

氏 名	楊 志 亮
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 490 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 18 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	自閉症スペクトラム障害の遺伝学的解析・シナプス足場タンパク質 MUPP1 および時計関連遺伝子変異解析
論文審査委員	(委員長) 教授 富 永 眞 一 (委 員) 准教授 佐 藤 滋 講師 須 田 史 朗

論文内容の要旨

1 研究目的

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、社会的な相互コミュニケーションの障害、興味の限定と常同的な行動を呈する疾患である。ASD 患者の 15%から 56%は知的障害 (ID) を合併する。これまで、小児科学講座では、ASD 患者に *CADM1* 変異を見出し、ASD の病因遺伝子の 1 つであることを明らかにし、*CADM1* が、13 個の PDZ 領域を持つ足場タンパク質である MUPP1 と結合し、シナプスでのタンパク質複合体形成が重要であることを示唆した。また、ASD 患者の 44~83%には、睡眠障害の合併が見られる。ASD の分子病態と、生物時計により形成される睡眠リズムは、時計遺伝子制御下における脳機能障害が関与すると考えられる。概日リズムに関連する遺伝子とシナプス機能との関連を推測する報告があり、ASD における概日リズム関連遺伝子がシナプス構造・機能と密接に関わっている可能性がある。本研究では、ASD へのシナプス関連遺伝子の関与と病態解明研究の候補として、①これまで小児科学で同定した ASD 候補遺伝子 *CADM1* と PDZ 領域を介してタンパク質複合体を形成する MUPP1 の遺伝子変異の解析と、②ASD 患者に併発する睡眠障害に着目し、時計関連遺伝子変異解析からの ASD 病因解明のアプローチを行った。

2 研究方法

同意が得られた ASD 患者のリンパ芽球から genomic DNA を抽出した。*MUPP1* 遺伝子変異解析では、各エクソンを PCR 法により増幅した。得られた PCR 産物に標識を付加した。時計関連遺伝子変異解析では、genomic DNA を断片化して、18 種類の各時計関連遺伝子のエクソンを捕捉した。それぞれの DNA 精製断片物を emulsion PCR で増幅後、次世代シーケンサー (GS junior sequencer) を用いてシーケンス後、解析ソフト GS reference mapper で変異を検出した。検出された変異は、ダイレクトシーケンス法で確認した。なお、時計関連遺伝子変異については、各グループの変異検出率を Fisher's exact test with IBM SPSS statistics 21 software を用いて統計学的有意差を算出した。

3 研究成果

MUPP1 遺伝子変異解析では、113 人の ASD 患者（日本人 79 名、Caucasian 58 名）を解析し、11 種類のアミノ酸変異を見出した。変異 p.I200V (PDZ1)、p.I781T (PDZ5)、p.E702M (PDZ5)、p.G782R (PDZ5)、p.SI1011T (PDZ6)、p.I1194R (PDZ7)、p.R1880K (PDZ12) は、PDZ 領域に局在していた。その中で、既に報告されている SNPs 以外に検出された変異は、日本人患者での p.I200V (PDZ1) と p.I781T (PDZ5)、Caucasian 患者の p.E702M (PDZ5) であった。p.I200V、p.I781T はコントロール群で検出されなかった。なお、アミノ酸変異がない塩基変異は 8 種類存在した。

時計関連遺伝子変異解析では、日本人 ASD 患者の中で、睡眠障害を示す群と示さない群それぞれ 14 人と 23 人のコントロールの検体について解析した結果、11 種類の遺伝子に 33 種類のアミノ酸変異を見出した。睡眠障害を示す ASD 患者群と示さない ASD 患者群の間に有意差はなかった ($p=1$) が、ASD 患者とコントロールの間に有意差が見られた ($p=0.001$)。ASD 患者のみに検出された遺伝子変異について、タンパク質機能における影響を PolyPhen-2 で解析したところ、PER2 の p.P1228A、PER3 の p.R366Q、TIMELESS の p.F498S と p.A325T が probably damaging という結果であった。また、SIFT による解析では、PER3 の p.R366Q と TIMELESS の p.F498S が damaging、mutation t@sting による解析では、NR1D1 の p.S20R、CLOCK の p.H542R、ARNTL2 の p.L473S、ARNTL の p.S13T、PER3 の p.R366Q、TIMELESS の p.F498S と p.A325T が disease causing となった。これらにより、タンパク質機能へ影響を及ぼすことによる疾患発症の可能性が示唆された。

4 考察

MUPP1 遺伝子変異解析では、SNPs の報告がなく、なおかつコントロール群に変異がなかった 2 種類の変異である p.I200V (PDZ1) と p.I781T (PDZ5) が ASD に関与する可能性が高いと考えられた。ASD 患者において *CADM1* 変異だけでなく *MUPP1* 変異が存在したことから、*CADM1-MUPP1* タンパク質複合体の病態への関与が示唆された。*MUPP1* の直接的な PDZ 結合の変化、及び *MUPP1* の変異による *MUPP1* タンパク質の構造変化による障害が考えられる。

時計関連遺伝子変異解析では、コントロール群と統計学的有意差を示し、ASD 患者群に高率に時計関連遺伝子変異を検出したことから、時計関連遺伝子は ASD 病態との関連が高いことが示唆された。ASD 患者に検出された時計関連遺伝子は多岐にわたった。特に PER2、PER3、TIMELESS に検出された変異はタンパク質機能に影響を及ぼすことが考えられた。コンピューター解析でタンパク質への影響が考えられた変異について、実際のタンパク質機能や他要因との組み合わせによる ASD の発症との関連を今後検討する必要がある。

5 結論

MUPP1 遺伝子変異解析では、見出された *MUPP1* の変異の中に ASD に関与する可能性が高い変異が存在した。それらの変異はタンパク質結合領域である PDZ 領域に含まれており、タンパク質複合体 (*CADM1-MUPP1* タンパク質複合体) の異常による ASD の病態への関与が示唆された。

時計関連遺伝子変異解析では、コントロールとの比較により、ASD 患者群に時計関連遺伝子変異を多く検出したことから、時計遺伝子は ASD 病態との関連が高いことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

自閉症スペクトラム障害（Autism Spectrum Disorders 以下 ASD と略）は、特に小児科領域で重要な疾患で、療育治療は開始時期が早いほど効果が高いとされているが、未だにその分子病態については不明の部分が多い。

ASD は遺伝性疾患であると推定され、病因遺伝子の解析は治療につながる重要な研究であるが、今までの成果から多遺伝子関連疾患と考えられている。

本研究は従来自治医科大学小児科学講座で展開されてきた病因候補遺伝子の探索をさらに進展させることから開始された。申請者はまずシナプスタンパク質複合体の中の MUPP1 をコードする遺伝子の解析を行った。さらにメラトニン受容体が MUPP1 に結合していること、および ASD 患者に睡眠障害が併発することに着目して時計遺伝子群の変異解析に発展させていった。

申請者は次世代シーケンス技術、および変異がタンパク質の機能に与える影響を解析する 3 種類のソフトウェアを駆使して以下の結果を得た。

(1) シナプスに関わる遺伝子 *MUPP1* についての遺伝子変異を ASD 患者で解析し、アミノ酸変異を生じる 11 種類の変異を見出した。その中の 2 つの変異が ASD との関連がすでにわかっている *CADM1* との結合に影響する可能性が高いことを示した。

(2) 時計遺伝子群の解析では、ASD 患者において 11 種類の遺伝子に変異が検出された。その中で、コントロールにはない変異であり 3 種類の解析ソフトウェア全てでタンパク質機能への障害が示唆されたのが、2 遺伝子 2 箇所であった。

本研究は ASD と関連すると考えられるシナプスタンパク質をコードする遺伝子 *MUPP1* の変異を見出し、さらに時計遺伝子群にもその変異が ASD と関連するものがある可能性を示した点で、この研究領域に新たな足がかりを与えるものと評価された。従って委員全員一致で、審査論文は博士論文に値すると判断された。なお、この研究内容は原著論文としてすでに投稿され、revised version が現在審査中である。

最終試験の結果の要旨

申請者は、審査論文に関して、その研究目的、実験方法、結果およびその解釈について、要領よく説明できた。質疑応答まで全て日本語でこなし、申請者のこれまでの努力が評価できた。遺伝性疾患である ASD について臨床的な側面でも一定の知識を有していた。高度な技術、解析ソフトについては必ずしも専門的知識を持つわけではないが、研究に必要な部分の理解は妥当なものであると認識された。質問への応答も言葉の壁はあるものの、趣旨をよく理解して適切に対応していた。またこの研究の将来への展望も述べることができた。

以上により、申請者の学識、研究能力は学位を授与するに値すると全員一致で認められた。