

氏名	まつもと あゆみ 松本 歩
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 462 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 19 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	発達障害の原因遺伝子の同定・解析
論文審査委員	(委員長) 教授 阿部 隆 明 (委員) 教授 村松 慎 一 教授 加藤 敏 (委員) 教授 五味 玲 講師 嶋崎 晴 雄

論文内容の要旨

1 研究目的

自閉性障害 (ASD) 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%に見られる。一方、知的障害 (ID) は知能全般の遅れ (知能指数 70 未満) を示し、罹患率は 2~3%である。ASD の約 60~80%に ID が合併し、共通する病態の可能性が推定される。

これらの疾患において、治療標的となる分子基盤の解明は、病態理解、治療法開発に必要不可欠である。本研究では、ASD、ID 患者における aCGH (array comparative genomic hybridization) 解析を行い、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、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。

2 研究方法

末梢血リンパ球を分離し、DNA を抽出した。Human Genome CGH Microarray 4x180K (Agilent technologies) を用い、aCGH 解析を行った。aCGH で得られた結果から LIN7A、LIN7B について Western blot 法でラットの大脳でのシナプスでの局在、発達期マウス脳での発現の経時的変化について解析を行った。子宮内エレクトロポレーション法を用い、胎生 14.5 日のマウスの Lin7A、Lin7B をノックダウンし、発達期における大脳皮質神経細胞の移動障害、axon の伸長について解析を行った。ASD の患者で LIN7B の変異についてダイレクトシーケンス法を用いて解析を行った。RPS6KA3 については Western blot 法で家系における RPS6KA3 の発現および X-chromosome inactivation (XCI) assay について解析した。

3 研究成果

ASD 例および ID 例に aCGH 解析を行い、ASD 例で 4/49 例、ID 例で 9/40 例で病因と考えられる CNV を検出した。ID 例で LIN7A の欠失、RPS6KA3 の重複、ASD 例で SHANK3 の欠失、LIN7B の重複を検出した。

ASD166 例に対し LIN7B のシーケンス解析を行い 1 例で Exon 5 のドナーサイトの変異 (c. 602+1G>C) を検出した。Reverse Transcriptase PCR で coding 領域を解析したと

ころ Exon 4 と Exon 6 が連結し、Exon 6 がフレームシフトしているバンドを検出した。Exon 5 の欠失部位は PDZ domain の約 1/3 の欠失に相当していた。Lin7A、7B ともマウス発達過程 (E13.5~P30) で発現し、Lin7A はシナプス前膜、Lin7B はシナプス後膜に多く含まれていた。胎生 14 日マウスにエレクトロポレーション法を用いて RNAi を導入し Lin7A、Lin7B をノックダウンした結果、大脳皮質の神経細胞局在はコントロールと比べ約 8 割の神経細胞が II-IV 層以下に局在し、形態も未熟であった。また、Lin7A のノックダウンでは axon の対側への伸長が約半分に抑制されていた。これらは、それぞれ human Lin7A、human Lin7B にてレスキューされた。

軽度 ID の一家系における解析では、発端者、母、2 名の弟、2 名の妹で ChrXp22.12 に *RPS6KA3* を含む 584 Kb の重複を検出した。XCI (X-chromosome inactivation) patterns では母親の XCI pattern は (41:59)、妹 (IV-8) は (67:33) でランダム、広汎性発達障害 (PDD) の妹 (IV-9) は HUMARA アレルがホモであったため情報が得られなかった。発端者 (IV-6)、母 (III-4)、弟 (IV-7)、妹 (IV-8)、弟 (IV-10) のリンパ芽球での *RPS6KA3* 発現をコントロールと比較した結果、発端者 (IV-6):2.12 倍、母 (III-4):1.77 倍、弟 (IV-7):1.91 倍、妹 (IV-8):2.14 倍、弟 (IV-10):1.53 倍であった。

4 考察

シナプス関連遺伝子、シグナル伝達にかかわる遺伝子が ASD および ID の原因遺伝子として同定されており、ASD と ID の原因遺伝子はオーバーラップしている。本研究においても、ID と ASD の共通の原因遺伝子として LIN7 を検出した。LIN7 は PDZ domain を有し、シナプス機能、細胞接着、細胞極性に関与する。Lin7A の移動障害が発達期の大脳皮質の形成障害を引き起こしたことから、LIN7A は ID の原因遺伝子と推定された。LIN7 はシナプス前膜において CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase) と相互作用する。CASK の変異は ID、てんかん、橋小脳低形成の責任遺伝子である。axon の対側への伸長障害(脳梁低形成)は LIN7A 欠失の表現形と考えられた。変異解析で得られた c.602+1G>C 変異では、PDZ domain の約 1/3 が欠失し、PDZ domain を介した GRIN2B (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate subunit 2B)の結合が障害されている可能性がある。LIN7 はシナプス後膜で 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。LIN7B がシナプス後膜に多かったことから、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、今後更なる解析が望まれる。

RPS6KA3 は cAMP response element-binding protein (CREB) をリン酸化する遺伝子で、Coffin-Lowry syndrome (CLS)、非症候性の X-linked ID の原因遺伝子である。*RPS6KA3* の発現量の比較では、*RPS6KA3/Tubulin* がコントロールと比べ 1.53~2.14 倍と上昇していた。注意欠陥多動性障害、局在関連てんかん、また、保因女性における広汎性発達障害、うつ病も *RPS6KA3* の重複の表現形と考えられた。*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た軽度から境界の ID を示したと考えられた。

5 結論

ASD 例、ID 例について aCGH 解析を行い、ASD 患者の 4/49 例 (8.1%)、ID 患者の 9/40

例 (22.5%)で病因 CNV が検出された。それらの中で、ID 例で *LIN7A* 欠失、*RPS6KA3* の重複、ASD 例で *SHANK3* の欠失、*LIN7B* の重複および変異 (c. 602+1G>C) を検出した。

発達期におけるマウスのシナプスにおける局在では *Lin7A* はシナプス前膜、*Lin7B* はシナプス後膜に多く発現していた。マウス胎生 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た。また、神経細胞の axon 伸長障害があり、脳梁が低形成になった。*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 に、ADHD、てんかん、うつ病、PDD を認めた。*RPS6KA3* 重複がこれら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。

論文審査の結果の要旨

近年、発達障害が医療や教育の現場で話題になっており、中でも自閉症圏の病態に注目が集まっている。以前は幼少期自閉症として、比較的少ないとされていた病態が、自閉症スペクトラム(ASD)として広く捉えると、人口の数パーセントの有病率であると報告されている。とはいえ、基本的な特徴は共有していても、症状には濃淡があり、知的にも障害レベルから平均以上の能力を有するものまで様々である。しかも、その発症機序はほとんど解明されていない。本研究は主に知的障害(ID)群に焦点を当てて、その原因遺伝子の同定と解析を行ったものである。その内容は大きく三部に分かれる。

まず、ASD49 例および ID40 例に対する aCGH 解析では、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を検出している。

この結果を踏まえて、特に *Lin7A*、*Lin7B* に着目して、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検討している。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が認められ、*Lin7A* をノックダウンした神経細胞は Axon の伸長障害、脳梁の低形成が確認されたとしている。

また、*RPS6KA3* の重複家系の調査では、境界～軽度の ID、ADHD、てんかん、女性キャリアにうつ病、PDD を認め、*RPS6KA3* の発現が、コントロールと比べ、1.77～2.14 と上昇を認め、*RPS6KA3* 重複が同家系の ID、行動異常の原因と考察している。

申請者は、以上の研究から ASD の病態の一端を明らかにし、足場蛋白の重要性を再確認したと述べている。確かに、この見解は ID ならびに ID を合併した ASD では首肯できるものの、知的に高い ASD でも同様のことが言えるのか検討を要すると思われる。とはいえ、多様な ASD の一部の病態解明に貢献したことは間違いない。以上より、本研究内容は学位論文にふさわしいものであると全員一致で認められた。

最終試験の結果の要旨

申請者は論文審査に際して入念に準備していたことが窺われ、その研究目的、対象と方法、結果とその解釈を明快に説明し、研究の全体を分かりやすく提示できた。また、発達障害の概念に精通し、遺伝子の解析技術に関しても十分な知識と能力を有していると判断された。発表後に審査委員からは以下のような質問があった。

病因遺伝子と原因遺伝子はどう違うのか。病因 CNV が検出されない ASD や ID 例の方が多きことをどう考えるのか。リンパ球と体細胞では遺伝子の発現が異なるのではないか。呈示した家系が軽度から境界の知的障害を示した機序としては、RPS6KA3 の恒常的な過剰発現が背景にあるとしても、その negative feedback で CREB の発現が抑えられていると言えるのかどうか。ADHD やてんかん、うつ病まで RPS6KA3 重複と結び付くのかどうか。

これらの質問に対して、申請者からは迅速で概ね適切かつ誠実な返答が得られ、論文中にその内容が加筆されることとなった。その他、字句の誤りや用語の不適切な使用などが指摘された。以上の点について、申請者は学位論文を修正した。審査委員が修正原稿を再点検し、適切に修正されていることを確認した。

以上より申請者の学識及び研究能力は学位授与に十分値するものと審査員全員一致で判断した。