

氏 名	後 藤 昌 英
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第 520 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 21 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子解析による生物学的指標の探索
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教 授 阿 部 隆 明 (委 員) 教 授 岩 本 禎 彦 准教授 嶋 崎 晴 雄

論文内容の要旨

1 研究目的

自閉症スペクトラム障害 (Autism spectrum disorder; ASD)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 0.8-1.5%と比較的頻度が高い。遺伝学的解析として array complementary genomic hybridization (aCGH) が行われ、約 10%に染色体の多数の領域に微少欠失や重複などのコピー数多型(CNV)が検出され、それらの CNV 中に局在し、特にシナプスに作用する遺伝子などから、候補遺伝子が同定されている。また、全エクソーム解析も進められ、多くの病因遺伝子が同定されており、ASD には 100 以上の遺伝子が関与していると考えられる。一方、ASD では 40～80%の患者が睡眠障害などのサーカディアンリズム異常を伴っており、また、複数のサーカディアン関連遺伝子と ASD との関連が推測されている。当研究室での解析で、ASD 患者において 9 種類のサーカディアン関連遺伝子に 13 種類の変異が検出され、その一つとして *NR1D1* に新規の変異が同定された。*NR1D1* は ASD の主要な病態の場であるシナプスに局在し、ノックアウトマウスでの行動異常を示す報告もあることから、*NR1D1* に注目した。

本研究では、ASD の主要な遺伝学的病態の一つである CNV 解析とサーカディアン関連遺伝子の *NR1D1* に焦点を当て、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とした。

2 研究方法

親権者の同意が得られ、DSM-IV または DSM-5 の基準を満たす ASD 患者検体から genomic DNA を抽出した。Human Genome CGH Microarray 4x180K (Agilent technologies)を用いて aCGH 解析を行った。検出された CNV 領域に局在する候補遺伝子に対して、他の ASD 群で変異解析を行った。*NR1D1* に対しては ASD 群で変異解析を行った。さらに子宮内エレクトロポレーション法を用いて、胎生 14.5 日のマウスの側脳室に RNAi を導入して *Nr1d1* の発現を抑制し、発達期における大脳皮質神経細胞の移動障害、細胞の形態変化、軸索や樹状突起の伸長などについて解析した。

3 研究成果

ASD 44 例の aCGH 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。*NRXN1* の部分欠失の 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、*CSMD1* の部分重複の 1 例と *TOP3B* の重複の 1 例は父由来の CNV であった。未報告である *De novo* の欠失として *GPR52* と *RABGAP1L* を検出したため、他の ASD 患者で両遺伝子の変異の有無を解析した。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。これは、既報告の変異であり、対照群からも検出され、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。

サーカディアン関連遺伝子の *NR1D1* に対しては、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 (当研究室から報告済み)、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。c.1499G>A (p.R500H) のみが SNP 報告は無く、*de novo* の変異であった。c.1499G>A (p.R500H) の機能予測では、変異によるタンパク機能への強い影響が示唆された。機能解析では、胎生 14.5 日のマウス脳にエレクトロポレーション法を用いて RNAi を導入し *Nr1d1* の発現を抑制した。大脳皮質の神経細胞は皮質表層まで到達するが、*Nr1d1* の発現を抑制された神経細胞は IV 層以下にも局在した。これは RNAi 抵抗性 *Nr1d1* (*Nr1d1-R*) では移動障害は改善され、ASD 患者の変異 (p.R500H) を導入されたプラスミドでは神経細胞の移動障害は改善されなかった。また発現抑制された神経細胞は多極性細胞様の未熟な双極性細胞の形態であった。移動する細胞の経時的な観察では、通常の神経細胞は放射状に移動するが、*Nr1d1* の発現を抑制した神経細胞は側方性、逆行性、複雑な動きなど様々な挙動を示し、移動速度も遅くなった。さらに発現を抑制された神経細胞では、軸索の対側への伸長が約 8 割に抑制されていたが *Nr1d1-R* で障害は改善した。発現を抑制された樹状突起の形態は、コントロールに比べ樹状突起が短くなり枝分かれの数も少なくなるなど、発育が阻害されていた。

4 考察

ASD 例の aCGH 解析の結果、シグナル伝達に関わる *GPR52*、*RABGAP1L* が *de novo* の欠失領域から検出された。それぞれの遺伝子に対し他の ASD 患者で変異解析をし、ASD と関連のある変異は検出されなかった。*GPR52* はドパミン D2 受容体と共に線条体に多く発現する G タンパク質共役受容体である。ノックアウトマウスでの行動実験などから *GPR52* は統合失調症に対する創薬の候補遺伝子とされており、ASD と統合失調症は共通する分子基盤が推測されている。また ASD とドパミン受容体や NMDA 受容体との関連を示す報告がされてきていることから、*GPR52* も有力な ASD の候補遺伝子と考えられる。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。

NR1D1 は遺伝学的な解析で ASD 患者から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、細胞の形態変化、軸索や樹状突起の伸長障害をもたらしたことから、*NR1D1* は神経細胞の発達に関与し、ASD の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。軸索および樹状突起の伸長障害は、シナプス形成と神経ネットワーク作成に影響すると考えられる。*Nr1d1* は 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。*Ophn1* は、知的障害の病因として同定されており、actin 骨格形成制御等により、シナプス形成・可塑性に関与していることが示されている蛋白である。また ASD 例での新規変異も同定されている。よって

Nr1d1 の機能低下は Ophn1 の機能低下も誘導し、シナプス構造の維持に低下を起し、ASD や知的障害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。*NR1D1* はサーカディアンリズムに関連する転写調節因子であるが、それ以外にも神経発生、シナプス形成に参与している遺伝子の発現も調節している可能性がある。

5 結論

ASD 患者例の aCGH 解析の結果、新たに病因と考えられる遺伝子を含む CNV を検出した。その中から G タンパク質共役受容体の *GPR52* を検出し、ASD の有力な候補遺伝子であると考えられた。

また、サーカディアン関連遺伝子 *NR1D1* はシナプスに関連して神経細胞の発達に参与し、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。

これらの研究により ASD の原因であるシナプス、シグナル伝達関連遺伝子の重要性が再確認された。また、サーカディアン関連遺伝子の中にも、シナプス形成・機能に参与し、ASD の発症に参与している遺伝子があることを示した。

論文審査の結果の要旨

自閉症スペクトラム障害(Autism spectrum disorder; ASD)は、近年、医療や教育の現場で話題になっており、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、その発症機序はほとんど解明されていない。本研究は、ASD の主要な遺伝学的病態の一つである CNV の解析とサーカディアン関連遺伝子の *NR1D1* に焦点を当てて、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試みている。

ASD44 例の aCGH 解析の結果からは、14 例に 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。多くはこれまでに報告された所見であったが、未報告である *de novo* の欠失として、*GPR52* と *RABGAP1L* を検出した。さらに他の ASD 患者で両遺伝子の変異の有無を解析したが、ASD と関連のある変異は検出されなかった。

サーカディアン関連遺伝子の *NR1D1* に対しては、遺伝学的な解析で、ASD 患者から機能予測による機能喪失変異が検出され、さらに Nr1d1 の発現抑制により、神経細胞の移動障害、細胞の形態変化、軸索や樹状突起の伸張障害をもたらすことが証明された。その結果、*NR1D1* は神経細胞の発達に参与し、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。

申請者は、以上の研究から、Nr1d1 の機能低下が Ophn1 の機能低下をも誘導し、シナプス形成の低下を起し、ASD や知的障害といった神経発達障害の病因となっている可能性を示唆した。このように、*NR1D1* のようなサーカディアン関連遺伝子が、シナプス形成に参与し、ひいては ASD の発症にも関与する可能性を示したことは学問的意義が大きいといえる。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、自閉症スペクトラム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。

ASD 患者の家系解析において、同じ遺伝子変異があっても発症しない家族がいるのはどうか。Nr1dl の発現抑制により、神経細胞の移動障害、細胞の形態変化、軸索や樹状突起の伸張障害をもたらすというが、これで知的に高い ASD 者の病態を説明できるのか。また、Nr1d1 に対する RNAi の off target 効果について、ヘテロ接合体の *NR1D1* 変異により、蛋白の機能喪失のみならず、ドミナントネガティブな機序を検討したかなど。

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た。その他、Nr1dl-R に関する記述の誤りや図の説明文の誤り、字句の誤りなどの指摘に基づき、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。