axon 伸長障害を認めた。

大脳皮質の発達において、興奮性錐体細胞の移動はいくつかのステップに分けられる。Ventricular zone (VZ) で発生した後、これらの神経は intermediate zone の低い位置で多極性形態を示し、神経極性や、axon 形成などのいくつかの神経分化し、双極性（移動）神経を経て、最終的に marginal zone で移動を完了する[42-44]。

Lin7 は神経細胞において cadherin や  $\beta$ -catenin と複合体を形成し、cadherin-mediated 細胞接着に重要な役割を果たしている[45]。Cadherins は細胞接着の superfamily で、神経芽細胞移動、axon の誘導、神経経路の形成、シナプス形成に主要な役割をなしている[46-48]。Zhang ら[49]は、N-cadherin は大脳発達の分化を促進する Wnt、AKT-mediated  $\beta$ -catenin signaling を調節することを報告している。 $\beta$ -catenin は細胞と細胞の並置が必要で、Lin7A 欠損細胞では細胞接着や極性の障害のために移動障害をきたした可能性がある（図 20）。

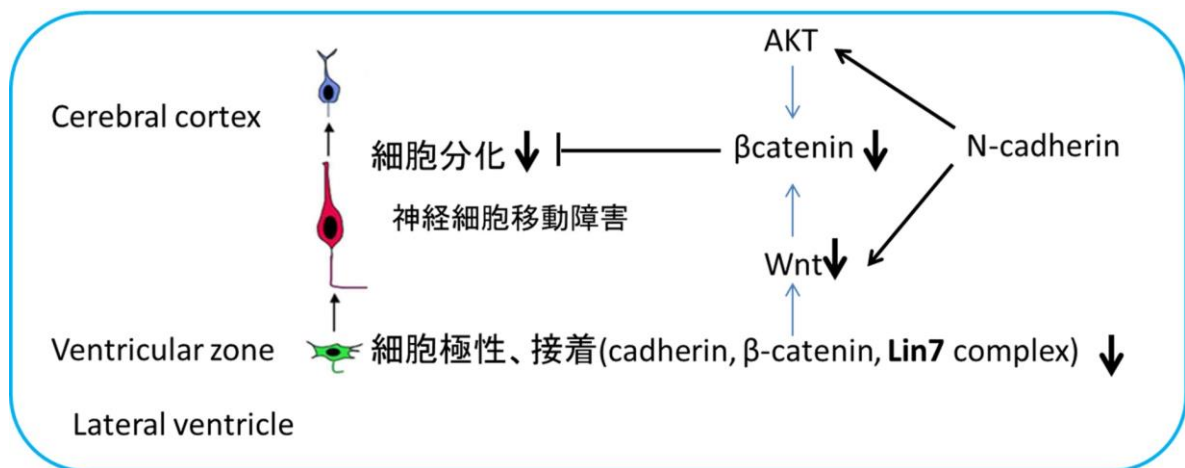


図 20. 神経細胞移動障害の仮説

Lin7A は、シナプス前膜に発現が多く、CASK と相互作用し、神経伝達物質の放出の調節をしていると考えられる (図 21) [50-52]。CASK は脳発達、シナプス前膜機能に重要な役割を果たしている。

また、Lin7A-Cask-Mint1 (LIN10) 複合体は、樹状突起の形態維持、シナプス後膜の ion channel の調節、*RELN* (Reelin)、*GRIN2B* などの皮質発達に関わる遺伝子の発現の調節に重要である[52, 53]。CASK は ID、てんかん、橋小脳低形成の責任遺伝子である[51, 52]。しかし、CASK 変異例の脳梁サイズは正常である[53, 54]。本研究において Lin7A 欠損では対側の半球への axon 伸長が妨げられた。脳梁は約 200 億の axon からなり、大脳皮質 II, III, V の神経細胞由来である[55, 56]。そのため、神経細胞の移動障害および axon の伸長障害が原因で脳梁低形成が起こる可能性が考えられ、12q21 欠失例で見られた脳梁低形成は Lin7A 欠損に起因する症状可能性が考えられた。なお、LIN7 はシナプス後膜において GRIN2B とともに神経伝達物質の補充調節をしていると考えられている (図 21)[34]。*GRIN2B* は *GRIN2A* と共に脳で興奮性の神経伝達物質を調整している NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptor をコードしている。

NMDA は 2 つの NR1 サブユニットと 2 つの NR2 サブユニットからなり、各々  $\text{Ca}^{2+}$  透過性陽イオンチャネルを構成している。このサブユニットである NR2A を *GRIN2A* が、NR2B を *GRIN2B* がコードしている。*GRIN2B* の変異が中等度の ID、行動異常を示し、*GRIN2A* の変異では ID、てんかんなどの異常が報告されている[57]。詳細な機序は不明であるが、NR2 の変異が神経におけるイオンの流入や神経伝達に影響を与えることが考えられている[57]。我々のシナプスでの発現量の解析では LIN7B がシナプス後膜に多かったことから、後膜における LIN7B の重複例および変異例により GRIN2B を介する神経伝達物質の調節障害の可能性が考えられる。今後更に解析する予定である。

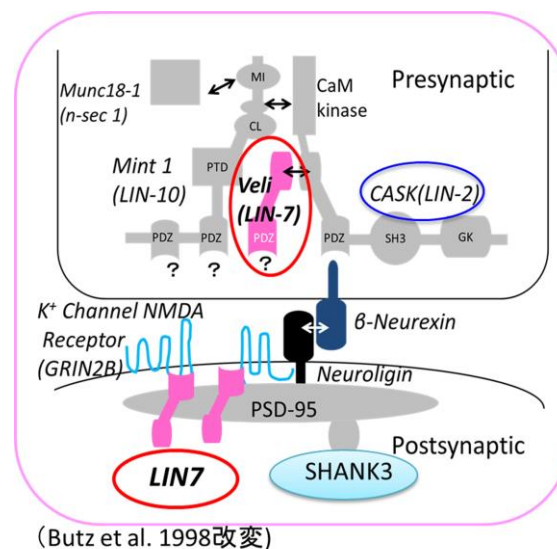


図 21. シナプスでの LIN7 と CASK、GRIN2B (NMDAR)

また、*in vivo* での phenotype については、*LIN7A*、*LIN7B* の double knock down したマウス[58]において、生存には問題がなく、海馬での興奮性は正常であった、との報告がある。しかし、行動解析等はなされていない。一方、*SHANK1*、*SHANK2* の変異マウス[20]において海馬の興奮性は異常がないが、社会性の低下、繰り返し行動の増加を認めた、との報告がある。LIN7 についても knock down や変異による行動や高次機能への影響について、解析が必要である。

### シグナル伝達系: *RPS6KA3*

軽度 ID の一家系において、Xp22.12 に検出した約 586 kb の重複には、7 遺伝子が含まれていた。LOC729609 (*LOC729609*)、microRNA 23c (*MIR23c*)、small Cajal body-specific RNA 9-like (*SCARNA9L*) は miscRNA として働き、eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked (*EIF1AX*) は転写開始因子で、chromosome X open reading frame 23 (*CXorf23*) and MAP7 domain containing 2 (*MAP7D2*) は機能不明である。*RPS6KA3* は cAMP response element-binding protein (*CREB*) をリン酸化する遺伝子で、機能喪失により Coffin-Lowry syndrome (CLS)、あるいは非症候性の骨格異常を伴うまたは伴わない X-linked ID の原因遺伝子となっている[59]。CLS は ID と骨格異常などの特徴を有し、*RPS6KA3* の活性により症状の重症度が異なる[60]。*RPS6KA3* 変異が関与する CLS 群において *RPS6KA3*-CREB 系に関わる PKC (protein kinase C) のアゴニスト刺激により CREB の上昇率が IQ と関連したとの報告があり[61]、CREB は知能と深く関わる遺伝子とされている。また、*RPS6KA3* 遺伝子の重複例はこれまで 2 家系報告されている[35, 62]。他の遺伝子で、重複により ID を示す例としては、*MECP2* (*methyl-CpG-binding protein 2*)や *GDI1* (GDP dissociation inhibitor 1)などが報告されており[36, 63]、重複コピー数および発現量が多いほど臨床症状が重く、過剰発現が神経毒性になっている可能性が示唆されている。CREB binding protein (CBP) の変異、欠失で発症する Rubinstein-Taybi Syndrome (RTS) では、ID、低身長、母指短縮等を呈し[64]、同遺伝子の重複でも軽度の ID、低身長等の報告があり[65]、CREB の発現は厳密にコントロールされていると考えられる。本家系では *RPS6KA3* 重複による発現増加が CREB 関連分子の量的変化をもたらし軽度から境界の知的障害を示したと考えられた。

本家系において、X 染色体の不活化パターンの違いによる重複遺伝子の発現の変化がないかを確認するために、HUMARA のリピート多型を指標とした X 染色体各アレルの活性化の比率を解析した。XCI パターンでは、母親、発端者 (IV-6)、弟 (IV-7)、2 人の妹 (IV-8, IV-9) は 198 bp のアレルを持っていたことから、このアレルが重複のアレルと考えられた。女性で両アレルの発現は同等で、skewed X activation のパターンとはなっていなかった。IV-9 は 198bp アレルをホモで持っており判断ができなかった。また、弟 (IV-10) は 207 bp のアレルを持っていたにもかかわらず、他の家族と同様に ChrXp22.12 の重複を有していた。卵母細胞において X 染色体では約 10%において組み換え (recombination) がおこるとの報告があり[66]、この 2 例では、ChrXp22.12 の約 584 Kb の重複部位と、HUMARA の部位の間において組み換えが生じたと考えられた。

ID以外の症状の比較では本家系のIV-6、IV-10でADHD、IV-6、IV-7で局在関連てんかんを示した。TajadaらもADHD例を報告している[62]。てんかんについてのこれまでの報告はないが、CLSで約5%にてんかんを合併する[60]。発症機序については、マウスの内因性*Bdnf* promoter IV のCREB-response elements (CREBm) の変異により皮質におけるシナプスの抑制が低下するとの報告があり[67]、CREBの低下による抑制の低下によって発症したのではないかと考えられる。また、IV-9はPDDを示し、母親 (III-4) でうつ病の既往があった。母親のうつ病については、Broad Autism Phenotypeの適応障害としての抑うつかどうかの確証は得られなかったが、母親 (III-4) のWestern blot解析でのRPS6KA3の発現は1.77と上昇していた。また、PDDを示したIV-9はXCIパターンがホモであったため情報が得られず、Western blot解析に十分量の検体が得られず解析ができなかった。しかし、前述のようにASDのエクソーム解析でも同

遺伝子の変異例が見られていること、および、CLSの女性キャリアでは約8.8%に精神病、統合失調症、うつ病などの神経症状の合併が報告されていることから[68]、*RPS6KA3*重複の症状の一つである可能性が示唆された。

今後更なる*LIN7A*、*LIN7B*、*RPS6KA3*の分子基盤、発症機序を解明することでASD、IDの病態理解が進んでいくものと思われる。

## 5. まとめ

ASD49例およびID40例について aCGH 解析を行い、ID 例で *LIN7A* の欠失、*RPS6KA3* の重複、ASD 例で *SHANK3* の欠失、*LIN7B* の重複および変異例 (c. 602+1G>C) を検出した。変異例 (c. 602+1G>C) では、PDZ domain の約 1/3 の欠失が見られ、PDZ domain を介した GRIN2B などの PDZ 結合蛋白との結合が障害されている可能性が示唆された。

マウス胎児の発達過程における Lin7A、Lin7B の発現および、成ラットのシナプスにおける局在をみた。胎生 14.5 日に Lin7A、Lin7B をノックダウンした神経細胞は移動障害を認め、同様に Lin7A をノックダウンした神経細胞は、Axon の伸長障害、脳梁の低形成が見られ、*LIN7A* は ID、脳梁低形成の責任遺伝子と考えられた。

*RPS6KA3* の重複家系では、境界～軽度の ID、他に ADHD、てんかん、女性キャリアにうつ病、PDD を認めた。*RPS6KA3* の発現がコントロールと比べ 1.53～2.14 と上昇を認め、*RPS6KA3* 重複が本家系の ID、行動異常の原因と考えられた。

この研究により足場蛋白の重要性が再確認され、ASD、ID の病態の一端が明らかになった。

## 6. 参考文献

- [1] Idring S, Rai D, Dal H, Dalman C, Sturm H, Zander E, Lee BK, Serlachius E, Magnusson C. Autism spectrum disorders in the Stockholm Youth Cohort: design, prevalence and validity. *PLoS One*. 2012;7:e41280.
- [2] Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ*. 2012;61:1-19.
- [3] Kim YS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EC, Cheon KA, Kim SJ, Kim YK, Lee H, Song DH, Grinker RR. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry*. 2011;168:904-12.
- [4] Abrahams BS, Geschwind DH. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet*. 2008;9:341-55.
- [5] Kamio Y, Inada N, Moriwaki A, Kuroda M, Koyama T, Tsujii H, Kawakubo Y, Kuwabara H, Tsuchiya KJ, Uno Y, Constantino JN. Quantitative autistic traits ascertained in a national survey of 22 529 Japanese schoolchildren. *Acta Psychiatr Scand*. 2013;128:45-53.
- [6] Freitag CM. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry*. 2007;12:2-22.
- [7] Johnson CP, Myers SM. Identification and evaluation of children with autism spectrum disorders. *Pediatrics*. 2007;120:1183-215.
- [8] Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B, Yoon S, Krasnitz A, Kendall J, Leotta A, Pai D, Zhang R, Lee YH, Hicks J, Spence SJ, Lee AT, Puura K, Lehtimäki T, Ledbetter D, Gregersen PK, Bregman J, Sutcliffe JS, Jobanputra V, Chung W, Warburton D, King MC, Skuse D, Geschwind DH, Gilliam TC, Ye K, Wigler M. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*. 2007;316:445-9.
- [9] Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J, Bacchelli E, Bader GD, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bolte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Bryson SE, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chung BH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Cytrynbaum C, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green A, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizzi R, Kim C, Klauck SM, Klevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougle CJ,

McGrath J, McMahon WM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, Pilorge M, Piven J, Ponting CP, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Sequeira AF, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stein O, Sykes N, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapduram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Webber C, Weksberg R, Wing K, Wittemeyer K, Wood S, Wu J, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Devlin B, Ennis S, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Hallmayer J, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI, Jr., Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Scherer SW, Sutcliffe JS, Betancur C. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010;466:368-72.

[10] Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res*. 2011;1380:42-77.

[11] Schaaf CP, Sabo A, Sakai Y, Crosby J, Muzny D, Hawes A, Lewis L, Akbar H, Varghese R, Boerwinkle E, Gibbs RA, Zoghbi HY. Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet*. 2011;20:3366-75.

[12] Fujita E, Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. Cadm1-expressing synapses on Purkinje cell dendrites are involved in mouse ultrasonic vocalization activity. *PLoS One*. 2012;7:e30151.

[13] Berkel S, Marshall CR, Weiss B, Howe J, Roeth R, Moog U, Endris V, Roberts W, Szatmari P, Pinto D, Bonin M, Riess A, Engels H, Sprengel R, Scherer SW, Rappold GA. Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat Genet*. 2010;42:489-91.

[14] Jamain S, Quach H, Betancur C, Rastam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*. 2003;34:27-9.

[15] Yan J, Noltner K, Feng J, Li W, Schroer R, Skinner C, Zeng W, Schwartz CE, Sommer SS. Neurexin 1alpha structural variants associated with autism. *Neurosci Lett*. 2008;438:368-70.

[16] Zhiling 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*. 2008;377:926-9.

- [17] Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2007;81:1289-97.
- [18] Boccuto L, Lauri M, Sarasua SM, Skinner CD, Buccella D, Dwivedi A, Orteschi D, Collins JS, Zollino M, Visconti P, Dupont B, Tiziano D, Schroer RJ, Neri G, Stevenson RE, Gurrieri F, Schwartz CE. Prevalence of SHANK3 variants in patients with different subtypes of autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:310-6.
- [19] Toro R, Konyukh M, Delorme R, Leblond C, Chaste P, Fauchereau F, Coleman M, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet.* 2010;26:363-72.
- [20] Jiang YH, Ehlers MD. Modeling autism by SHANK gene mutations in mice. *Neuron.* 2013;78:8-27.
- [21] Peca J, Feng G. Cellular and synaptic network defects in autism. *Curr Opin Neurobiol.* 2012;22:866-72.
- [22] O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, Levy R, Ko A, Lee C, Smith JD, Turner EH, Stanaway IB, Vernot B, Malig M, Baker C, Reilly B, Akey JM, Borenstein E, Rieder MJ, Nickerson DA, Bernier R, Shendure J, Eichler EE. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature.* 2012;485:246-50.
- [23] Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, DiLullo NM, Parikshak NN, Stein JL, Walker ME, Ober GT, Teran NA, Song Y, El-Fishawy P, Murtha RC, Choi M, Overton JD, Bjornson RD, Carriero NJ, Meyer KA, Bilguvar K, Mane SM, Sestan N, Lifton RP, Gunel M, Roeder K, Geschwind DH, Devlin B, State MW. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature.* 2012;485:237-41.
- [24] Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V, Polak P, Yoon S, Maguire J, Crawford EL, Campbell NG, Geller ET, Valladares O, Schafer C, Liu H, Zhao T, Cai G, Lihm J, Dannenfelser R, Jabado O, Peralta Z, Nagaswamy U, Muzny D, Reid JG, Newsham I, Wu Y, Lewis L, Han Y, Voight BF, Lim E, Rossin E, Kirby A, Flannick J, Fromer M, Shakir K, Fennell T, Garimella K, Banks E, Poplin R, Gabriel S, DePristo M, Wimbish JR, Boone BE, Levy SE, Betancur C, Sunyaev S, Boerwinkle E, Buxbaum JD, Cook EH, Jr., Devlin B, Gibbs RA, Roeder K, Schellenberg GD, Sutcliffe JS, Daly MJ. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature.* 2012;485:242-5.

- [25] Utine GE, Kiper PÖ, Alanay Y, Haliloğlu G, Aktaş D, Boduroğlu K, Tunçbilek E, Alikasıfoğlu M. Searching for Copy Number Changes in Nonsyndromic X-Linked Intellectual Disability. *Molecular Syndromology*. 2011.
- [26] van Bokhoven H, Kramer JM. Disruption of the epigenetic code: an emerging mechanism in mental retardation. *Neurobiol Dis*. 2010;39:3-12.
- [27] Bertrand J, Mars A, Boyle C, Bove F, Yeargin-Allsopp M, Decoufle P. Prevalence of autism in a United States population: the Brick Township, New Jersey, investigation. *Pediatrics*. 2001;108:1155-61.
- [28] Ehninger D, Han S, Shilyansky C, Zhou Y, Li W, Kwiatkowski DJ, Ramesh V, Silva AJ. Reversal of learning deficits in a *Tsc2*<sup>+/-</sup> mouse model of tuberous sclerosis. *Nat Med*. 2008;14:843-8.
- [29] Jozwiak S, Kotulska K, Domanska-Pakiela D, Lojszczyk B, Syczewska M, Chmielewski D, Dunin-Wasowicz D, Kmiec T, Szymkiewicz-Dangel J, Kornacka M, Kawalec W, Kuczynski D, Borkowska J, Tomaszek K, Jurkiewicz E, Respondek-Liberska M. Antiepileptic treatment before the onset of seizures reduces epilepsy severity and risk of mental retardation in infants with tuberous sclerosis complex. *Eur J Paediatr Neurol*. 2011;15:424-31.
- [30] Sudo K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Asano T, Nagata K. Identification of a cell polarity-related protein, Lin-7B, as a binding partner for a Rho effector, Rhotekin, and their possible interaction in neurons. *Neurosci Res*. 2006;56:347-55.
- [31] Zeniou M, Pannetier S, Fryns JP, Hanauer A. Unusual splice-site mutations in the RSK2 gene and suggestion of genetic heterogeneity in Coffin-Lowry syndrome. *Am J Hum Genet*. 2002;70:1421-33.
- [32] Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, Kojima M, Wakui K, Shimadzu M, Fukushima Y. A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet*. 1999;104:49-55.
- [33] Yang MS, Gill M. A review of gene linkage, association and expression studies in autism and an assessment of convergent evidence. *Int J Dev Neurosci*. 2007;25:69-85.
- [34] Jo K, Derin R, Li M, Bredt DS. Characterization of MALS/Velis-1, -2, and -3: a family of mammalian LIN-7 homologs enriched at brain synapses in association with the postsynaptic density-95/NMDA receptor postsynaptic complex. *J Neurosci*. 1999;19:4189-99.
- [35] Madrigal I, Rodriguez-Revenga L, Armengol L, Gonzalez E, Rodriguez B, Badenas C, Sanchez A, Martinez F, Guitart M, Fernandez I, Arranz JA, Tejada M, Perez-Jurado LA, Estivill X, Mila M. X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics*. 2007;8:443.

- [36] Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SG, Vermeesch JR, Devriendt K, Fryns JP, Marynen P. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum Mutat.* 2007;28:1034-42.
- [37] Lee JA, Lupski JR. Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron.* 2006;52:103-21.
- [38] McCarroll SA, Kuruvilla FG, Korn JM, Cawley S, Nemesh J, Wysoker A, Shapero MH, de Bakker PI, Maller JB, Kirby A, Elliott AL, Parkin M, Hubbell E, Webster T, Mei R, Veitch J, Collins PJ, Handsaker R, Lincoln S, Nizzari M, Blume J, Jones KW, Rava R, Daly MJ, Gabriel SB, Altshuler D. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat Genet.* 2008;40:1166-74.
- [39] Bailey JA, Gu Z, Clark RA, Reinert K, Samonte RV, Schwartz S, Adams MD, Myers EW, Li PW, Eichler EE. Recent segmental duplications in the human genome. *Science.* 2002;297:1003-7.
- [40] Fujita-Jimbo E, Yu ZL, Li H, Yamagata T, Mori M, Momoi T, Momoi MY. Mutation in Parkinson disease-associated, G-protein-coupled receptor 37 (GPR37/PaelR) is related to autism spectrum disorder. *PLoS One.* 2012;7:e51155.
- [41] Dhar SU, del Gaudio D, German JR, Peters SU, Ou Z, Bader PI, Berg JS, Blazo M, Brown CW, Graham BH, Grebe TA, Lalani S, Irons M, Sparagana S, Williams M, Phillips JA, 3rd, Beaudet AL, Stankiewicz P, Patel A, Cheung SW, Sahoo T. 22q13.3 deletion syndrome: clinical and molecular analysis using array CGH. *Am J Med Genet A.* 2010;152A:573-81.
- [42] Nishimura YV, Sekine K, Chihama K, Nakajima K, Hoshino M, Nabeshima Y, Kawauchi T. Dissecting the factors involved in the locomotion mode of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Biol Chem.* 2010;285:5878-87.
- [43] Rakic P. A century of progress in corticoneurogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. *Cereb Cortex.* 2006;16 Suppl 1:i3-17.
- [44] Kawauchi T, Hoshino M. Molecular pathways regulating cytoskeletal organization and morphological changes in migrating neurons. *Dev Neurosci.* 2008;30:36-46.
- [45] Perego C, Vanoni C, Massari S, Longhi R, Pietrini G. Mammalian LIN-7 PDZ proteins associate with beta-catenin at the cell-cell junctions of epithelia and neurons. *EMBO J.* 2000;19:3978-89.
- [46] Inoue T, Tanaka T, Takeichi M, Chisaka O, Nakamura S, Osumi N. Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development. *Development.* 2001;128:561-9.
- [47] Matsunaga M, Hatta K, Nagafuchi A, Takeichi M. Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules. *Nature.* 1988;334:62-4.

- [48] Fannon AM, Colman DR. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron*. 1996;17:423-34.
- [49] Zhang J, Shemezis JR, McQuinn ER, Wang J, Sverdllov M, Chenn A. AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development. *Neural Dev*. 2013;8:7.
- [50] Zheng CY, Seabold GK, Horak M, Petralia RS. MAGUKs, synaptic development, and synaptic plasticity. *Neuroscientist*. 2011;17:493-512.
- [51] Hsueh YP. Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase and mental retardation. *Ann Neurol*. 2009;66:438-43.
- [52] Hsueh YP. The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function. *Curr Med Chem*. 2006;13:1915-27.
- [53] Moog U, Kutsche K, Kortum F, Chilian B, Bierhals T, Apeshiotis N, Balg S, Chassaing N, Coubes C, Das S, Engels H, Van Esch H, Grasshoff U, Heise M, Isidor B, Jarvis J, Koehler U, Martin T, Oehl-Jaschkowitz B, Ortibus E, Pilz DT, Prabhakar P, Rappold G, Rau I, Rettenberger G, Schluter G, Scott RH, Shoukier M, Wohlleber E, Zirn B, Dobyns WB, Uyanik G. Phenotypic spectrum associated with CASK loss-of-function mutations. *J Med Genet*. 2011;48:741-51.
- [54] Takanashi J, Arai H, Nabatame S, Hirai S, Hayashi S, Inazawa J, Okamoto N, Barkovich AJ. Neuroradiologic features of CASK mutations. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010;31:1619-22.
- [55] Zhou J, Wen Y, She L, Sui YN, Liu L, Richards LJ, Poo MM. Axon position within the corpus callosum determines contralateral cortical projection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E2714-23.
- [56] Wise SP. The laminar organization of certain afferent and efferent fiber systems in the rat somatosensory cortex. *Brain Res*. 1975;90:139-42.
- [57] Endele S, Rosenberger G, Geider K, Popp B, Tamer C, Stefanova I, Milh M, Kortum F, Fritsch A, Pientka FK, Hellenbroich Y, Kalscheuer VM, Kohlhase J, Moog U, Rappold G, Rauch A, Ropers HH, von Spiczak S, Tonnies H, Villeneuve N, Villard L, Zabel B, Zenker M, Laube B, Reis A, Wiczorek D, Van Maldergem L, Kutsche K. Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet*. 2010;42:1021-6.
- [58] Misawa H, Kawasaki Y, Mellor J, Sweeney N, Jo K, Nicoll RA, Brecht DS. Contrasting localizations of MAL/SLIN-7 PDZ proteins in brain and molecular compensation in knockout mice. *J Biol Chem*. 2001;276:9264-72.

- [59] Merienne K, Jacquot S, Pannetier S, Zeniou M, Bankier A, Gecz J, Mandel JL, Mulley J, Sassone-Corsi P, Hanauer A. A missense mutation in RPS6KA3 (RSK2) responsible for non-specific mental retardation. *Nat Genet.* 1999;22:13-4.
- [60] Pereira PM, Schneider A, Pannetier S, Heron D, Hanauer A. Coffin-Lowry syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2010;18:627-33.
- [61] Harum KH, Alemi L, Johnston MV. Cognitive impairment in Coffin-Lowry syndrome correlates with reduced RSK2 activation. *Neurology.* 2001;56:207-14.
- [62] Tejada MI, Martinez-Bouzas C, Garcia-Ribes A, Larrucea S, Acquadro F, Cigudosa JC, Belet S, Froyen G, Lopez-Ariztegui MA. A child with mild X-linked intellectual disability and a microduplication at Xp22.12 including RPS6KA3. *Pediatrics.* 2011;128:e1029-33.
- [63] Vandewalle J, Van Esch H, Govaerts K, Verbeeck J, Zweier C, Madrigal I, Mila M, Pijkels E, Fernandez I, Kohlhase J, Spaich C, Rauch A, Fryns JP, Marynen P, Froyen G. Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. *Am J Hum Genet.* 2009;85:809-22.
- [64] Park E, Kim Y, Ryu H, Kowall NW, Lee J, Ryu H. Epigenetic Mechanisms of Rubinstein-Taybi Syndrome. *Neuromolecular Med.* 2014.
- [65] Mattina T, Palumbo O, Stallone R, Pulvirenti RM, Di Dio L, Pavone P, Carella M, Pavone L. Interstitial 16p13.3 microduplication: case report and critical review of genotype-phenotype correlation. *Eur J Med Genet.* 2012;55:747-52.
- [66] Brooks LD, Marks RW. The organization of genetic variation for recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1986;114:525-47.
- [67] Hong EJ, McCord AE, Greenberg ME. A biological function for the neuronal activity-dependent component of Bdnf transcription in the development of cortical inhibition. *Neuron.* 2008;60:610-24.
- [68] Hunter AG. Coffin-Lowry syndrome: a 20-year follow-up and review of long-term outcomes. *Am J Med Genet.* 2002;111:345-55.

## 7. 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始直接のご指導およびご総括をしていただきました自治医科大学小児科学教室、山形崇倫教授に深謝いたします。また、研究の機会を与えていただきました前任の桃井眞里子教授に深謝申しあげます。本研究指導協力教員として日々ご指導をいただきました神保恵理子講師に深謝いたします。リンパ球分離、培養等にご協力いただきました高杉雅代研究補助員、検体収集にご協力いただきました全ての先生方に深謝申し上げます。

また、機能解析にご協力、ご指導いただきました愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所、神経制御学部室長の永田浩一先生、水野誠先生、浜田奈々子先生、山梨大学、環境遺伝医学講座の久保田健夫教授、三宅邦夫先生にここに深謝申し上げます。