

表 題 自閉症スペクトラム障害の遺伝子解析による
生物学的指標の探索

論文の区分 博士課程

著 者 名 後藤昌英

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 専攻
生殖・発達医学 分野
成育医学

2017年1月10日申請の学位論文

目次

1. 序論-----	2
2. 対象と方法	
1)対象-----	8
2)リンパ球培養と DNA 抽出-----	8
3)マイクロアレイ解析-----	9
4)ASD 患者の変異解析：(a)PCR、(b) direct sequence-----	10
5)細胞へのプラスミド導入法-----	13
6)子宮内エレクトロポレーション法-----	14
3. 結果	
1) ASD 患者における aCGH 解析-----	15
a) シグナル伝達に関与する遺伝子を含む領域の欠失例の aCGH 解析-----	14
b) GPR52、RABGAP1L 遺伝子の変異解析-----	16
2) ASD とサーカディアン関連遺伝子(<i>NR1D1</i>)	
a) NR1D1 遺伝子の変異解析、家系解析-----	17
b) mNr1d1RNAi の Nr1d1 発現抑制作用の確認-----	19
c) Nr1d1 の発現解析-----	20
d) Nr1d1 の発現抑制による神経細胞の障害	
d-1)大脳皮質における Nr1d1 発現抑制神経細胞の移動障害と細胞形態変化-----	20
d-2) Nr1d1 発現抑制神経細胞の移動における経時的観察-----	22
d-3) Nr1d1 発現抑制神経細胞における軸索の伸長障害-----	23
d-4) Nr1d1 発現抑制神経細胞における樹状突起の形態異常-----	24
4. 考察-----	26
5. まとめ-----	32
6. 参考文献-----	33
7. 謝辞-----	44

略語

〈日本語〉

ゲノムワイド関連研究(Genome-wide Association Study; GWAS)

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

染色体微細構造異常(copy number variation; CNV)

G タンパク質共役受容体(G-protein-coupled receptor; GPCR)

知的障害(Intellectual disability; ID)

〈英語〉 アルファベット順

aCGH (array comparative genomic hybridization)

ARNTL (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like)*AUTS2* (autism susceptibility candidate 2)*CHD8* (chromodomain helicase DNA binding protein 8)*CLOCK* (clock circadian regulator)*CNTNAP2* (contactin associated protein-like 2)

DMS-IV/V(The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Fourth / Five Edition)

FISH (Fluorescent in situ hybridization)

GJA1 (Gap junction alpha-1 protein)*GPR52* (G protein-coupled receptor 52)*GRIN2B* (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate subunit 2B)*MTNR1A* (melatonin receptor 1A)*NLGN3* (Neurologin 3)*NRXN1* (neuroxin 1)*NR1D1* (nuclear receptor subfamily 1 group D member 1, Rev-Erba)*OPHN1* (oligophrenin 1)*PER1* (period circadian clock 1)*RABGAP1L* (RAB GTPase activating protein 1 like)*SHANK3* (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3)*TBR1* (T-box, brain 1)

1. 序論

自閉症スペクトラム障害(Autistic Spectrum Disorders: ASD) [The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition; DSM-5]は、社会的コミュニケーションおよび相互関係における持続的障害、限定された反復する様式の行動、興味、活動を特徴とする発達障害であり、発症頻度が約 0.8-1.5%[Baxter, 2015; Christensen, 2016]と比較的高く、本邦には数十万人の罹患者がいると推定される。ASD の双生児の研究から、ASD の二卵性双生児における一致率は 0-10%であるのに対し、一卵性双生児では 60-92%で[Folstein, 2001]、遺伝率は 90% [Freitag, 2007] と非常に高く、遺伝学的背景が示唆される。病因遺伝子解析が進められ多くの遺伝子が同定されたが、患者の半数以上では病因遺伝子が同定されていない。遺伝的基盤は多彩であり、単一の病因遺伝子によると考えられる例もあるが、多因子遺伝とされている[Krakowiak, 2012]。これまで明らかになった病因遺伝子としては、Fragile X 症候群や結節性硬化症をはじめとした、身体症状を伴う症候性 ASD の病因遺伝子が約 10%を占めている[Sakai, 2011]。非症候性 ASD の病因遺伝子の機能としては、*CHD8* [O'Roak, 2012]などのクロマチンリモデリング、*NLGN3/4* [Jamains, 2003]、*NRXN1* [Feng, 2006]や *SHANK3* [Durand, 2007; Moessner, 2007]などのシナプス形成や機能、*GRIN2B* [O'Roak, 2011]などのシグナル伝達、神経成長因子に属する *TBR1* [O'Roak, 2012]などに分類され、現在では 100 以上の遺伝子が候補とされている [Betancur, 2011]。これまで多くの ASD に対しての病因遺伝子の探索研究が行われてきた。まず、兄弟発症例を用いた連鎖解析や[Auranen, 2002; Shao,2002]、染色体欠失を持つ例で、その欠失領域に局在する遺伝子の解析が行われた[Thomas,1999]。それらの研究から、最初に ASD

の病因遺伝子として、2003 年にシナプス結合に関与する分子である *NLGN3* と *NLGN4* が同定された[Jamains, 2003]。それら以外にも、ASD と強く関連のある染色体上の領域や転座切断点に局在する遺伝子解析などから *AUTS2* など ASD の病因と考えられた遺伝子も少数同定されたが確定的な結果は得られず[Sultana, 2002]、より多くの候補遺伝子までは特定することはできなかった。関連解析研究では、技術の進歩とコストの低下に伴いゲノムワイドに 50-100 万個の SNPs を一度に検出できるゲノムワイド関連研究(Genome-wide Association Study: GWAS)として大規模なサンプル数で多くの解析がなされ[Wang, 2009; Weiss, 2009; Anney, 2010]、数百の候補遺伝子が挙げられたが、同定されるリスク SNP のオッズ比は低く(1.2 以下)、多くの場合で統計学的に有意ではなく、サンプルサイズが大きくなるにつれて ASD との関連性が再現できなかった[Visscher, 2012; Stein, 2013]。その後、マイクロアレイ Array comparative genomic hybridization (aCGH)を用いて患者と対象の DNA を比較しゲノムコピー数を解析する Copy number variation(CNV) 研究が進められ、ASD 患者の 10-20%に *de novo* の CNV が検出された[Sebat, 2007; Marshall, 2008]。ASD の孤発例では *de novo* CNV を持つ割合が 6.6%であるのに対して、健常対象者では 1.9%と 3 倍以上の差があり[Huguet, 2013]、*de novo* CNV の ASD 病態への強い関与が推定された。CNV 研究からは ASD と強い関連をもつ遺伝子として *ACHE*, *AKAP9*, *ARID1B*, *CIB2*, *CNTN5*, *CNTN6*, *DAPPI*, *DNMT3A*, *ELP4*, *GPHN*, *ILF2* , *IRF2BPL*, *KAT2B*, *KIAA1586*, *MFRP*, *NINL*, *OR52M1*, *P2RX5*, *PLXNA4*, *PTK7*, *RANBP17*, *ROBO2*, *SHOX*, *SLC38A10*, *TMLHE*, *USP45*, *WWOX* が同定され[Prasad, 2013; Sanders, 2015]、遺伝子座 1q21, 5p15.2, 7q11.23, 15q11-13, 15q13, 16p11.2, 17p11.2, 22q11.2 も特定

されている[Sebat, 2007; Zhang, 2009; Malhotra, 2012; Shishido, 2014; Sanders, 2015]。これらの遺伝子は、シナプスにおけるシグナル伝達、神経細胞遊走、神経伝達物質の代謝、髄鞘化などに関与する遺伝子が多く、CNV による遺伝子発現変化が神経活動の障害を引き起こしていると予想された[Sanders, 2015]。最近では、次世代シーケンサーを用いて、患者、両親のトリオ検体における、エクソン領域のみを選択的にシーケンスし網羅的に *de novo* 点変異を検出する全エクソーム解析が盛んに行なわれている。孤発例と家族例を含む 2517 家系と大規模なサンプル数の解析では、ASD 患者の 9%で発症に関与する *de novo* 変異が検出され、孤発例に限ると 30%で *de novo* 変異が発症に関与していると推定された[Iossifov, 2014]。さらに、親から受け継がれた変異も対象に含めた ASD 3871 例、健常 9937 例の解析で、ASD 発症に対して強い影響を持つと推定される 107 個の遺伝子が同定された[De Rubeis, 2014]。これら ASD リスク遺伝子のなかにシナプス前終末とシナプス後膜を繋ぐ接着因子の *NLGN3*、*NLGN 4*、*NRXN1* やシナプス構造や機能を安定化させている足場蛋白の *SHANK3* など多くのシナプス関連分子が見出されている [Bourgeron, 2015]。これらの遺伝子のノックアウトマウス、あるいは他の自閉症モデルマウスでシナプスの異常が報告され[Moy, 2008]、さらに、ASD 患者の剖検脳からもシナプスの数や形態異常が確認されていることから[Martínez-Cerdeño, 2016]、ASD の中心病態の一つがシナプス形成、機能、神経ネットワークの異常と考えられる[Ziats, 2015]。

一方、ASD は 70-80%に知的障害(Intellectual disability: ID)を合併し[Bertrand, 2001; Betancur, 2011]、それ以外にも 38-46%にてんかん[Danielsson, 2005; Hughes, 2005]、多動、興奮、自傷、睡眠障害など多彩な症状を呈する。睡眠障害に関し

ては、定型発達児では 25-40%に睡眠障害があるが[Owens, 2005]、ASD では 40-80%と睡眠障害の頻度は高くなる[Richdale, 1995]。人の睡眠覚醒リズム(サーカディアンリズム)は、生物の内因性リズムの発振機構である生物時計によって作られる。哺乳類では、視床下部の視交叉上核にある時計中枢によって、個々の細胞の自立的なリズムを刻むサーカディアン遺伝子が制御されている[Huang, 2011]。サーカディアン時計の中心的なメカニズムは、二つの相互に連動したポジティブ、ネガティブフィードバック回路から構成されている(図 1)[Okamura, 2010; Partch, 2014]。これらの回路の遺伝子群のコアグループは、転写促進因子の ARNTL や CLOCK, 転写抑制因子の PER1/2/3 や CRY1/2 からなる。ARNTL、CLOCK の二量体が、核内受容体サブファミリーの *NR1D1* (nuclear receptor subfamily 1 group D member 1, Rev-Erb α)や *NR1D2*(Rev-Erb β)、*ROR* のプロモータ領域にある E-box に結合し、*CLOCK*、*ARNTL* に対して ROR が転写を促進、NR1D1 が転写を抑制している[Crumbley, 2010, 2011]。*PER1*、*MTNR1A*、*MTNR1B*、*AVPR1A*、*CSNK1D* などのサーカディアン遺伝子において、ASD 例に新規変異の同定や多型の頻度が有意に多いなど、ASD との関連が推定されている[Yirmiya, 2006; Nicholas, 2007; Chaste, 2010; Jonsson, 2010; Pinto, 2010]。

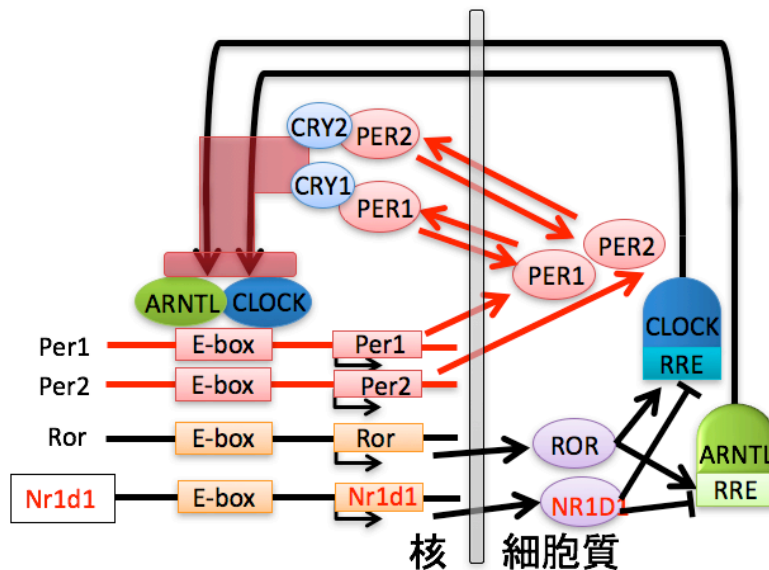


図 1. 時計関連遺伝子相関図

時計関連遺伝子は相互に連動して、Per, Cry, Arntl や Clock が中心となったループを形成し、サーカディアンリズムを形成している。

当研究室で、18 種類のサーカディアン関連遺伝子に対して 28 例の ASD 例と 23 例の正常コントロール群で比較した研究で、ASD 群の方が、コントロール群よりも変異や多型が有意に高かった[Yang, 2016]。その一つとして、*NR1D1* (OMIM*602408)に新規変異 c.58A>C (p.S20R)が検出された。野生型マウスでは *NR1D1* は樹状突起、シナプス棘にも局在し[Valnegri, 2011]、ノックアウトマウスでは過活動、新規場面での反応の障害、営巣行動における記憶や行動の異常が報告されているため[Jager, 2014]、*NR1D1* を病因候補遺伝子として注目した。*NR1D1* はシナプス機能との関連も推定されるため、ASD の候補遺伝子として、ASD との関連性の解明と、さらなる機能解析を行うことは重要である。

我々の研究の目的は、ASD の病因遺伝子を同定し、病態解明と治療法開発の研究に結びつけることである。上記の様な、ASD の病因遺伝子研究から、CNV

は ASD の主要な遺伝学的病態の一つであり、検出された CNV 中に含まれる遺伝子は ASD の重要な候補遺伝子である。よって、ASD 患者において aCGH 解析により CNV を検出し、その CNV の領域から神経形成、特にシナプス機能と関連する補遺伝子を抽出することを一つの目的とした。また、サーカディアン関連遺伝子も ASD との関連が強く疑われ、当研究室で同定されている遺伝子解析を順に進めているが、本研究では *NR1D1* に注目し、ASD との関連、神経・シナプス形成や機能との関連を解析した。それぞれのアプローチからの、病因遺伝子の同定とシナプス形成、機能を基盤とした病態解明を目的に、aCGH、変異解析と機能解析を行った。

2.対象と方法

1)対象

日本人患者検体は自治医科大学附属病院小児科および関連病院の通院患者で、親権者に説明し書面で同意が得られた患者を対象とし、連結可能匿名化をした。ASD の診断は DSM-IV あるいは DSM-5 の基準を満たす症例とした。DSM-IV は自閉性障害、アスペルガー障害、特定不能の広汎性発達障害を含んでいる。なお、DSM-5 の定義については序論に記した。研究にあたり自治医科大学の倫理委員会の承認を得た。

aCGH の解析対象として、ASD44 例 (男性 35 例、女性 9 例)からのリンパ球、DNA を用いた。ID を合併する ASD は 26 例(59.1%)であった。シーケンス法による変異解析は、日本人 ASD 95 例、白人 ASD 121 例を対象とした。変異解析のコントロールは日本人 118 例、白人 158 例を使用した。白人 ASD 検体は、The Autism Genetic Resource Exchange (AGRE) (CA, USA)から購入した。白人コントロール検体は、Coriell Institute for Medical Research (CA, USA)より購入した。

2)リンパ球培養と DNA 抽出

同意が得られた ASD 患者とその家族から採血し、末梢血リンパ球を分離、Epstein-Barr virus で芽球化し、RPMI 1640 培地 (Life technology,CA,USA)に 10% fetal bovine serum (Equitech-BIO, Tokyo, Japan)、penicillin-streptomycin (penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml)を加えた培地下で、5%CO₂、37℃の環境で培養した。リンパ芽球から通常の方法で genomic DNA を抽出した。濃度測定には

NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)を用いた。

3)マイクロアレイ解析

aCGH を用いて CNV 解析を行った。患者および正常コントロール(G1471 Male, G1521 Female, Promega)の Genomic DNA 1.0 μ g を、それぞれ Nuclease free water で 26.0 μ l にし SureTag DNA Labeling Kit (Agilent technologies, CA, USA) の random primer 5.0 μ l と 95°C で 10 分間反応させた。次に氷上で、5 \times Reaction buffer 10 μ l, 10 \times dNTP 5 μ l、Exo-Klenow 1.0 μ l を加えた。患者検体は Cy5、正常 control は Cy3 を 3.0 μ l ずつ加え、37°C で 2 時間加温し、蛍光標識した。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。この蛍光標識された患者と control サンプルを各 19.5 μ l を合わせ、Agilent Oligo aCGH Hybridization kit (Agilent technologies, CA, USA)で Hybridization 液を作成し、Human Genome CGH Microarray slide 4x180K (G4826A#22060) (Agilent technologies)上で 65°C、20rpm で 24 時間ハイブリダイゼーションをした。反応させたアレイスライドを Oligo aCGH Wash Buffers で洗浄した。アレイスライドは、Agilent G2365BA マイクロアレイスキャナ(Agilent technologies)で読み取り、tiff 画像ファイルを作成した。画像ファイルはソフト Feature Extraction (ver.10.7.3.1, Agilent technologies)で数値化した text file を Agilent genomic workbench (Lite edition 6.5, Agilent technologies)で解析した。健常者の CNV 頻度は、Database of Genomic Variants (DGV) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>)を参照した。DGV は米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI)の染色体構造多型のデータベースである dbVar と欧州 European Bioinformatics Institute (EBI)の同

様の EGA を連携させ、ヒト健常者のデータのみを収載した染色体構造多型のデータベースであり、2017 年 1 月 1 日時点で 6359956 サンプル、552586 部位の CNV が報告されている。

4) ASD 患者の変異解析

(a) PCR

aCGH 解析で異常が検出された遺伝子と *NR1D1* について direct sequence を行った。リンパ芽球から抽出した genomic DNA を用い、目的とする遺伝子の全エクソンとその近傍のイントロンを PCR で増幅した。PCR 反応液は、DNA 50ng、10xPCR Buffer (Takara, Shiga, Japan) 2.0μl、dNTPs 200mM (Takara) 1.6μl、プライマー各 0.2μM、rTaq DNA polymerase (Takara) 0.1μl に DDW を加え、総量 20μl に調整した。PCR 反応は、Gene Amp PCR System 9700 (Life technology) を使用し、94℃で 5 分反応後、94℃30 秒、各プライマーのアニーリング温度 30～60 秒、72℃ 30～60 秒を 35～40 サイクル行い、その後伸長反応を 72℃で 10 分間行なった。また、*GPR52* の全てのプライマー、*RABGAP1L* の Exon 2、9、12、18、24、26、*NR1D1* の Exon 5 の前半、後半の 2 つは、2×GC buffer I (Takara) 10μl、Takara LA Taq 0.1μl を用いた。

表 1 *GPR52* の各エクソンのプライマー

Exon 番号	Forward primer (5'to 3')	Reverse primer (5'to 3')	産物サイズ (bp)	アニーリング 温度(℃)
1 の前半	gttctgaaacactcatgtgcg	gcctcttctcataatcaactg	438	55
1 の中央	tgtggcatgtcttgcttgcac	ccaactctgtccttctaacaacctg	461	55
1 の後半	tttatatgctgtggctcccc	ctgacagtgggtttgatcatattc	182	62

表 2 *RABGAP1L* の各エクソンのプライマー

Exon 番号	Forward primer (5'to 3')	Reverse primer (5'to 3')	産物サイズ (bp)	アニーリング 温度(℃)
1	cagcaggattcttctcacataaac	ggagatgtgtaaaatgcaaagg	365	51
2	aatcgctgaaccaggaggcgaag	ccacttcggtgttatgtttctgc	731	68
3	gtggctctggaactctgacataag	gtctttgggtgggtggaaga	483	55
4	ggttgcaatgagccaagatg	ggatgagttgcctttccacctt	598	67
5	ctgcaaagaaaattgtcatgg	gttggtataaagcctcaaat	374	53
6	gcctgtggcaaggtagagagtttag	ctgtacaactgggtttgtcaca	503	63
7	aaaaaggctttatgctcactggg	caggacaattccacaaaacag	340	62
8	tgctccttttatccaagggtac	gcttctatgggggaaatctcca	511	52
9	tgctccttttatccaagggtac	gcttctatgggggaaatctcca	392	62
10	acacgccattcttcattgcag	ggtgtgtgtgtgtgggtagaagtg	340	65
11	tgggaattccagttgtgctacc	ggtctcccccaagtatggtt	607	59
12	tgtttaatgccccccac	cctagtttcatagctcccataagtc	659	62
13	gcagtgagctgtgattgtgctactg	gctttctttgcatgggaggttg	555	65
14	gactatgggtctgggatagaaggg	gccatgttttctgctttgcaca	350	65
15	agcaggagcctggtatgagctaac	ggtccgtgtgataaatgacacagt	191	65
16	gccttcagctacttatgcagaggac	gtccacgtagaacacttggaagaagc	624	56
17	ggcaggaacttcattgttctgc	gtttatcatgtttgggactgctgc	656	65
18	agccactcagggaagaaaataacc	cctctttgcccttggaactgga	274	62
19	gtcctcaaagcaggctgaaatg	ctcccagatgtgtttgtcaggc	334	65
20-21	tgagcatgttcccttagaatgcc	caagtagctgggattacaggcacg	619	65
22	tgtatgtccagacactaatgccac	gagactgtgatgacttcctcagg	198	59
23	gggtttggagaagattccacac	gaagggtgttaaaaggaggca	387	65
24	tctcaaaactctggcctcaagc	gcttgaggccaggagtttgaga	364	58
25	gactggcatttgagtgctattc	ggcttgaagtacctgaaagaaccc	290	62
26	gggcctgcattatgacaat agc	gaatgtggctcacttcagtggtg	620	62
27	tgagactccaaaaagctgcacac	caaaccaatggaaatctgggagg	299	59

表3 *NR1D1* の各エクソンのプライマー

Exon 番号	Forward primer (5'to 3')	Reverse primer (5'to 3')	産物サイズ (bp)	アニーリング 温度(°C)
1	ccatgcaaagcagaactccg	cttgctcgggctggaaatgc	428	66
2	tggccatgccatgtctactg	ctgattcgggggaagggaag	555	60
3-4	acctttccagctgattcggg	gaatcacatgtgccagggga	662	66
5 前半	atccctcctagggaacccc	gcccccaatgacaacaacac	590	64
5 後半	caacaaccagttgagcagcc	cttagtgtagggcagctggg	650	60
6	acctggcacctaattgctac	acgcttctgcttttgacct	609	66
7	cctgattggtgaaaggggct	cagacacagtctatcttggg	647	60
8	ttcaggagagaggctgcattg	catcacccaacttcccctcc	343	62

(b) Direct sequence

PCR 産物 2 μ l、Forward または Reverse primer 1 μ l (20pmol/ μ l)、Big Dye mix (BigDye® terminator sequencing kit version 3.1, Life Technologies) 1 μ l と DDW 0.5 μ l を加え、総量 5 μ l に調整した。Gene Amp PCR System 9700 (Life technology)を使用し、96°Cで 1 分間反応後、96°Cで 10 秒、50°Cで 5 秒、60°Cで 4 分間を 25 サイクルで標識した。標識した PCR 産物を脱塩カラムで精製して、3730XL Sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)でシークエンスした。結果は、Sequence Scanner version 1.0 (Applied Biosystems, CA, USA)で変異を検出し、dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)で照合した。また、タンパク質構造変化から変異の影響を予測する Phenotyping v2 (PolyPhen-2) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、ホモロジーから変異の影響を解析する SIFT (<http://sift.jcvi.org>)、種間の保存性も解析する mutation t@sting (<http://www.mutationtaster.org>)で検出した変異のタンパク質機能の影響を検討し

た。疾患との関連が推定された変異は、対照群で塩基配列を確認した。

5)細胞へのプラスミド導入

pSUPER-RNAi-puro vector (OligoEngine, Seattle, WA) を用いて、マウス Nr1d1 遺伝子の発現を抑制することを目的とした。リガンド結合部位の複数箇所での効果を確認するために Nr1d1 RNAi 発現プラスミドを 3 種類 (pSUPER-mNr1d1#1、#2、#3)作成した(表 4、図 2)。mNr1d1RNAi の発現抑制の確認には、COS7 細胞に pCAG-Myc-mNr1d1 と共に、3 種類の Nr1d1 RNAi 発現プラスミド、コントロールとしての pSUPER-puro vector を導入し、抗 Myc 抗体による Western blot 法で Myc-mNr1d1 の発現を確認した。次に、オフターゲット効果の確認のため、58%の相同性を持つ Nr1d2 の発現を抑制しないことを確認するために、COS7 細胞に pSUPER-puro vector と 3 種類の Nr1d1 RNAi 発現プラスミドを導入し、Western blot 法で確認した。さらにレスキュー実験のため pSUPER-mNr1d1#1 の配列を用いて、アミノ酸変化をさせずに塩基のみを改編した RNAi resistant-Nr1d1 (Nr1d1-R)を作成した(表 4)。ASD 例(AU1098302)で検出された p.R500H 変異を組み込んだ変異体 Nr1d1-R500H も作成した。

プラスミド	塩基配列	部位
pSUPER-mNr1d1#1	5'-GGACCAGACAGTGATGTTC-3'	1477-1495
pSUPER-mNr1d1#2	5'-GGCAACACCAAGAATGTTC-3'	1229-1447
pSUPER-mNr1d1#3	5'-GTAGAGTTTGCCAAACACA-3'	1354-1372
RNAi-resistant Nr1d1	5'-GGAT <u>CA</u> AC <u>CGT</u> GATGTTC-3'	1477-1495

表 4 pSUPER-mNr1d1#1, #2, #3, -R の塩基配列と転写開始部位からの塩基番号

RNAi-resistant Nr1d1(Nr1d1-R)の改編した塩基は下線をしてある。

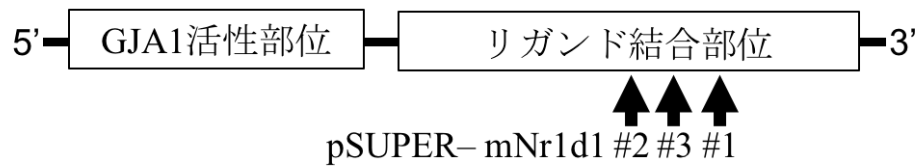


図2 Nr1d1 の構造とプラスミド作成部位

リガンドはヘム。Gap junction alpha-1 protein; GJA1

6) 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、Nr1d1 の発現を抑制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、Nr1d1 の siRNA および EGFP 発現プラスミドを、CUY21 electroporator (NEPA Gene, Chiba, Japan)を用いて 50ms、30V の電気パルスを 950ms 間隔、6 回で導入し、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、細胞形態の評価については生後 2 日に解析した (n=3)。神経細胞移動の経時的な変化は、胎生 16.5 日に解析した(n=3)。Nr1d1 における軸索伸長障害については、生後 2 日に冠状断で評価した(n=3)。樹状突起の形態評価は生後 7 日に確認した (n=22)。

3.結果

1) ASD 患者における aCGH 解析

ASD 44 例の解析結果、14 例(31.8%)に ASD と関連があると報告されている遺伝子を含む CNV を検出した(表 5)。14 例中 9 例が単一の候補遺伝子のみを含む CNV で、5 例が複数個の候補遺伝子を含む CNV であった。6 例が両親の検体を解析可能であった。*NRXN1* の欠失(Exon31 個中の Exon1 から 6 番目まで)の 1 例、*OR2T10* の重複の 1 例、*CLN8* の欠失の 1 例、*DLGAP2* の欠失の 1 例、*CSMD1* の欠失の 1 例は *de novo* の CNV であった。*CSMD1* の重複(Exon 73 個中の 1 から 5 番目まで)は父由来の CNV、*TOP3B* の重複の 1 例も父由来の CNV であった。未報告である *de novo* の欠失として *GPR52* と *RABGAP1L* を検出した。

機能別	症例数	遺伝子
クロマチンリモデリング	3	<i>BRD1</i> (欠失 1 例)、 <i>TOP3B</i> (重複 1 例、欠失 1 例)
シナプス	2	<i>NRXN1</i> (欠失 1 例)、 <i>DLGAP2</i> (欠失 1 例)
シグナル伝達	12	<i>OR2T10</i> (重複 2 例、欠失 8 例)、 <i>ANTXR1</i> (重複 1 例)
神経成長	5	<i>ROBO2</i> (重複 1 例)、 <i>CSMD1</i> (重複 3 例、欠失 1 例)
脂質代謝	1	<i>CLN8</i> (欠失 1 例)

表 5 CNV 中に含まれていた報告されている ASD の候補遺伝子

a) シグナル伝達に参与する遺伝子を含む領域の欠失例の aCGH 解析

ASD の 7 歳の男児で、1q25.1 に約 539kb の *de novo* の欠失を検出した (図 3)。欠失領域は、*GPR52* の全遺伝子と *RABGAP1L* の全 33Exon 中 Exon 2-18 を含んで

いた。*GPR52* は一つの Exon からなる遺伝子で、*RABGAP1L* のイントロンに局在していた。

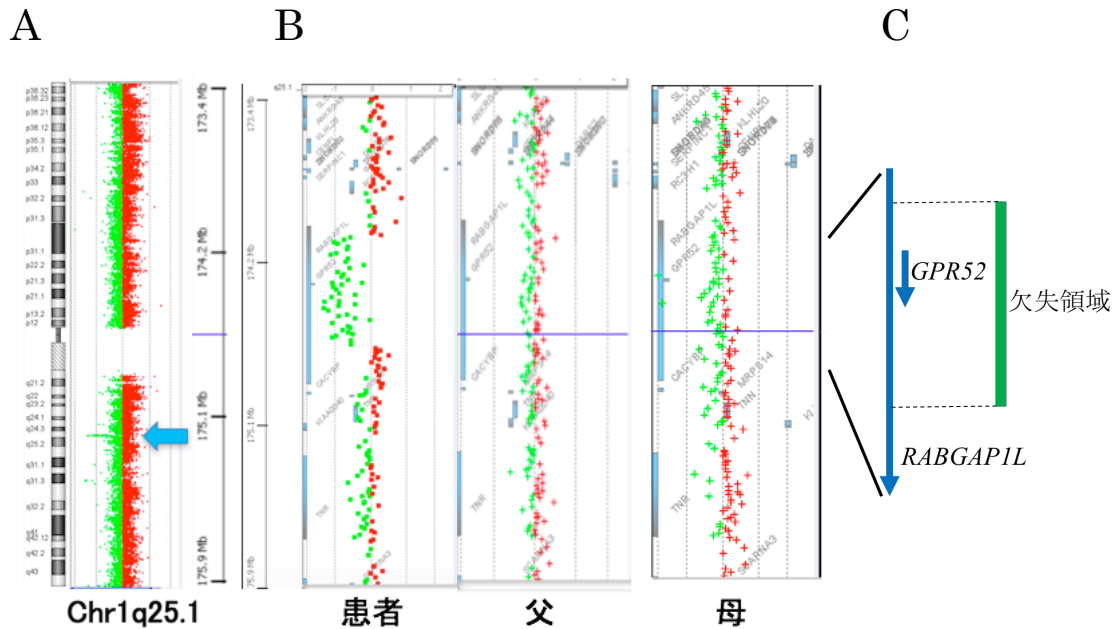


図 3 ASD 例における欠失

(A) 1 番染色体の全体の aCGH 結果。縦軸はセントロメア側からの遺伝子座を示し、横軸は fold change を示す。-1 はヘテロの欠失、+0.5 は 3 コピーの重複、+1 は 4 コピーの重複を示す。1q25.1 に約 539kb (174188339-174727329)の欠失があった。(B) 患者、父、母の欠失領域の拡大図。両親には欠失は無かった。(C) 遺伝子と欠失領域の拡大図。欠失領域には *GPR52* と *RABGAP1L* が局在していた。

b) *GPR52*、*RABGAP1L* 遺伝子の変異解析

aCGH で欠失が検出された 2 つの遺伝子について、他の ASD 患者での遺伝子変異の有無の評価をした。日本人 ASD 95 人、白人 ASD 121 人でシーケンス解析を行い、*RABGAP1L* に c.1424G>A (p.G475Q)を検出した(表 6)。これは、すでに報告されている変異であり、機能予測からもタンパク機能への影響も低いと考えられた。*GPR52* は日本人、白人検体とも、変異が検出されなかった。

遺伝子	塩基置換 (アミノ酸 置換)	人数		家系	コント	SNP	PolyPhen-2	Mutation	SIFT
		日本人	白人	解析	ロール	登録	解析	Taster 解析	解析
<i>RABGAP1L</i>	c.1424G>A (p.G475Q)	5/95	0/121	母由来 (1家系で 解析)	5/118	rs1422 60750	benign	disease causing	Tolerated
<i>GPR52</i>	-	0/95	0/121	-	-	-	-	-	-

表 6 シグナル伝達遺伝子(*GPR52*、*RABGAP1L*)のシーケンス結果2) ASD とサーカディアン関連遺伝子(*NR1D1*)a) ASD 患者における *NR1D1* 遺伝子の変異解析

日本人 ASD 87 人、白人 ASD 111 人にシーケンス解析を行い、c.58A>C (p.S20R)が日本人 1 例、c.1012C>T (p.P338S)が白人 2 例、c.1031A>C (p.N344T)が白人 1 例、c.1499G>A (p.R500H) が白人 1 例に検出された (表 7)。c.58A>C (p.S20R)変異は当教室から報告されている変異である[Yang, 2016]。白人の変異 c.1012C>T (p.P338S)、c.1031A>C (p.N344T)は 158 人の白人コントロールに変異はなかったが SNPs として報告されていた。c.1499G>A (p.R500H)は SNP 報告の無い変異であった。c.1499G>A (p.R500H)の機能予測では、PolyPhen-2 解析は Probably damaging、Mutation Taster 解析は Disease causing、SIFT 解析は Deleterious、と変異によるタンパク機能への強い影響が示唆された。それぞれの変異を家系内で確認した(図 4)。c.1499G>A (p.R500H)のみが *de novo* 変異で、他の変異は全て非罹患の親由来であった。c.1499G>A (p.R500H)を有する患者(II-2)は、8 歳男児で自閉症状があり、特徴的な話し方で会話は一方的で成り立たなかった。また強迫性障害があり、他に記憶力が大変優れていた。繰り返す常同行動は目立たず、睡眠障害もなかった。その患者の弟(II-3)は、6 歳男児で自閉症状があり、

さらに不安障害があった。兄と同様に睡眠障害はなかった。

塩基置換	アミノ酸 置換	人数		家系解析	コント ロール	SNP 登録	PolyPhen-2 解析	Mutation	
		日本人	白人					Taster 解析	SIFT 解析
c.58A>C	p.S20R	1/87	0/108	父由来	0/133	無し	Benign	Disease causing	Damaging
c.1012C>T	p.P338S	0/87	2/111	母由来 母由来	0/158	rs14368 2026	Benign	Polymor- phism	Tolerated
c.1031A>C	p.N344T	0/87	1/111	母由来	0/158	rs14543 5357	Benign	Disease causing	Tolerated
c.1499G>A	p.R500H	0/87	1/111	<i>De novo</i>	0/158	無し	Probably damaging	Disease causing	Deleterious

表 7 サーカディアン関連遺伝子(*NR1D1*) のシーケンス結果

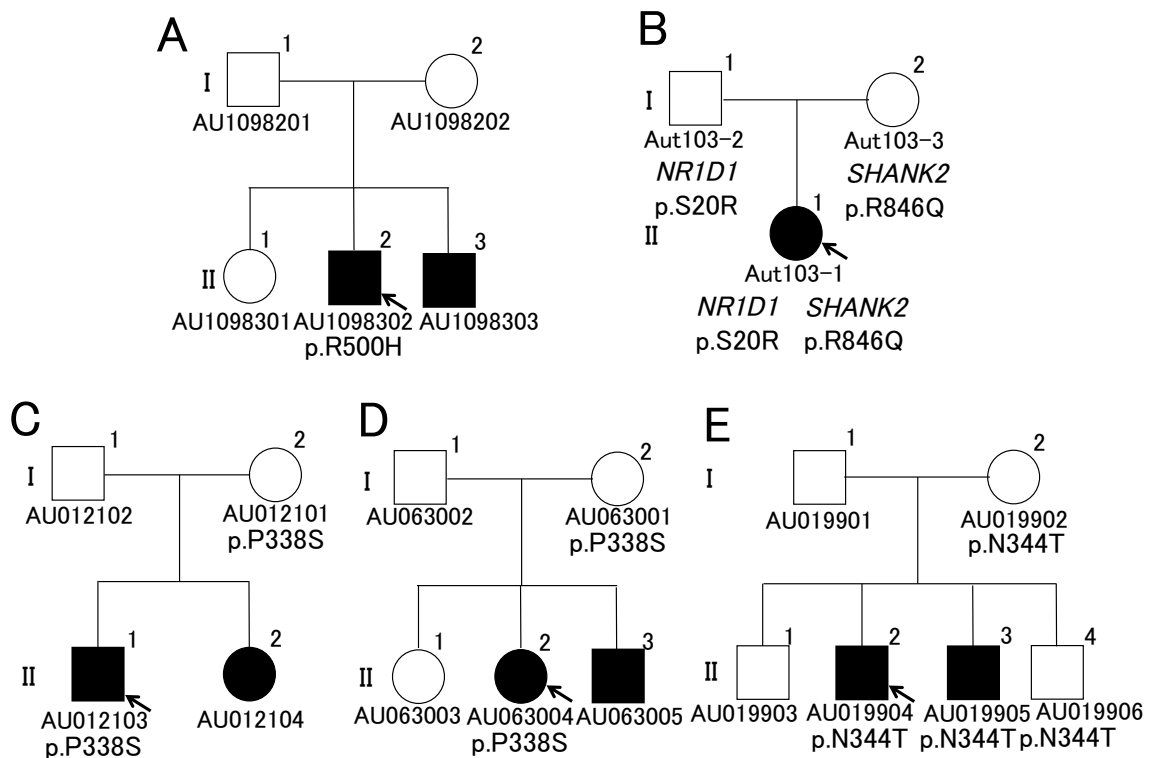


図 4. *NR1D1* において変異が同定された ASD 患者の家系解析

(A) c.1499G>A (p.R500H)は両親には無かったが、罹患者である弟にも同定されなかった。(B) c.58A>C (p.S20R)は父由来、他に母由来の

SHANK2 の c.2537G>A (p.R846Q): rs782015001 をもつ。(C)、(D) c.1012C>T (p.P338S)は母由来であった。罹患者の兄弟には変異は同定されなかった。(E) c.1031A>C (p.N344T)は母由来であった。罹患者の弟には変異は同定されたが、非罹患者の弟にも同変異は同定された。本研究において、上記の全ての家族構成員は *NR1D1* の全ての Exon を解析した。

b) mNr1d1RNAi の Nr1d1 発現抑制作用の確認

マウスの Nr1d1 に対する RNAi ベクター pSUPER-m Nr1d1#1、#2、#3 は COS7 細胞に導入した mNr1d1 の発現を抑制した(図 5A)。次に COS7 細胞に導入した相同性の高い Nr1d2 は、pSUPER-mNr1d1#1、#2 に抑制されなかったが、#3 で抑制されたため、pSUPER-mNr1d1#1 と#2 は Nr1d1 に特異性が高いと判断した(図 5B)。さらに pSUPER-mNr1d1#1 の RNAi 効果に抵抗する RNAi resistant-Nr1d1 (Nr1d1-R)は発現が抑制されないことを確認した(図 5C)。これより Nr1d1-R は pSUPER-mNr1d1#1 で発現を抑制した際のレスキュー実験に用いることとした。

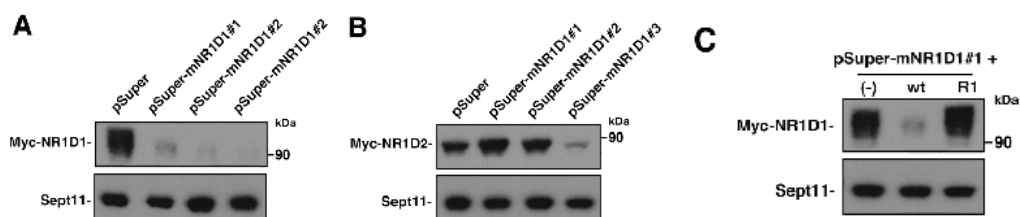


図 5 pSUPER-mNr1d1#1、#2、#3 の発現抑制の確認

Myc-mNr1d1(A)、Myc-mNr1d2(B)、Myc-mNr1d-R(C)をそれぞれ導入し、pSUPER、pSUPER-mNr1d1#1、#2、#3 による発現抑制の有無を確認した。Sept11 は内因性コントロールとした。

A. pSUPER-mNr1d1#1、#2、#3 は mNr1d1 の発現を抑制した。

B. pSUPER-mNr1d1#1、#2 は mNr1d2 の発現を抑制しなかったが、#3 は発現を抑制した。

C. (-)は Myc-Nr1d1 を導入していない。wt は Myc-Nr1d1 を導入している。

R1 は Nr1d1-R を導入している。pSUPER-mNr1d1#1 は R1(Nr1d1-R)の発現を抑制しなかった。

2c) Nr1d1 の発現解析

胎生 15 日から生後 8 日では、脳室下帯/脳室帯、皮質板での Nr1d1 の発現は、体性感覚野、海馬で乏しかった(図 6A-D)。生後 0 日と生後 8 日の体性感覚野の IV 層、海馬に多く Nr1d1 は発現していた。(図 6C 矢印, 6D)。

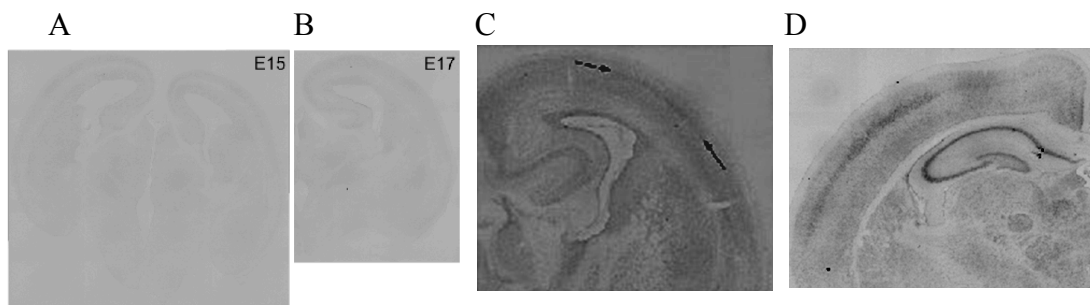


図 6 マウス胎児脳における Nr1d1 の *In situ* ハイブリダイゼーション (A) 胎生 15 日、(B) 胎生 17 日、(C) 生後 0 日(IV 層は矢印)、(D) 生後 8 日。

2d) Nr1d1 発現抑制による神経細胞の障害

2d-1) 大脳皮質における Nr1d1 発現抑制神経細胞の移動障害と細胞形態変化

機能抑制した Nr1d1 による神経細胞への影響を調べるために、子宮内胎児エレクトロポレーション法で mNr1d1RNAi を胎生 14.5 日マウス脳に導入して、Nr1d1 の発現を抑制した。その結果、コントロール例では神経細胞が大脳皮質第 II~III 層に局在していたのに対し(図 7a)、Nr1d1 の発現を抑制された神経細胞ではそれより下層以下に神経細胞が局在していた(図 7b, c)。次に、pSUPER-mNr1d1#1 と Nr1d1-R を共に導入すると、神経細胞の移動障害が改善し

た(7d)。ASD 例から検出された p.R500H 変異体(pCAG-Myc-Nr1d1-R500H)と、pSUPER-mNr1d1#1 を導入すると神経細胞の移動の障害は改善されなかった(7e)。コントロールでは通常の変極性細胞を確認できたが、Nr1d1 の発現が抑制された神経細胞は多極性細胞様に突起が残存している未熟な変極性細胞であった(7f)。

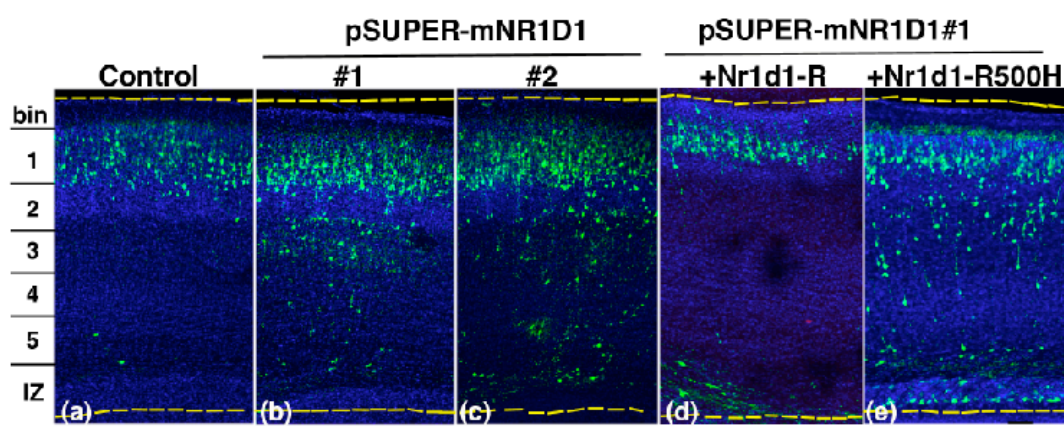


図 7. 大脳皮質における Nr1d1 発現抑制神経細胞の移動障害

大脳皮質の冠状断。移動神経細胞は anti-GFP(緑)、核は DAPI(青)。

bin1:大脳皮質 II-III 層、bin2-5:大脳皮質 IV-VI 層、IZ:中間帯

(a)胎生 14.5 に pSUPER ベクターが導入されたコントロール、(b) pSUPER-mNR1D1 #1 導入、(c) pSUPER-mNR1D1 #3 導入、(d)レスキューとしての pCAG-Myc-Nr1d1-R と pSUPER-mNR1D1#1 を導入、(e) 変異体 pCAG-Myc -Nr1d1-R500H と pSUPER-mNR1D1#1 を導入。

pSuper-Nr1d1#1、#3 では神経細胞の移動障害があった。pSuper- Nr1d1#1 に pCAG-Myc-Nr1d1-R を導入すると障害は改善したが(d)、pCAG-Myc -Nr1d1-R500H を導入すると改善されなかった (e)。

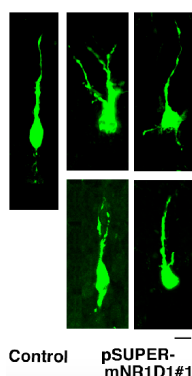


図 7f Nr1d1 の発現が抑制された神経細胞の形態

Nr1d1 の発現が抑制されていない Control は通常の変極性細胞。発現が抑制された神経細胞は多極性細胞様に突起が残存。

2d-2) Nr1d1 発現抑制神経細胞の移動における経時的観察

2d-1)において移動が障害された神経細胞を経時的に確認した。Nr1d1 の発現を抑制された細胞は、初期には形態の変化は無いが経時的な変化で形態の異常が観察されるようになった。神経細胞の移動の様式は、コントロールは放射状に移動していくが、発現を抑制された神経細胞は側方性、逆行性、ランダムに移動するなど様々な挙動を示し、結果的に移動速度も遅くなった。

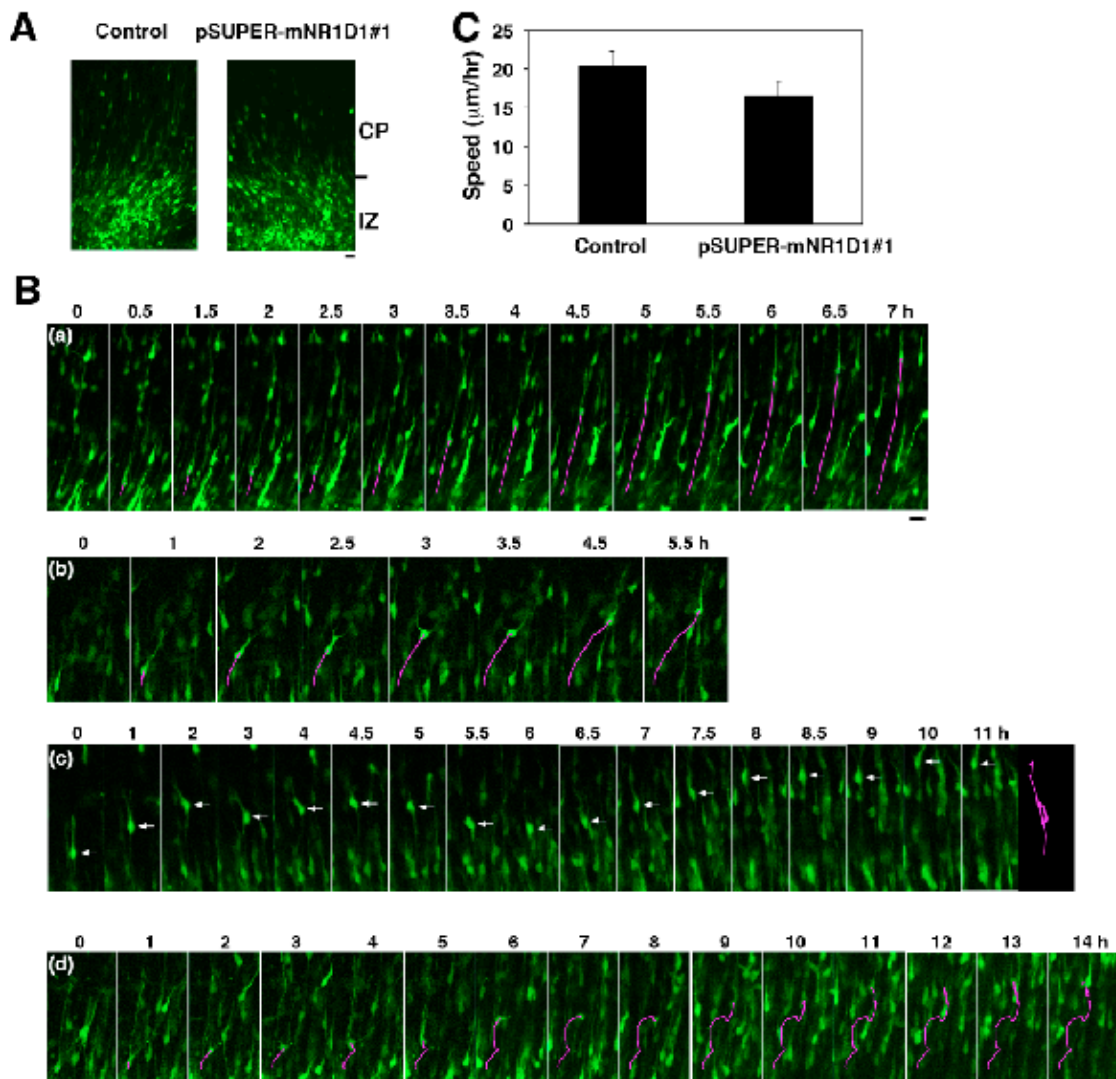


図 8 Nr1d1 発現抑制神経細胞の移動における経時的観察

胎生 14.5 日に pCAG-EGFP で標識した pSUPER control vector or pSUPER-mNr1d1#1 を導入し胎生 16.5 日に共焦点顕微鏡で解析。(A) 中間帯や皮質板との境界付近の初期では、変異が入った細胞も通常の細胞と類似で多極性、双極性の形態を示した。(B) (a)はコントロールで放射状（法線方向）に移動した。(b),(c),(d)は Nr1d1 の発現を抑制した神経細胞で(b)は側方性の動き、(c)は一旦逆方向への動き、(d)はランダムな動きを示した。挙動の軌跡は赤色でトレースした。(C) 移動速度。発現抑制された細胞の方が正常コントロールに比べて遅かった。Bar は 20 μ m を示す。

2d-3) Nr1d1 発現抑制神経細胞における軸索の伸長障害

Nr1d1 の軸索伸長に対する影響を調べるために、胎生 14.5 日に pSUPER-mNr1d1#1 を用い Nr1d1 の発現を抑制した脳室帯の神経細胞において、脳梁を通過して対側への軸索の伸長を生後 2 日で観察した。発現抑制した軸索の脳梁を通り対側半球への伸長の評価では、対側へ出た後の軸索の density は低く、伸長障害がみられコントロールと比べ短縮していた(図 9A(b), 14B)。Nr1d1-R の導入により、軸索の伸長障害は改善した(図 9A(c), 14B)。

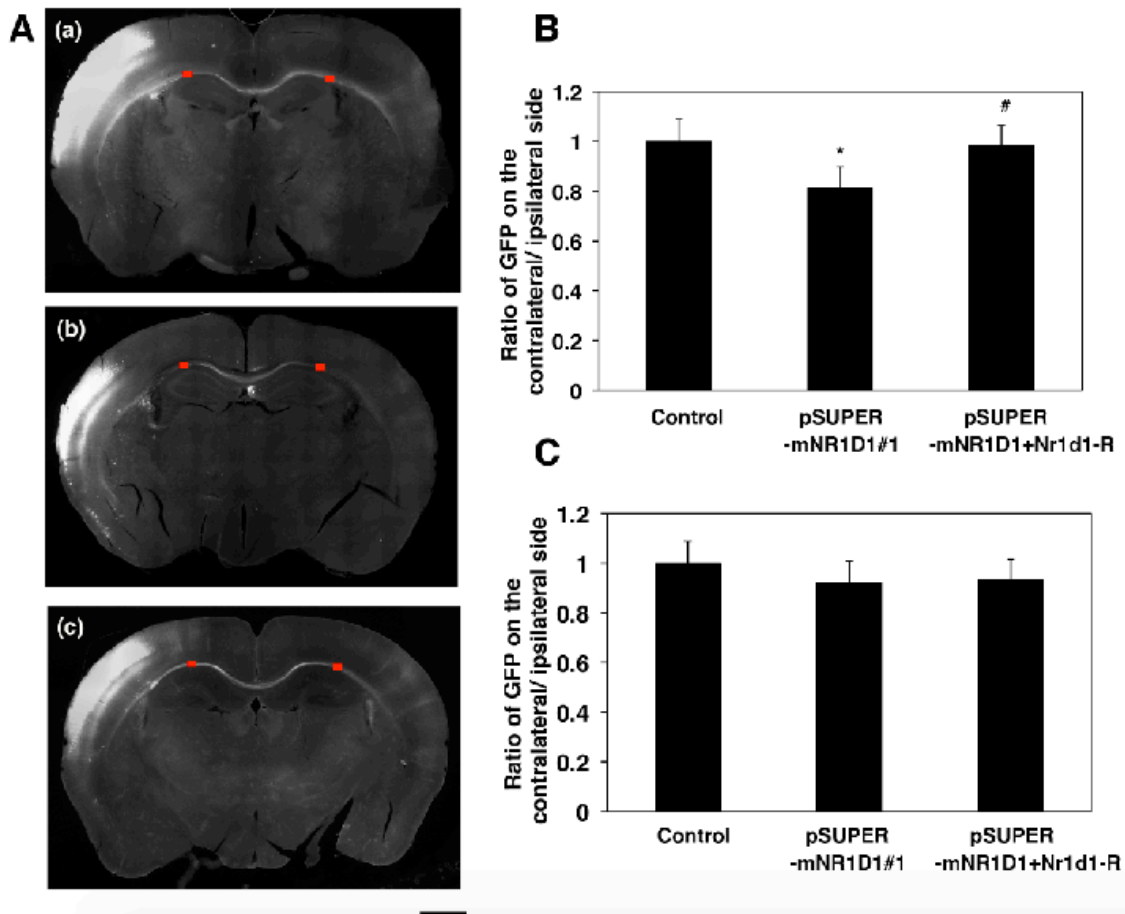


図 9. Nr1d1 欠失による軸索の伸長障害

(A) 生後 2 日での評価。下の Bar は 500 μ m を示す。(a) control pSUPER vector (b) pSUPER-mNr1d1#1 で発現を抑制。(c) pSUPER-mNr1D1#1 + pCAG-Myc-Nr1d1-R を導入。(B) 胎生 2 日での定量化。同側の軸索から対側の軸索までの比を示す。pSUPER-mNr1d1#1 では、約 0.8 を示した ($p<0.05$)。pSUPER-mNr1D1#1 + pCAG-Myc-Nr1d1-R を導入したものではほぼ 1 に改善した($n=3$)。(C) 胎生 10 日での定量化。B と同様に評価するも、それぞれに有意な差はなかった($n=3$)。

2d-4) Nr1d1 発現抑制神経細胞における樹状突起の形態評価

Nr1d1 の樹状突起の形態に対する影響を調べるために、胎生 14.5 日に mNr1d1#1 を導入した結果、生後 7 日では樹状突起の発育が阻害されていた (図 10Aa, Ab)。コントロールに比べて樹状突起の枝分かれの数が少なく、突起が短

かった (図 10B, C)。しかし Nr1d1-R の導入で、それらの障害は改善された(図 10Ac, B, C)。これらより Nr1d1 は樹状突起の発育と維持に関与しているため、この機能が低下することで軸索伸長への影響も併せて神経細胞間の結びつきが障害される。

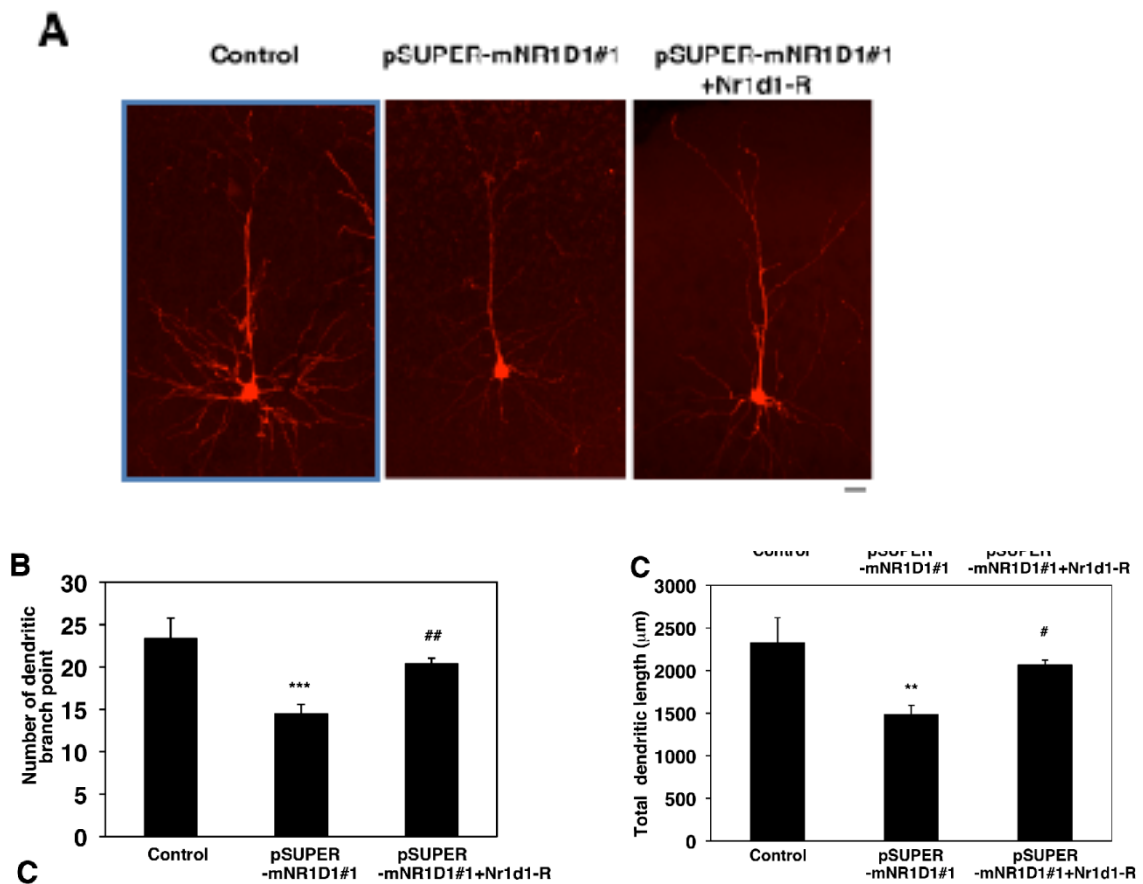


図 10. Nr1d1 における樹状突起の形態評価

(A)胎生 14.5 日で遺伝子導入し生後 7 日で確認。線は 50μm を示す。(B) 樹状突起の枝別れの数。(C) 樹状突起の長さ。Control (n=12), pSUPER-mNR1D1#1 (n=22), pSUPER-mNR1D1#1 + pCAG-Myc-Nr1d1-R (n=20)

4. 考察

本研究において、ASD の候補遺伝子を含む複数の CNV が検出された。14 例 (31.8%) の CNV に ASD の候補となる遺伝子が含まれており、ASD 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 [Sebat, 2007; Marshall, 2008]。また、これらの遺伝子はシナプス、クロマチンリモデリング、シグナル伝達関連など、ASD の原因とされているものが多かった。シナプス関連遺伝子の *NRXN1* や *SHANK3* は、遺伝子変異や欠失でも ASD の原因として報告されている。よって今回 aCGH で欠失領域に含まれていた候補遺伝子群は遺伝子変異でも ASD の病因となりうる可能性があるため、他の ASD 群での遺伝子変異の確認をした。

4.1 ASD と欠失領域に局在する *GPR52*, *RABGAP1L* の解析

ASD 例の 1 番染色体長腕 1q25.1(174188339-174727329) の *GPR52*, *RABGAP1L* の一部を含む領域に *de novo* の欠失があった。それぞれの遺伝子の変異解析を行い、*RABGAP1L* のみに、p.G475Q を日本人 ASD 患者 95 例中 5 例 (5.3%) に検出したが、白人 ASD 患者 121 例には検出されなかった。しかし日本人コントロール 118 例中 5 例 (4.2%) にも検出したため日本人特有の多型の可能性がある。この領域を DECIPHER GRCh37 v9.12 (<https://decipher.sanger.ac.uk/index>) で確認したところ、この領域を含んだ欠失は 170kb から 28Mb の範囲で 22 例の報告があった。症状の内訳は何らかの奇形を伴った知的障害が 11 例、奇形を伴わない知的障害が 7 例、詳細不明が 4 例であった。本症例と同様の欠失領域は 9 例あり、知的障害が 6 例、何らかの奇形を伴うのが 3 例であった。これらの報告の詳細な臨

床症状は不明であるが発達の遅れとされているなかに ASD が含まれている可能性もあり、この領域の欠失と ASD との関連は否定できない。さらに症例を増やし解析する必要がある。

GPR52 (G protein-coupled receptor 52) (OMIM*604106)は G タンパク質共役受容体(GPCR)として、ドパミン D1 受容体が多い内側前頭前皮質よりも、ドパミン D2 受容体と共に線条体(尾状核、被殻)に多く発現している[Komatsu, 2014]。*RABGAP1L* (RAB GTPase activating protein 1 like) (OMIM*609238)は、Rab 特異的 GTP アーゼ活性蛋白の Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) ドメイン含有 Rab ファミリーに属しており[Fukuda, 2011]、GTP アーゼの活性を制御している[Qu, 2016]。*GPR52* は *RABGAP1L* のイントロン内に位置し、シグナル伝達として相互に連動している[Yao, 2015]。他の GPCR ファミリーにおいては、ASD 症例で *GPR37* [Fujita-Jimbo, 2012]、*GPR139* [O'Roak, 2011]に変異が同定されている。また *GPR85* を過剰発現させたマウスでは社会性の低下、記憶障害などの行動異常をきたし[Matsumoto, 2008]、*GPR85* 変異を導入したマウスの神経細胞は樹状突起の形態異常を起こすなど[Fujita-Jimbo, 2015]、GPCR ファミリーは ASD と関連がある可能性が高い。

これまで *GPR52* は人や動物での ASD に関する報告は無いが、統合失調症に対する創薬の候補遺伝子の一つとされている[Komatsu, 2015]。*GPR52* ノックアウトマウスは、open field test では中心付近に長くとどまるなど不安を表す行動を示し、そのノックアウトマウスに NMDA 受容体アンタゴニスト(MK-801) [Popoli, 1997]を投与後の Prepulse inhibition test で驚愕反応がより鋭敏になった。これにより *GPR52* がドパミン受容体のシグナル伝達だけでなく NMDA 受容体

のシグナル伝達にも関与していることが示された[Komatsu, 2014]。NMDA 受容体の機能低下は統合失調症の病態の一因と考えられている[Lindsley, 2006]。統合失調症と ASD は、他集団より両者の合併が多いこと、*NRXN1*、*CNTNAP2* などの感受性遺伝子、1q21.1、15q13.3、22q11.2 などの関連のある遺伝子座が共通すること、早産、低出生体重、新生児仮死、妊娠糖尿病などの周産期異常の環境要因、MRI 画像では辺縁系線条体視床回路の容量の減少、機能画像では内側前頭皮質の血流の低下、PET を用いてのドパミン動態の異常、など共通の所見が得られることから、共通の病態、分子基盤が推測されている[Penzes, 2011; Chisholm, 2015]。最近、経口の GPR52 アゴニスト [3-[2-(3-Chloro-5-fluorobenzyl)-1-benzothiophen-7-yl]

-N-(2-methoxyethyl)benzamide]がメタンフェタミンに誘導された統合失調症のモデルマウスの過活動状態を顕著に改善させると報告された[Setoh, 2014]。一方、シナプス足場タンパクである *Shank3* 抑制マウスモデルではドパミンが低下し社会的嗜好を含む行動障害を示し[Bariselli, 2016]、シナプス関連の *PTEN* とチロシンヒドロキシラーゼの経路がドパミンシグナルに関与[He, 2015]、ASD 例でドパミントランスポーターである *SLC6A3* に変異が同定[Hamilton, 2013; Bowton, 2014]、ドパミン受容体遺伝子の *DRD1*, 2, 3 から新規変異や多型が同定されるなど[de Krom, 2008; Hettinger, 2008, 2012]、ドパミンシグナル伝達と ASD の関連が推測されている。これまで、ASD と神経伝達物質との関連性は、セロトニン系の解析と報告が主体であった[Lam, 2006]。*GPR52* の機能不全が ASD の原因の一つである可能性があれば、ドパミン作動薬の機序からも ASD に対しての創薬の選択肢になる可能性がある。また、NMDA 受容体遺伝子の *GRIN1*, *GRIN2A*,

GRIN2B は ASD と関連の強い候補遺伝子とされており、多くの報告がある [Bamby, 2005; O’Roak, 2011; Gandal, 2012]。これらから *GPR52* はドパミン受容体、NMDA 受容体のシグナル伝達に関与しており、ASD においても有力な候補遺伝子と考えられる。現段階では ASD 患者からの変異は同定されていないが、今後さらに例数を増やして変異解析をしていく方針である。

4.2. ASD とサーカディアン関連遺伝子の *NR1D1* について

本研究において、遺伝学的な解析で ASD 患者から *polyphen2* などの機能予測による機能喪失変異が検出されたことと、*NR1D1* の発現抑制により、神経細胞の移動障害と細胞形態の変化、軸索や樹状突起の伸長障害と形態の変化をもたらしたことから、*NR1D1* は神経細胞の発達に関与し、ASD 発症に影響を与える遺伝子の一つであることが推定された。*Nr1d1* はマウス脳の発達段階で、Rho GTPase 活性化タンパク質である *Oligophrenin 1 (Ophn1)* と相互に連動して、間接的に樹状細胞や樹状突起の構造維持に関与している [Govek, 2004; Valnegri, 2011]。*Ophn1* は ID の病因として同定されており [Zanni, 2005]、*actin* 骨格形成制御等によりシナプス形成・可塑性に関与し、AMPA 受容体を介したシグナル伝達にも関与していることが示されている蛋白である [Ba, 2013]。また ASD 例でも *OPHN1* に新規変異が同定されている [Piton, 2011]。よって *Nr1d1* の機能低下は *Ophn1* の機能低下も誘導し、シナプス形成の低下を起こし、ASD や ID のような神経発達障害の病因となっている可能性が考えられる。

今回、ASD 患者での変異解析において c.1499G>A (p.R500H) を検出した。この変異は *in silico* でもタンパク機能への強い影響が推測され、リガンド結合領域に

あることからタンパクの立体構造を変化させ転写活性、遺伝子発現に影響を与え、症状発現に寄与している可能性がある。一方、家系解析において、c.1499G>A (p.R500H)が同定された ASD 患者(II-2)の弟(II-3)も ASD 罹患者であるが、変異解析の結果 c.1499G>A も含めて *NR1D1* の全てのエクソンにおいても変異は検出されなかった。随伴症状は、p.R500H を持つ患者(II-2)が強迫性障害、その弟(II-3)が不安障害と異なるが、ASD の原因は多彩であることから、弟(II-3)は他の原因遺伝子による影響が考えられる。最近の報告で、ASD の兄弟をもつ両親を含めた 85 家族のエクソーム解析では、69.4%が兄弟間で異なる変異を有し、変異が一致しない兄弟は共通変異を持つ兄弟に比べて臨床症状の多様性が大きい傾向であったことから、ASD には同一家系内でも、遺伝的異質性があることが報告されている[Yuen, 2015]。

胎児マウス脳において *Nr1d1* 発現を抑制した大脳の観察で、神経細胞の移動障害が確認された。大脳皮質の発達において、興奮性錐体細胞の移動は脳室帯で発生した後、中間帯の低い位置で多極性形態を示し、神経極性や、軸索形成などに神経分化し、双極性(移動)神経細胞を経て、最終的に辺縁帯で移動を完了する[Nishimura, 2010]。神経細胞の移動障害は、ASD 例の剖検脳 [Wegiel, 2010] や統合失調症のモデルマウス[Muraki, 2015]でも報告されている。変異導入した *Nr1d1*-R500H では神経細胞移動障害を回復できなかったことから、この変異が機能喪失か優性阻害などの機序で *NR1D1* 活性を抑制し、本症例の ASD 症状に影響を与えていると考えられる。さらに、*Nr1d1* の発現抑制により軸索や樹状突起の伸長障害も確認され、ASD の病因であるシナプス形成、神経ネットワーク形成の異常をもたらす[Ziats, 2015]、ASD の病因となっている可能性が考えられ

た。*NR1D1* はサーカディアンリズムでは *CLOCK* や *ARNTL* の転写調節をしているが、それらの遺伝子以外にも、神経発生、シナプス形成に関与している遺伝子の発現も調節している可能性がある。それらの関連する遺伝子の同定、さらに *NR1D1* をはじめとしたサーカディアン関連遺伝子の *ASD* とシナプスに関連した作用と病態解明が必要である。

5. まとめ

ASD44 例に対して CGH を行い、14 例(31.8%)から検出した CNV において ASD の候補となる遺伝子に注目し、またサーカディアン関連遺伝子 *NR1D1* の変異解析、各種機能解析をした。

シグナル伝達遺伝子を含む領域の欠失に伴う ASD 例では、1q25.1 に *de novo* で欠失があり、その領域には *GPR52*, *RABGAP1L* が局在していた。変異解析では変異は検出されていないが、*GPR52* はドパミン受容体、NMDA 受容体のシグナル伝達に関与しており、ASD に関連のある遺伝子と考えられる。

ASD 患者に同定されたサーカディアン関連遺伝子の *NR1D1* 遺伝子の解析では、マウスの胎児脳で *Nr1d1* の発現を抑制すると、神経細胞の移動障害、神経細胞の形態変化、軸索や樹状突起の伸長障害、形態変化が確認された。これらの結果から *NR1D1* は神経細胞の発達に関与していることが示唆され、変異 p.R500H の解析からも ASD 発症に影響を与える遺伝子の一つであると考えられた。

ASD の病因の一つであるシグナル伝達に関する遺伝子を抽出し、さらにサーカディアン関連遺伝子群も新たな候補遺伝子となりうることを示した。今後もシナプスやシグナル伝達関連に加えて、サーカディアン関連遺伝子も候補に ASD の病態を解明していく。

6. 参考文献

- American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V). 5th edition. Arlington: American Psychiatric Association; 2013.
- Anney R, Klei L, Pinto D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Sykes N, Pagnamenta AT, Almeida J, Bacchelli E, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chu SH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, 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 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, Melhem NM, 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, Piven J, 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, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, 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, Wing K, Wittemeyer K, Wood S, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Betancur C, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI Jr, Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Scherer SW, Sutcliffe JS, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Devlin B, Ennis S, Hallmayer J. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet* 2010;19:4072-82.
- Auranen M, Vanhala R, Varilo T, Ayers K, Kempas E, Ylisaukko-Oja T, Sinsheimer JS, Peltonen L, Järvelä I. A genomewide screen for autism-spectrum disorders: evidence for a major susceptibility locus on chromosome 3q25-27. *Am J Hum Genet* 2002;71:777-90.
- Ba W, van der Raadt J, Nadif Kasri N. Rho GTPase signaling at the synapse: implications for intellectual disability. *Exp Cell Res* 2013;319:2368-74.

- Bariselli S, Tzanoulinou S, Glangetas C, Prévost-Solié C, Pucci L, Viguié J, Bezzi P, O'Connor EC, Georges F, Lüscher C, Bellone C. SHANK3 controls maturation of social reward circuits in the VTA. *Nat Neurosci* 2016;19:926-34.
- Barnby G, Abbott A, Sykes N, Morris A, Weeks DE, Mott R, Lamb J, Bailey AJ, Monaco AP; International Molecular Genetics Study of Autism Consortium. Candidate-gene screening and association analysis at the autism-susceptibility locus on chromosome 16p: evidence of association at GRIN2A and ABAT. *Am J Hum Genet* 2005;76:950-66.
- Baxter AJ, Brugha TS, Erskine HE, Scheurer RW, Vos T, Scott JG. The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders. *Psychol Med* 2015;45:601.
- 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.
- Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* 2011;1380:42-77.
- Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci* 2015;16:551-63.
- Bowton E, Saunders C, Reddy IA, Campbell NG, Hamilton PJ, Henry LK, Coon H, Sakrikar D, Veenstra-VanderWeele JM, Blakely RD, Sutcliffe J, Matthies HJ, Erreger K, Galli A. SLC6A3 coding variant Ala559Val found in two autism probands alters dopamine transporter function and trafficking. *Transl Psychiatry* 2014;4:e464.
- Carreira IM, Ferreira SI, Matoso E, Pires LM, Ferrão J, Jardim A, Mascarenhas A, Pinto M, Lavoura N, Pais C, Paiva P, Simões L, Caramelo F, Ramos L, Venâncio M, Ramos F, Beleza A, Sá J, Saraiva J, de Melo JB. Copy number variants prioritization after array-CGH analysis - a cohort of 1000 patients. *Mol Cytogenet* 2015;8:103.
- Celestino-Soper PB, Shaw CA, Sanders SJ, Li J, Murtha MT, Ercan-Sencicek AG, Davis L, Thomson S, Gambin T, Chinault AC, Ou Z, German JR, Milosavljevic A, Sutcliffe JS, Cook EH Jr, Stankiewicz P, State MW, Beaudet AL. Use of array CGH to detect exonic copy number variants throughout the genome in autism families detects a novel deletion in TMLHE. *Hum Mol Genet* 2011;20:4360-70.
- Chaste P, Clement N, Mercati O, Guillaume JL, Delorme R, Botros HG, Pagan C, Périvier S, Scheid I, Nygren G, Anckarsäter H, Rastam M, Ståhlberg O, Gillberg C, Serrano E, Lemièrre N, Launay JM, Mouren-Simeoni MC, Leboyer M, Gillberg C, Jockers R, Bourgeron T. Identification of pathway-biased and deleterious melatonin

- receptor mutants in autism spectrum disorders and in the general population. *PLoS One* 2010;5:e11495.
- Chisholm K, Lin A, Abu-Akel A, Wood SJ. The association between autism and schizophrenia spectrum disorders: A review of eight alternate models of co-occurrence. *Neurosci Biobehav Rev* 2015;55:173-83.
- Christensen DL, Baio J, Braun KV, Bilder D, Charles J, Constantino JN, Daniels J, Durkin MS, Fitzgerald RT, Kurzius-Spencer M, Lee LC, Pettygrove S, Robinson C, Schulz E, Wells C, Wingate MS, Zahorodny W, Yeargin-Allsopp M; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ* 2016;65,1-23.
- Crumbley C, Wang Y, Kojetin DJ, Burris TP. Characterization of the core mammalian clock component, NPAS2, as a REV-ERB α /ROR α target gene. *J Biol Chem* 2010;285:35386-92.
- Crumbley C, Burris TP. Direct regulation of CLOCK expression by REV-ERB. *PLoS One* 2011;6:e17290.
- Danielsson S, Gillberg IC, Billstedt E, Gillberg C, Olsson I. Epilepsy in young adults with autism: a prospective population-based follow-up study of 120 individuals diagnosed in childhood. *Epilepsia* 2005;46:918-23.
- de Krom M, Staal WG, Ophoff RA, Hendriks J, Buitelaar J, Franke B, de Jonge MV, Bolton P, Collier D, Curran S, van Engeland H, van Ree JM. A common variant in DRD3 receptor is associated with autism spectrum disorder. *Biol Psychiatry* 2009;65:625-30.
- De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Cicek AE, Kou Y, Liu L, Fromer M, Walker S, Singh T, Klei L, Kosmicki J, Shih-Chen F, Aleksic B, Biscaldi M, Bolton PF, Brownfeld JM, Cai J, Campbell NG, Carracedo A, Chahrour MH, Chiocchetti AG, Coon H, Crawford EL, Curran SR, Dawson G, Duketis E, Fernandez BA, Gallagher L, Geller E, Guter SJ, Hill RS, Ionita-Laza J, Jimenez Gonzalez P, Kilpinen H, Klauck SM, Klevzon A, Lee I, Lei I, Lei J, Lehtimäki T, Lin CF, Ma'ayan A, Marshall CR, McInnes AL, Neale B, Owen MJ, Ozaki N, Parellada M, Parr JR, Purcell S, Puura K, Rajagopalan D, Rehnström K, Reichenberg A, Sabo A, Sachse M, Sanders SJ, Schafer C, Schulte-Rüther M, Skuse D, Stevens C, Szatmari P, Tammimies K, Valladares O, Voran A, Li-San W, Weiss LA, Willsey AJ, Yu TW, Yuen RK; DDD Study; Homozygosity Mapping Collaborative for Autism; UK10K Consortium, Cook EH, Freitag CM, Gill M, Hultman CM, Lehner T, Palotie

- A, Schellenberg GD, Sklar P, State MW, Sutcliffe JS, Walsh CA, Scherer SW, Zwick ME, Barrett JC, Cutler DJ, Roeder K, Devlin B, Daly MJ, Buxbaum JD. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 2014;515:209-15.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 2007;39:25-7.
- Eapen V. Genetic basis of autism: is there a way forward? *Curr Opin Psychiatry* 2011;24:226-36.
- Feng J, Schroer R, Yan J, Song W, Yang C, Bockholt A, Cook EH Jr, Skinner C, Schwartz CE, Sommer SS. High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism. *Neurosci Lett* 2006;409:10-3.
- Folstein SE, Rosen-Sheidley B. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet* 2001;2:943-55.
- Freitag CM. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry* 2007;12:2-22.
- Fukuda M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Bioscience Reports* 2011;31:159-68.
- 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.
- Fujita-Jimbo E, Tanabe Y, Yu Z, Kojima K, Mori M, Li H, Iwamoto S, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T. The association of GPR85 with PSD-95-neurologin complex and autism spectrum disorder: a molecular analysis. *Mol Autism* 2015;6:17.
- Gilman SR, Iossifov I, Levy D, Ronemus M, Wigler M, Vitkup D. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. *Neuron* 2011;70:898-907.
- Govek, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L. The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 2004;7:364-72.
- Hamilton PJ, Campbell NG, Sharma S, Erreger K, Herborg Hansen F, Saunders C, Belovich AN; NIH ARRA Autism Sequencing Consortium, Sahai MA, Cook EH, Gether U, McHaourab HS, Matthies HJ, Sutcliffe JS, Galli A. De novo mutation in the dopamine transporter gene associates dopamine dysfunction with autism

- spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 2013;18:1315-23.
- He X, Thacker S, Romigh T, Yu Q, Frazier TW Jr, Eng C. Cytoplasm-predominant Pten associates with increased region-specific brain tyrosine hydroxylase and dopamine D2 receptors in mouse model with autistic traits. *Mol Autism* 2015;6:63.
- Hettinger JA, Liu X, Schwartz CE, Michaelis RC, Holden JJ. A DRD1 haplotype is associated with risk for autism spectrum disorders in male-only affected sib-pair families. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008;147B:628-36.
- Hettinger JA, Liu X, Hudson ML, Lee A, Cohen IL, Michaelis RC, Schwartz CE, Lewis SM, Holden JJ. DRD2 and PPP1R1B (DARPP-32) polymorphisms independently confer increased risk for autism spectrum disorders and additively predict affected status in male-only affected sib-pair families. *Behav Brain Funct* 2012;8:19.
- Huang W, Ramsey KM, Marcheva B, Bass J. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 2011;121:2133-41.
- Hughes JR, Melyn M. EEG and seizures in autistic children and adolescents: further findings with therapeutic implications. *Clin EEG Neurosci* 2005;36:15-20.
- Huguet G, Ey E, Bourgeron T. The genetic landscapes of autism spectrum disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013;14:191-213.
- Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, Stessman HA, Witherspoon KT, Vives L, Patterson KE, Smith JD, Paeper B, Nickerson DA, Dea J, Dong S, Gonzalez LE, Mandell JD, Mane SM, Murtha MT, Sullivan CA, Walker MF, Waqar Z, Wei L, Willsey AJ, Yamrom B, Lee YH, Grabowska E, Dalkic E, Wang Z, Marks S, Andrews P, Leotta A, Kendall J, Hakker I, Rosenbaum J, Ma B, Rodgers L, Troge J, Narzisi G, Yoon S, Schatz MC, Ye K, McCombie WR, Shendure J, Eichler EE, State MW, Wigler M. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 2014;515:216-21.
- Jager J, O’Brien WT, Manlove J, Krizman EN, Fang B, Gerhart-Hines Z, Robinson MB, Klein PS, Lazar MA. Behavioral changes and dopaminergic dysregulation in mice lacking the nuclear receptor Rev-erba. *Mol Endocrinol* 2014;28:490-8.
- Jamains S, Quach H, Betancur C, Råstam M, Colineaux C, Gillberg IC, Soderstrom H, Giros B, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T; Paris Autism Research International Sibpair Study. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 2003;34:27-9.
- Jonsson L, Ljunggren E, Bremer A, Pedersen C, Landén M, Thuresson K, Giacobini M, Melke J. Mutation screening of melatonin-related genes in patients with autism spectrum disorders. *BMC Med Genomics* 2010;3:10.

- Komatsu H. Novel Therapeutic GPCRs for Psychiatric Disorders. *Int J Mol Sci* 2015;16:14109-21.
- Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS, Ozonoff S, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediatrics* 2012;129:e1121-8.
- Lam KS, Aman MG, Arnold LE. Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. *Res Dev Disabil* 2006;27:254-89.
- Lemke JR, Geider K, Helbig KL, Heyne HO, Schütz H, Hentschel J, Courage C, Depienne C, Nava C, Heron D, Møller RS, Hjalgrim H, Lal D, Neubauer BA, Nürnberg P, Thiele H, Kurlemann G, Arnold GL, Bhambhani V, Bartholdi D, Pedurupillay CR, Misceo D, Frengen E, Strømme P, Dlugos DJ, Doherty ES, Bijlsma EK, Ruivenkamp CA, Hoffer MJ, Goldstein A, Rajan DS, Narayanan V, Ramsey K, Belnap N, Schrauwen I, Richholt R, Koeleman BP, Sá J, Mendonça C, de Kovel CG, Weckhuysen S, Hardies K, De Jonghe P, De Meirleir L, Milh M, Badens C, Lebrun M, Busa T, Francannet C, Piton A, Riesch E, Biskup S, Vogt H, Dorn T, Helbig I, Michaud JL, Laube B, Syrbe S. Delineating the GRIN1 phenotypic spectrum: A distinct genetic NMDA receptor encephalopathy. *Neurology* 2016;86:2171-8.
- Lindsley CW, Shipe WD, Wolkenberg SE, Theberge CR, Williams DL Jr, Sur C, Kinney GG. Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr Top Med Chem* 2006;6:771-85.
- Luedi PP, Dietrich FS, Weidman JR, Bosko JM, Jirtle RL, Hartemink AJ. Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res* 2007;17:1723-30.
- Malhotra D, Sebat J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 2012;148:1223-41.
- Marshall CR, Noor A, Vincent JB, Lionel AC, Feuk L, Skaug J, Shago M, Moessner R, Pinto D, Ren Y, Thiruvahindrapduram B, Fiebig A, Schreiber S, Friedman J, Ketelaars CE, Vos YJ, Ficicioglu C, Kirkpatrick S, Nicolson R, Sloman L, Summers A, Gibbons CA, Teebi A, Chitayat D, Weksberg R, Thompson A, Vardy C, Crosbie V, Luscombe S, Baatjes R, Zwaigenbaum L, Roberts W, Fernandez B, Szatmari P, Scherer SW. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 2008;82:477-88.
- Martínez-Cerdeño V. Dendrite and spine modifications in autism and related neurodevelopmental disorders in patients and animal models. *Dev Neurobiol* 2016;8.

- Matsumoto M, Straub RE, Marenco S, Nicodemus KK, Matsumoto S, Fujikawa A, Miyoshi S, Shobo M, Takahashi S, Yarimizu J, Yuri M, Hiramoto M, Morita S, Yokota H, Sasayama T, Terai K, Yoshino M, Miyake A, Callicott JH, Egan MF, Meyer-Lindenberg A, Kempf L, Honea R, Vakkalanka RK, Takasaki J, Kamohara M, Soga T, Hiyama H, Ishii H, Matsuo A, Nishimura S, Matsuoka N, Kobori M, Matsushime H, Katoh M, Furuichi K, Weinberger DR. The evolutionarily conserved G protein-coupled receptor SREB2/GPR85 influences brain size, behavior, and vulnerability to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:6133-8.
- 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.
- Moy SS, Nadler JJ. Advances in behavioral genetics: mouse models of autism. *Mol Psychiatry* 2008;13:4-26.
- Muraki K, Tanigaki K. Neuronal migration abnormalities and its possible implications for schizophrenia. *Front Neurosci* 2015;9:74.
- Nicholas B, Rudrasingham V, Nash S, Kirov G, Owen MJ, Wimpory DC. Association of Per1 and Npas2 with autistic disorder: support for the clock genes/social timing hypothesis. *Mol Psychiatry* 2007;12:581-92.
- 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.
- Okamura H, Doi M, Fustin JM, Yamaguchi Y, Matsuo M. Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Adv Drug Deliv Rev* 2010;62:876-84.
- O'Roak BJ, Deriziotis P, Lee C, Vives L, Schwartz JJ, Girirajan S, Karakoc E, Mackenzie AP, Ng SB, Baker C, Rieder MJ, Nickerson DA, Bernier R, Fisher SE, Shendure J, Eichler EE. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet* 2011;43:585-9.
- 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.
- Owens, JA. Principles and practices of pediatric sleep medicine. eds Sheldon, S., Elsevier, 2005;27-33.

- Partch CL, Green CB, Takahashi JS. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* 2014;24:90-9.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2011;14:285-93.
- 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, Bölte 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, Igliozzi 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.
- Piton A, Gauthier J, Hamdan FF, Lafrenière RG, Yang Y, Henrion E, Laurent S, Noreau A, Thibodeau P, Karemera L, Spiegelman D, Kuku F, Duguay J, Destroismaisons L, Jolivet P, Côté M, Lachapelle K, Diallo O, Raymond A, Marineau C, Champagne N, Xiong L, Gaspar C, Rivière JB, Tarabeux J, Cossette P, Krebs MO, Rapoport

- JL, Addington A, Delisi LE, Mottron L, Joober R, Fombonne E, Drapeau P, Rouleau GA. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2011;16:867-80.
- Popoli P, Reggio R, Pezzola A. Adenosine A1 and A2 receptor agonists significantly prevent the electroencephalographic effects induced by MK-801 in rats. *Eur J Pharmacol* 1997;333:2143-6.
- Prasad A, Merico D, Thiruvahindrapuram B, Wei J, Lionel AC, Sato D, Rickaby J, Lu C, Szatmari P, Roberts W, Fernandez BA, Marshall CR, Hatchwell E, Eis PS, Scherer SW. A discovery resource of rare copy number variations in individuals with autism spectrum disorder. *G3 (Bethesda)* 2012;2:1665-85.
- Qu F, Lorenzo DN, King SJ, Brooks R, Bear JE, Bennett V. Ankyrin-B is a PI3P effector that promotes polarized $\alpha 5 \beta 1$ -integrin recycling via recruiting RabGAP1L to early endosomes. *elife* 2016;5. pii: e20417.
- Richdale AL, Prior MR. The sleep/wake rhythm in children with autism. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 1995;4:175-86.
- Sakai Y, Shaw CA, Dawson BC, Dugas DV, Al-Mohtaseb Z, Hill DE, Zoghbi HY. Protein interactome reveals converging molecular pathways among autism disorders. *Sci Transl Med* 2011;3:86ra49.
- Sanders SJ, He X, Willsey AJ, Ercan-Sencicek AG, Samocha KE, Cicek AE, Murtha MT, Bal VH, Bishop SL, Dong S, Goldberg AP, Jinlu C, Keaney JF 3rd, Klei L, Mandell JD, Moreno-De-Luca D, Poultney CS, Robinson EB, Smith L, Solli-Nowlan T, Su MY, Teran NA, Walker MF, Werling DM, Beaudet AL, Cantor RM, Fombonne E, Geschwind DH, Grice DE, Lord C, Lowe JK, Mane SM, Martin DM, Morrow EM, Talkowski ME, Sutcliffe JS, Walsh CA, Yu TW; Autism Sequencing Consortium, Ledbetter DH, Martin CL, Cook EH, Buxbaum JD, Daly MJ, Devlin B, Roeder K, State MW. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* 2015;87:1215-33.
- Sebat J, Lakshmi B, Mlhotra 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;5823:445-9.
- Setoh M, Ishii N, Kono M, Miyanoohana Y, Shiraishi E, Harasawa T, Ota H, Odani T, Kanzaki N, Aoyama K, Hamada T, Kori M. Discovery of the first potent and orally

- available agonist of the orphan G-protein-coupled receptor 52. *J Med Chem* 2014;57:5226-37.
- Shao Y, Wolpert CM, Raiford KL, Menold MM, Donnelly SL, Ravan SA, Bass MP, McClain C, von Wendt L, Vance JM, Abramson RH, Wright HH, Ashley-Koch A, Gilbert JR, DeLong RG, Cuccaro ML, Pericak-Vance MA. Genomic screen and follow-up analysis for autistic disorder. *Am J Med Genet* 2002;114:99-105.
- Shishido E, Aleksic B, Ozaki N. Copy-number variation in the pathogenesis of autism spectrum disorder. *Psychiatry Clin Neurosci* 2014;68:85-95.
- Stein JL, Parikshak NN, Geschwind DH. Rare inherited variation in autism: beginning to see the forest and a few trees. *Neuron* 2013;77:209-11.
- Sultana R, Yu CE, Yu J, Munson J, Chen D, Hua W, Estes A, Cortes F, de la Barra F, Yu D, Haider ST, Trask BJ, Green ED, Raskind WH, Distèche CM, Wijsman E, Dawson G, Storm DR, Schellenberg GD, Villacres EC. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics* 2002;80:129-34.
- Thomas NS, Sharp AJ, Browne CE, Skuse D, Hardie C, Dennis NR. Xp deletions associated with autism in three females. *Hum Genet* 1999;104:43-8.
- Valnegri P, Khelfaoui M, Dorseuil O, Bassani S, Lagneaux C, Gianfelice A, Benfante R, Chelly J, Billuart P, Sala C, Passafaro M. (2011) A circadian clock in hippocampus is regulated by interaction between oligophrenin-1 and Rev-erba. *Nat Neurosci* 2011;28:1293-301.
- Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet* 2012;90:7-24.
- Wang K, Zhang H, Ma D, Bucan M, Glessner JT, Abrahams BS, Salyakina D, Imielinski M, Bradfield JP, Sleiman PM, Kim CE, Hou C, Frackelton E, Chiavacci R, Takahashi N, Sakurai T, Rappaport E, Lajonchere CM, Munson J, Estes A, Korvatska O, Piven J, Sonnenblick LI, Alvarez Retuerto AI, Herman EI, Dong H, Hutman T, Sigman M, Ozonoff S, Klin A, Owley T, Sweeney JA, Brune CW, Cantor RM, Bernier R, Gilbert JR, Cuccaro ML, McMahon WM, Miller J, State MW, Wassink TH, Coon H, Levy SE, Schultz RT, Nurnberger JI, Haines JL, Sutcliffe JS, Cook EH, Minshew NJ, Buxbaum JD, Dawson G, Grant SF, Geschwind DH, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Hakonarson H. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 2009;459:528-33.
- Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, Ma SY, Chauhan A, Chauhan V, Bobrowicz TW, de Leon M, Louis LA, Cohen IL, London E, Brown WT,

- Wisniewski T. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol* 2010;119:755-70.
- Weiss LA, Arking DE; Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium, Daly MJ, Chakravarti A. A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature* 2009;461:802-8.
- Yang Z, Matsumoto A, Nakayama K, Jimbo EF, Kojima K, Nagata K, Iwamoto S, Yamagata T. Circadian-relevant genes are highly polymorphic in autism spectrum disorder patients. *Brain Dev* 2016;38,91-9.
- Yirmiya N, Rosenberg C, Levi S, Salomon S, Shulman C, Nemanov L, Dina C, Ebstein RP. Association between the arginine vasopressin 1a receptor (AVPR1a) gene and autism in a family-based study: mediation by socialization skills. *Mol psychiatry* 2006;11:488-94.
- Yuen RK, Thiruvahindrapuram B, Merico D, Walker S, Tammimies K, Hoang N, Chrysler C, Nalpathamkalam T, Pellecchia G, Liu Y, Gazzellone MJ, D'Abate L, Deneault E, Howe JL, Liu RS, Thompson A, Zarrei M, Uddin M, Marshall CR, Ring RH, Zwaigenbaum L, Ray PN, Weksberg R, Carter MT, Fernandez BA, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW. Whole-genome sequencing of quartet families with autism spectrum disorder. *Nat Med* 2015;21:185-91.
- Zanni G, Saillour Y, Nagara M, Billuart P, Castelnau L, Moraine C, Faivre L, Bertini E, Durr A, Guichet A, Rodriguez D, des Portes V, Beldjord C, Chelly J. Oligophrenin 1 mutations frequently cause X-linked mental retardation with cerebellar hypoplasia. *Neurology* 2005;65:1364-9.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2009;10:451-81.
- Ziats MN, Edmonson C, Rennert OM. The autistic brain in the context of normal neurodevelopment. *Front Neuroanat* 2015;9:115.

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頂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致します。また本研究指導協力教員として日々ご指導頂きました神保恵理子講師に深謝致します。リンパ球分離、培養等にご協力頂きました大美賀成美研究補助員、神永雅代研究補助員、検体収集にご協力頂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、ご指導頂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 永田浩一部長、水野誠先生に深謝申し上げます。