

博士論文

論文題目 トウレット症候群の De novo 変異の探索

江里口 陽介

目次

1. 序文

1-1 トウレット症候群(Tourette Syndrome)

1-2 トウレット症候群の経過・治療

1-3 トウレット症候群の疫学

1-4 トウレット症候群の併存疾患

1-5 トウレット症候群の病態生理・神経画像研究

1-6 トウレット症候群の遺伝子研究

1-7 トウレット症候群の De novo 仮説

1-8 孤発例と重症度

1-9 神経発達障害の女性保護効果仮説

1-10 精神疾患・神経発達障害の De novo 仮説とエクソームシーケンス

1-11 研究目的

2. 方法

2-1 研究対象

2-2 孤発例と家族例における重症度の比較

2-3 エクソームシーケンス

2-4 アラインメント・変異のコール

2-4-1 SNV、Indel のパイプライン

2-4-2 Indel 特異的パイプライン

2-4-3 コピー数多型パイプライン

2-5 サンガー法

2-6 機能予測

2-7 健常者および一般集団との比較

2-8 中枢神経での解剖学的部位・発達段階特異的発現

3. 結果

3-1 重症度の比較

3-2 エクソームシーケンス

3-3 De novo 変異のフィルター

3-4 サンガー法での確認

3-5 機能予測

3-6 健常者集団との比較

3-7 中枢神経での解剖学的部位・発達段階特異的発現

4. 考察

4-1 *RICTOR* の De novo 変異

4-1-1 mTORC(mTOR 複合体)の構造と *RICTOR*

4-1-2 mTOR signaling pathway

4-1-3 mTOR の脳神経内での機能

4-1-4 mTOR と精神・神経疾患

4-1-5 動物モデルでの知見

4-1-6 癌と *RICTOR*

4-1-7 遺伝子間相互作用

4-1-8 トウレット症候群と *RICTOR*

4-2 *FAM40B*

4-3 *NEK10*

4-4 *TNRC6A*

4-5 考察の総括

4-6 本研究の限界

5. 結語

文献

謝辞

要旨

トゥレット症候群の孤発例と家族歴のある患者の臨床評価を比較し、孤発例の方が重症であることを確認した。孤発の 10 家系にエクソームシーケンスを行い、4 つの De novo の非同義置換を同定した。うち *RICTOR* は Polyphen2、SIFT/PROVEAN の 2 つのアルゴリズムで、ともに最重度に有害な変異であると予測された。同座位の変異は日本人の報告はなく、世界的にも極めて稀で、しかも同一遺伝子の有害変異は日本人集団にみられないため、この有害変異はきわめて稀な変異であると考えられた。神経細胞中の役割やノックアウトマウスの行動など文献的考察から、*RICTOR* がトゥレット症候群の候補遺伝子として有望であると考えた。

1. 序文

1-1 トウレット症候群(Tourette Syndrome)

突発的で急速であり、リズムなく繰り返すようなパターン化した運動や発声のことをチックという[1][2]。体幹・四肢・頸部・表情筋などの動きのチックを運動チック、鼻や口、喉から音を発するチックを音声チックという。運動チック及び音声チックはそれぞれ、素早い動き・短時間の音声の単純チック、ゆっくりとして目的がありそうな動き・意味のある言葉である複雑チックに分けられる（表 1）。不随意的に体験されるが、一時的に我慢して症状を抑えることもできるため、半随意運動と考えられている。音声チックと多様な運動チックの両方が慢性的に持続し、ほとんど寛解期間がないときにトウレット症候群と診断し、片方だけが慢性的に持続する場合を慢性チック障害、罹患期間が短い場合を一過性チック障害と診断する。精神疾患の診断・統計マニュアル第 4 版 (DSM-IV-TR)[3]の診断基準を示す。

表 1 チック症状の概要

	単純チック	複雑チック
運動チック	〈単純運動チック〉	〈複雑運動チック〉
	瞬き・首の急激な動き・肩をすくめる・顔をしかめる	表情を変える・身繕いする・跳ねる・匂いを嗅ぐ
音声チック	〈単純音声チック〉	〈複雑音声チック〉
	咳払い・豚のようにうなる・鼻をクンクンする・吠える	状況に合わない汚い言葉（「死ね」「バカ」など）・オウム返し

表 1：チックの症状を運動/音声と単純/複雑に分割し、代表的なチックを列挙した。

DSM-IV-TR による診断基準

トゥレット障害

- A. 多彩な運動性チック、および1つまたはそれ以上の音声チックが、同時に存在するとは限らないが、疾患のある時期に存在したことがある（チックとは、突発的、急速、反復性、非律動性、常同的な運動あるいは発声である）。
- B. チックは1日中頻回に起こり（通常、何回かにまとまって）、それがほとんど毎日、または1年以上の期間中間欠的にみられ、この期間中、3ヶ月以上連続してチックが認められない期間はなかった。
- C. 発症は18歳以前である。
- D. この障害は物質（例：精神刺激薬）の直接的な生理学的作用、または一般身体疾患（例：ハンチントン病またはウイルス性脳炎後）によるものではない。

慢性チック障害の診断基準

- A. 1種類または多彩な運動性チック、または音声チック（すなわち、突発的、急速、反復性、非律動的、常同的な運動あるいは発声）が、疾患のある時期に存在したことがあるが、両者がともにみられることはない。
- B. チックは1日中頻回に起こり（通常、何回かにまとまって）、それがほとんど毎日または1年以上の期間中間欠的にみられ、この期間中、3ヶ月以上連続してチックが認められない期間はなかった。
- C. 発症は18歳以前である。
- D. この障害は物質（例：精神刺激薬）の直接的な生理学的作用や一般身体疾患（例：ハンチントン病またはウイルス性脳炎後）によるものではない。
- E. トウレット障害の基準を満たしたことがない。

一過性チック障害の診断基準

- A. 1種類または多彩な運動性および/または音声チック（すなわち、突発的、急速、反復性、非律動性、常同的な運動あるいは発声）
- B. チックは1日中頻回に起こり、それがほとんど毎日、少なくとも4週間続くが、連続して12ヶ月以上にわたることはない。
- C. 発症は18歳以前である。
- D. この障害は物質（例：精神刺激薬）の直接的な生理学的作用や一般身体疾患（例：ハンチントン病またはウイルス性脳炎後）によるものではない。
- E. トウレット障害または慢性運動性または音声チック障害の基準を満たしたことがない。

1-2 トウレット症候群の経過・治療

5-6 歳の頃、瞬目などの単純運動チックで発症し、1-2 年後に音声チックも始まり、10-12 歳で症状のピークを迎えるのが典型的な経過である[4]。その後、成長につれてチックが収まることもあれば、持続することもある。

チックのために食事や外出ができなくなったり、大声を出す音声チックのために人前に出られなくなったりする患者もいる[5]。特に他者の視線が気になる思春期にチック症状のピークを迎えることが多いため、生活の質は大きく損なわれる[6]。また成人期まで症状が持続するトウレット症候群患者の生活の質も低下している[7]。行動療法・認知行動療法などの心理学的介入や、ハロペリドール・リスペリドンなどの薬物治療が行われるが、対症療法に過ぎず、治療が奏功しないことも多い[8]。

1-3 トウレット症候群の疫学

トウレット症候群はかつて、学童期の子ども 1 万人中 5 人程度の非常に珍しい疾患と考えられていたが、現在はそれほど稀ではないことがわかっている。

トウレット症候群の頻度は報告によりばらつきが大きいですが、全世界の報告を統

合したメタ解析[9]では児童思春期の有病率は 0.77%で、男児の 1.06%, 女児の 0.25% が発症すると推定され、自閉症や注意欠陥多動性障害 (Attention-deficit/hyperactivity disorder: ADHD) と同じく、男児の方が高い有病率であると考えられている。なお 1990 年に本邦で行われた質問紙を用いた疫学調査では、有病率は 0.25%と報告されている[10]。

トゥレット症候群には家族集積性が指摘されてきた。一般人口を対照とした家族研究では、トゥレット症候群と慢性チック障害の家族がトゥレット症候群・慢性チック障害を発病する可能性について、第三度近親でオッズ比 3.07, 第二度近親で 4.58, 第一度近親で 18.69 であり、同胞で 17.68 であるのに対し異父同胞で 4.41 と、発端者に血縁関係が近くなるほど発病の可能性が増加することが報告されている[11]。双生児研究では、二卵性双生児のトゥレット症候群の診断一致率が 8%であるのに対し、一卵性双生児は 53-56%と高く[12]、大きな差がある。また、トゥレット症候群患者の第一度近親の発症リスクは一般人口の 10-100 倍にのぼる[13]。これらのことから、トゥレット症候群の発病には遺伝的要因が大きな役割を持つとされている。またトゥレット症候群の患者の家族には強迫性障害が多く、強迫性障害の患者の家族にはトゥレット症候群が多いことが家族研究で示され、トゥレット症候群と強迫性障害の遺伝的基盤はある程度オーバーラップしていることが示唆されている[14]。

トゥレット症候群には妊娠中・新生児期の環境要因の関与も報告されている(表 2)[15][16]。これらのほとんどが、自閉症など他の神経発達障害でも関連が報告されているため、トゥレット症候群に特異的ではない。

表 2 発症に影響しうる環境因子

母親の喫煙・コーヒー嗜好・飲酒・薬物使用
高齡の父親・母親
両親の社会経済的な困窮（教育年数が短い・所得が低いなど）
母親に対する重度のストレス（未婚であるなど）
妊娠初期の重度のつわり
妊娠中の合併症（高血圧・糖尿病など）
分娩時合併症（前期破水・臍帯巻絡・前置胎盤など）
早産
鉗子分娩
低出生体重
出生 5 分後のアプガースコアが低い

表 2: 発症に影響すると考えられている代表的な環境因子を列挙した。

環境要因によるものとして、A 群 β 溶血連鎖球菌の感染後に起こるチック・強迫行動は PANDAS (pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections) と呼ばれており[17]、自己免疫の機序を通してトゥレット症候群の発症することが知られている(表 3)。

表 3 PANDAS の診断基準 (Swedo et al 1998)

1. チック障害または強迫性障害が存在すること。少なくとも一時期は DSM-IV の強迫性障害またはチック障害の診断を満たしている。
2. 精神神経症状は思春期前（通常 3-12 歳）に出現していること。
3. 突然発症し、症状は周期的に増悪と改善を繰り返すこと。症状は数日から数週間にわたって爆発的に増悪するが、改善期には症状が消失することもある。
4. 症状の増悪の前に A 群 β 溶血連鎖球菌の感染があること。（咽頭培養で陽性、抗 GABHS 抗体陽性）
5. 症状の増悪時には他の神経学的な異常もあること。多動や舞踏用運動などが随伴する。

表 3: Swedo による PANDAS の診断基準を翻訳した。

1-4 トウレット症候群の併存疾患

トウレット症候群と強迫性障害の合併率は高く、1992 年から 2008 年までに収集した 1374 名のデータを対象とする研究[18]では、トウレット症候群のうち 66.1%が強迫性障害を合併し、生涯での罹患率は気分障害が 29.8%、不安障害が 36.1%であり、生涯で I 軸の精神疾患に罹患する可能性は 85.7%に上ることが示された。

また学童期のトゥレット症候群の患者は、チックゆえに他の生徒からからかいを受けがちで、自己評価は極めて低い[19]。トゥレット症候群の患者の診察で、チックだけが主訴となることは少なく、他の対人関係の問題や気分の問題がみられることが非常に多いため、トゥレット症候群の治療は小児科・小児神経科だけでなく、精神科・児童精神科で行うことも多い。

1-5 トウレット症候群の病態生理・神経画像研究

MRI を用いた形態学的研究は報告によって結果に一貫性がないものが多いが、線条体とくに尾状核の体積縮小の報告は一貫しており[20]、尾状核の縮小が成人後のチックの重症度と相関を示した、とする縦断研究がある[21]。

ハロペリドールのようなドパミン受容体ブロッカーがチックを緩和し、メチルフェニデートやアンフェタミンのように、ドパミン放出を促す薬剤がチックを増悪する[22]ことから、トゥレット症候群の原因として、ドパミン神経の異常が想定されてきた。SPECT を用いた研究では、トゥレット症候群の患者では健常対照群に比べ、線条体のドパミントランスポーターのドパミン取り込みの亢進がみられ[23][24][25][26]、線条体のドパミン神経の機能異常が指摘されてきた。

このように病態は一部理解が進んでいるが、さらなる病態解明が必要である。

1-6 トウレット症候群の遺伝子研究

最初はトウレット症候群が単一の遺伝子の異常で発症すると考えられ[27]、原因遺伝子が探索されたが、特定されなかった。その後の分離解析の結果を受けて、多数の疾患感受性遺伝子が複合的に作用して発症に至るものであり[28]、トウレット症候群はいくつもの異質な集団を内包していると現在では考えられている。トウレット症候群は人口の1%前後にみられる **common disease** であるため、**common disease** は頻度の高い変異によって引き起こされるという仮説（よくある疾患-よくある配列多様体仮説）に基づき、神経伝達を受容体関連遺伝子などの **common variant** が探索されたが、一貫性のある結果は見いだされなかった[29][30][31]。2013年には **genome wide association study (GWAS)** が行われたが、**genome wide significance** に達したマーカーはなかった[32]。

そのため **effect size** の大きい稀な変異が探索されるようになり、現在までにいくつかの候補遺伝子が報告されている。

トウレット症候群・ADHDの孤発例から染色体逆位を同定し、*SLITRK1* (*Slit and Trk-like, Family Member 1*) が候補遺伝子として注目され[33]、追試も行われている[34][35]。多数のトウレット症候群患者のいる家系からは、ヒスタミン合成の律速酵素であるL-ヒスチジン脱炭酸酵素をコードする、*HDC* が候補遺伝子とし

て報告された[36]。*HDC* ノックアウトマウスには、チックに類似した常同運動がみられるため、トゥレット症候群のモデル動物として研究されている[37]。

その他 *IMMP2L*[38], *NLGN4*[39], *CNTNAP2*[40]なども候補遺伝子として報告され、神経伝達に関与していると考えられている[41]。他の精神疾患・神経発達障害と比較すると、トゥレット症候群の研究の数・規模は小さく、発展途上であるといえるが、2000年代後半には次世代シーケンサーが研究に用いられるようになり、研究は加速している。

1-7 トウレット症候群の De novo 仮説

トゥレット症候群には家族集積性がみられるが、その一方で孤発例と考えられる患者も存在する。トゥレット症候群患者の家族歴を調査した研究では、第三度近親までにチック・強迫性障害がない患者を孤発例と定義し、19%だったと報告している[42]。

トゥレット症候群の孤発例では、継承された変異ではなく、両親にない生殖細胞突然変異（De novo）に起因する機能・構造異常により、発病に至ったと考えられる場合がある[38]。父親が高齢であることはトゥレット症候群発症の危険性を増大させる[43]。一般に父親の年齢上昇とともに生殖細胞の De novo 変異は

増加し[44]、自閉症・統合失調症ではこのために父親の年齢上昇に伴って **De novo** 変異の増加による発症の可能性が増大すると考えられている[44]。しかし、トゥレット症候群では詳細はわかっていない。

神経発達障害・精神疾患の患者は一般的に適応上不利になり、子孫を残し次世代に変異アレルを伝える可能性が顕著に低下すると考えられる。実際に統合失調症・摂食障害・物質使用障害の患者は、生涯を通して子どもの数が一般人口に比べて有意に少なく、健常同胞の子どもの数も、一般人口と同じか少ないことが示されている[45]。そのため変異アレルの頻度は、世代が新しくなるごとに低下していくはずである[46]。それにも拘わらず神経発達障害や精神疾患がありふれている理由として、健常な両親の生殖細胞に **De novo** 変異が生じ、子どもの中枢神経に機能障害が生じて発症することが想定されている[47]。**De novo** 変異は、選択淘汰により集団から消失する変異アレルを補充するとも考えられている。

トゥレット症候群患者の子どもの数を調査した研究は現在までないが、症状がトゥレット症候群と類似しており、遺伝的基盤がオーバーラップすると考えられている強迫性障害では、婚姻率・患者の子どもの数は低下していることが示されている[48]。トゥレット症候群の患者の婚姻率を調査した研究はないが、トゥレット症候群患者の多くは異性との関係を深めるのに著しい困難を抱えて

いる[49]ため、トゥレット症候群の患者に婚姻率や、ひいては挙児数が低下していることも考えられる。

そのため本研究ではトゥレット症候群でも、孤発例の発病メカニズムでは De novo 変異が大きく関与し、多くの De novo 変異は集団に残ることがない、と仮説を立て、トゥレット症候群の候補遺伝子を同定する手段として、孤発例の De novo 変異に注目した。

1-8 孤発例と重症度

精神疾患・発達障害の重症患者には孤発例が多く含まれている可能性が指摘されている。知的障害についての研究では、知的障害が重度になるほど、両親からの遺伝継承の影響が発病に占める割合が減ることが示唆されている[50]。また自閉症についての研究では、第三度近親までの自閉症・統合失調症・うつ病・双極性障害の既往、さらには第三度近親までの精神科入院歴までを家族歴として含めたときに、患者の IQ・生活の質が低くなるほど家族歴を持つ者の割合が減少し、有害な De novo 変異が増加することが示され、重症になるほど孤発例の割合が増えることが示唆されている[51]。以上により De novo 変異により発病した自閉症患者は、継承されたアレルにより発症した患者よりも症状が重篤

であると考えることができる。また、この研究から有害な **De novo** 変異を探索する際に自閉症と遺伝的な相関が想定されるあらゆる精神疾患を家族歴に含むことの妥当性が示されている。

トゥレット症候群については、併存疾患の有無によって患者を二群に分けたときに、家族歴の割合については有意差がなかったとの報告があるが[52]、孤発例と家族例でチックの重症度が異なるか否かは明確になっていない。トゥレット症候群の重症患者には孤発例が多く含まれているならば、孤発例の発病機序を明らかにすることにより、重症トゥレット症候群患者の治療法解明に貢献することが期待される。そして、トゥレット症候群で環境要因が明確で表現型コピーが疑われるような場合を除いた上で孤発例が重症ならば、自閉症と同様に影響力の強い **De novo** 変異が関与している可能性が考えられる。

トゥレット症候群の孤発例の選択にあたっては、トゥレット症候群では統合失調症・自閉症・知的障害・てんかん・**ADHD**・強迫性障害などの精神疾患・発達障害と遺伝的基盤が重複する可能性が指摘されていること[53]、同時に他の精神疾患・神経運動疾患との遺伝的な相関についての検討は未だ不十分であること[53]から、網羅的に精神疾患・神経運動疾患の家族歴を調べる必要があると考えられる。

1-9 神経発達障害の女性保護効果仮説

トゥレット症候群は前述のとおり、自閉症や ADHD と同様、4:1 程度の比率で男児に多い。双生児研究では男性の自閉症児の同胞よりも、女性の自閉症児の同胞の方が、より強い自閉症的傾向にあることが示された[54]。自閉症・知的障害など様々な神経発達障害の一塩基多型 (SNV: single nucleotide variant) とコピー数多型 (CNV: copy number variation) を探索した結果、女性の患者の方がより多くの有害変異を保有していた[55]。これらのことから、自閉症など発症率に顕著な男女差がある神経発達障害において、女性を発症から免れさせると想定される、女性保護効果仮説が提唱されている。自閉症では女性保護仮説の機序として、X 染色体に関連したゲノム刷り込みが提唱されている[56][57]。顕著な男女比をもつトゥレット症候群においても女性保護仮説を仮定することができる。

自閉症の男女比は一般的に 4:1 だが、知的障害のない高機能自閉症では 7:1 で、中等度から重度の知的障害を伴う自閉症では 2:1 と女性の割合が増える[58]。2500 家系以上の自閉症の孤発例を調査した研究では、平均 IQ が男子で 86、女子で 78 と女子の方が有意に低く、認知機能の顕著な低下が示された[59]。またシーケンスの結果、女子の孤発例は、有害な変異を多く保持するとともに、シナプス可塑性に影響して神経精神疾患に大きく関与していると予想される

FMRP（脆弱 X 症候群タンパク）[60]関連遺伝子の *De novo* 変異を多く含んでいた。そのため *De novo* 変異が原因で発病したと考えられる患者の割合は女性の方が男性より高いと推測された[59]。以上より、*De novo* 変異により発病した自閉症は重症であるため、女性保護効果をもってしても発病から免れさせることができず、重症例では男女差が目立たなくなると考えることができる。

北米での報告ではトゥレット症候群の児童期の男女比が 9.3 : 1 で、成人期には 3.4 : 1 と、児童期に比べて成人期の患者は女性の比率が上がる[61][62]。トゥレット症候群は成人期には 3 分の 2 以上は寛解するが、寛解しない重症例の割合は女性患者に多いと考えられる。

これらのことから、もしトゥレット症候群の女性において孤発例の方が重症ならば、自閉症で想定したのと同様に男性に比べて *De novo* 変異の発症への寄与が大きい可能性が考えられる。

1-10 精神疾患・神経発達障害の *De novo* 仮説とエクソームシーケンス

エクソームシーケンスでは、全ゲノムのタンパク質コーディング領域を調べることが可能であるため、サンガー法や、限定されたゲノム領域のターゲットシーケンスと比較して、変異のある候補領域を想定する必要がある[47]。ま

たホールゲノムシーケンスと比べ、non-coding 領域を評価できないという制限があるが、費用が抑えられることや、扱う情報量が少ないため強力な計算機的資源を必要としない、などのメリットもある。それゆえトゥレット症候群のように多数の疾患感受性遺伝子が想定される場合や、研究参加できた家系の構成員数が少ない場合に、特に有効であると考えられている[63]。特に De novo 変異を探索する研究では、子どもと、健常な両親の検体があれば十分である。またコピー数多型を検出できるマイクロアレイ[64]やアレイ CGH[65]と異なり、エクソームシーケンスでは単塩基多型 (SNP) や数塩基程度の挿入欠失(indel)の De novo 変異を検出することも可能である。これまで自閉症や統合失調症といった、トゥレット症候群同様に多数の疾患感受性遺伝子が想定される神経発達障害・精神疾患でも、De novo 変異の探索がなされ、候補遺伝子として報告されている[66][67][68][69][70][71][72][73][74][75][76][59][77][78][79][80]。これらの研究では、患者と両親から検体を得て、対照群としては健常同胞や健常対照群を用いて、患者群が対照群に比べて、De novo 変異・ミスセンス変異、もしくはアルゴリズムで予測された有害変異が多いことを証明し、De novo 変異により発症に至ったことを証明している。

1-11 研究目的

以上より、本研究ではまずトゥレット症候群の孤発例と家族例の重症度について男女別に比較し、重症のトゥレット症候群の病態解明として、孤発例を研究対象とすることの意義を検討する。次にエクソームシーケンスを用いて、トゥレット症候群孤発例の *De novo* 変異を同定し、変異遺伝子の機能を調査し、トゥレット症候群発症と関連の深い遺伝子の特定を試みる。

2. 方法

2-1 研究対象

精神疾患の診断・統計マニュアル第4版 (DSM-IV-TR)[3]を用いてトゥレット症候群と診断された患者、およびその両親を対象とした。東京大学医学部附属病院・本郷東大前こころのクリニック・信愛会 さくら病院にてリクルートを行った。遺伝継承によるトゥレット症候群発症を除外するため、患者・両親のチックをイエール全般的チック重症度尺度(Yale Global Tic Severity Scale: YGTSS)で評価し、両親にチックがないことを確認した。YGTSSは半構造化面接に基

づいてチックの種類と重症度を評価する国際標準の尺度である。症状チェックリストで各チックの有無を確認してから、運動チックと音声チックについて、チックの数、頻度、強さ、複雑さ、行動や発語への影響を各々5点満点で評価すると共に、社会機能の障害を50点満点で評価する。重症度得点は、チック及び社会機能の障害の得点を合計して0～100点となり、重症であるほど高得点になる。両親にDSM-IV-TRのI軸の罹患や既往を、精神疾患簡易構造化面接法(The Mini-International Neuropsychiatric Interview: M.I.N.I.)[81][82]で除外した。特に両親の強迫性障害を除外する必要があるため、患者・両親にNIMH Global Obsessive Compulsive Scale (NIMH-OCS)を行った。NIMH-OCSは強迫症状が日常生活に与える影響を臨床家が評価する。3点刻みで設定されたアンカーポイントに従って1～15点で評価し、重症であるほど高得点になる。1～3点までは正常範囲、7点以上が強迫性障害とされている。[83]。第一度近親(親・同胞)にはチックがなく、第二度近親(祖父母・おじおば)及びいどこまでにトゥレット症候群・強迫性障害・精神疾患の通院歴・てんかんやパーキンソン病などの神経疾患と診断された人がいないことを、問診で確認した。

妊娠中・出生早期の環境要因による発症を否定するため、早産(妊娠 37 週未満)・出生時体重 2000g 未満・出生時の重篤な合併症を除外し、チックが出現する前の溶連菌感染を問診で除外した。但し、一卵性双生児の患者については、

貴重なケースと考えて、早産・低出生体重・新生児黄疸で光線療法を受けていたが、環境要因による除外基準のみを緩めて、除外しなかった。

東大病院では 2013 年 11 月から 2015 年 8 月までに通院中の 238 名がリクルート対象になった。最初にカルテ上の情報を参照し、カルテで家族歴が確認できない者・両親が離婚/死別している者合計 81 名が除外された。残り 157 名は家族歴・環境要因を確認することができた。本研究に定めた家族歴の基準により除外された者が 121 名、環境要因で除外された者が 7 名だった。残り 29 名が孤発例の可能性があるとみなされたが、18 名は患者本人もしくは両親のいずれかが、研究参加を拒否した。11 組の患者・家族が研究に参加した。研究協力機関 A から基準を満たした 1 名が、研究協力機関 B から先述した一卵性双生児の 2 名がそれぞれ参加した。13 組 14 名の発端者とその両親が参加した(図 1)。

本研究は、東京大学医学部のヒトゲノム・遺伝子解析研究 研究倫理審査委員会[審査番号 G0639-(32); 精神疾患発症にかかわる関連遺伝子の探索および解析]によって承認されており、承認されている方法に従って十分な説明を行い、対象者全員から書面での同意を得た。

2-2 孤発例と家族例における重症度の比較

東大病院でカルテ調査を行った家族歴のあるトゥレット症候群 121 名のうち、58 名(男性 46 名・女性 12 名)でチックと強迫症状について YGTSS、NIMH-OCS での評価を使用することができた。孤発例の可能性が高い 13 組 14 名の発端者(男性 8 名・女性 6 名)と、上述の 58 名との間で、男女別に YGTSS、NIMH-OCS の得点を比較した。統計には t 検定を用いて、有意水準は $p<0.05$ とした。解析には統計解析環境 R (<http://cran.r-project.org/>) を用いた。

図1 リクルートの流れ

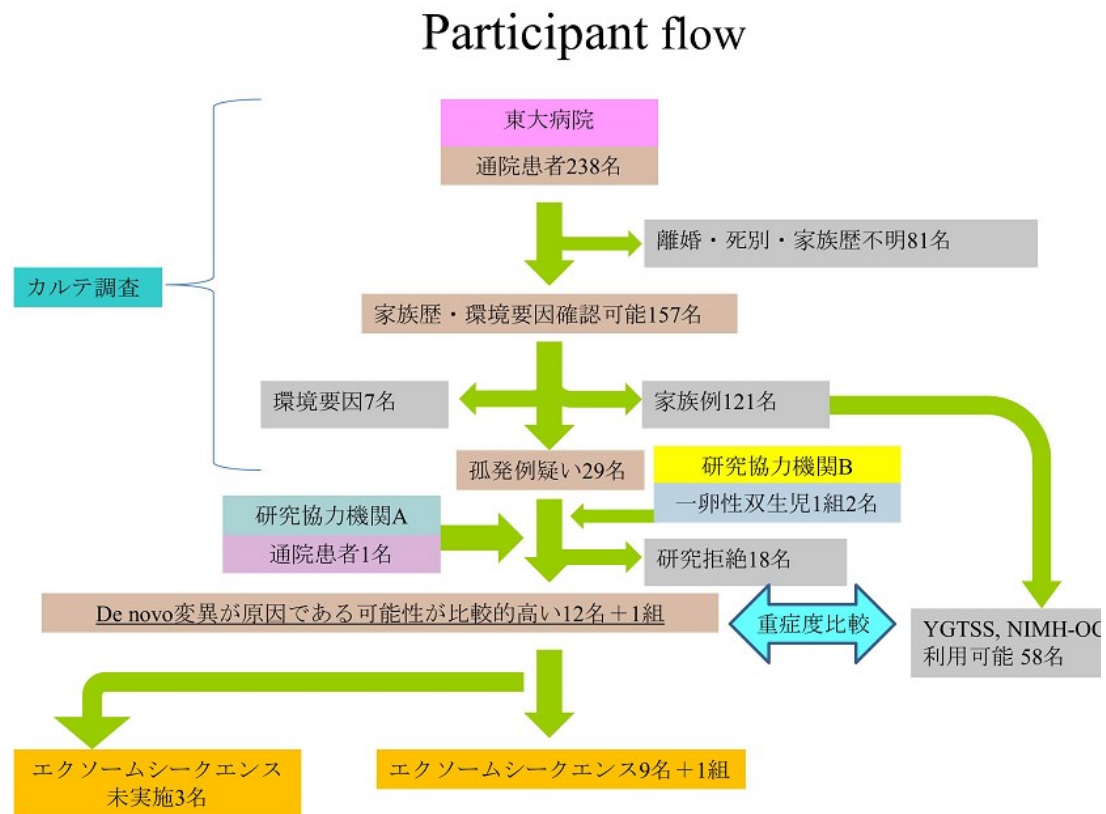


図1: 238名の通院患者から本研究に参加した12名+1組に絞り込む過程を図示した。家族歴のある121名のうち、YGTSS, NIMH-OCSの利用可能な58名は重症度比較において、家族例として孤発例の12名+1組との比較対照とされた。

表 4. 研究参加者の年齢・性別・得点

ID		患者性別	年齢	YGTSS	NIMH-
F01	患者	男性	13	67	2
	父親		48	0	2
	母親		46	0	1
F02	患者	女性	17	43	6
	父親		52	0	1
	母親		45	0	3
F04	患者	女性	33	61	3
	父親		62	0	1
	母親		62	0	3
F05	患者	男性	10	34	1
	父親		50	0	0
	母親		49	0	0
F06	患者	男性	12	25	3
	父親		56	0	0
	母親		49	0	0
F07	患者	男性	21	19	5
	父親		52	0	0
	母親		48	0	0
F12	患者	男性	11	58	0
	父親		42	0	0
	母親		42	0	0
F13	患者	女性	21	84	5
	父親		53	0	0
	母親		51	0	0
F14	患者	男性	17	70	2
	父親		53	0	0
	母親		50	0	0
MZ	患者1	女性	9	42	0
	患者2	女性	9	41	0
	父親		42	0	0
	母親		44	0	0
YGTSS; Yale global tic severity scale					
NIMH-OCS; NIMH Global Obsessive-Compulsive Scale					

表 4: 家族 ID と患者の性別、患者と両親の YGTSS, NIMH-OCS を記載した。F03, F08, F09, F10, F11 などの欠番は、患者からは協力を得られたが、両親のいずれかから協力を拒否された。

2-3 エクソームシーケンス

13 組の患者・両親から採血し、白血球から DNA を抽出した。F05 の患者のみ、唾液から Oragene DNA Self Collection Kit(DNA Genotek)を用いて DNA を抽出した。得られた 13 組の DNA サンプルのうち、1 名の発端者は現在の YGTSS 10 点以下と寛解に近い状態だったため、1 名は採血後の心理検査で IQ 75 以下の軽度の知的障害の合併が否定しきれなかったため、エクソームシーケンスは行わなかった。2015 年 9 月末に採血した 1 名はエクソームシーケンスが未施工であり、現在までに 10 組の患者・両親のサンプルをシーケンサーで塩基配列を解読した(表 4)。1 組は一卵性双生児の家族だった。

DNA を超音波で数百塩基程度にせん断し、PCR で増幅後アダプターを DNA 断片の両端に付加し、SureSelect Human All Exon V5+UTR Kit (Agilent)にハイブリダイズさせて濃縮した。F01 のみは SureSelect Human All Exon V4+UTR Kit (Agilent) を用いた。濃縮した DNA 断片は東京大学ゲノム医学センター内の HiSeq2000 でシーケンスした(図 2)。

図 2 エクソームシーケンス

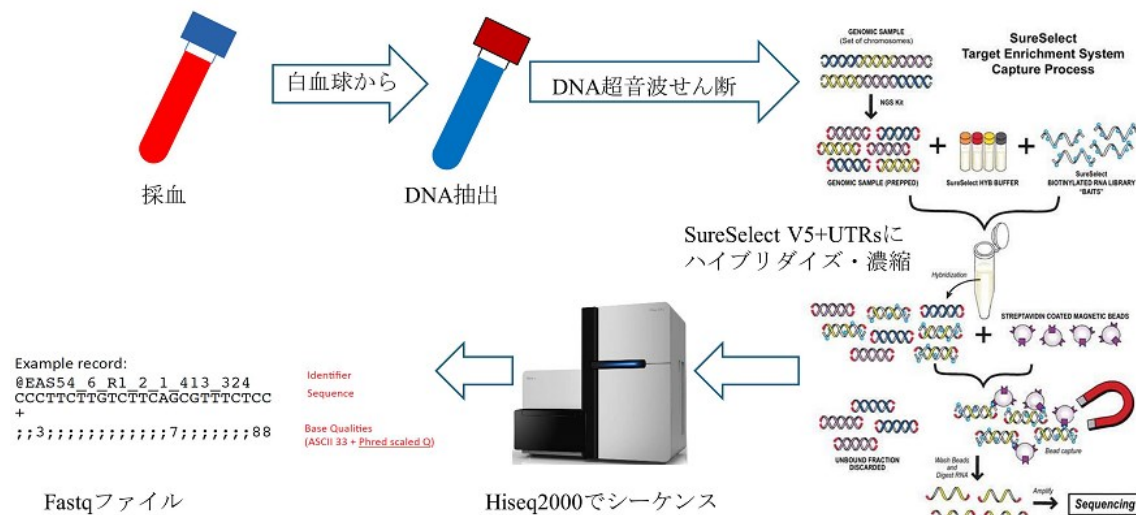


図 2: 採血から白血球抽出、DNA せん断、DNA 濃縮を経てシーケンスを行うまでの流れを図示した。

2-4 アラインメント・変異のコール

2-4-1 SNV、Indel のパイプライン

Broad Institute の GATK Best Practice を叩き台にして解析パイプライン(図 3)を構築した (<https://www.broadinstitute.org/gatk/guide/presentations?id=3391>)。Hiseq 2000 から得られたショートリードのファイル(fastq)を、BWA[84]を使って参照ゲノム(ucsc.hg19)に対しアラインメントした。生成した sam ファイルを bam 形式に変換し、Picard(<http://broadinstitute.github.io/picard/>)で PCR の重複リードを除去

した。GATK[85]を用いて既知の indel 周辺の再配列を行った後、塩基クオリティスコアの較正し、較正 bam ファイルとした。全参加者のサンプルからまとめて変異をコールし、vcf ファイルを生成し、変異クオリティスコアの較正を行った。その中からメンデル遺伝に従わない座位を De novo 変異の候補として抽出し、snpEff[86]を用いて Refseq(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>)で遺伝子・機能のアノテーションを行った。De novo 変異のフィルターには Neale[68]の基準を採用した。すなわち、

- ① 親・子全てで read depth が 10 以上であること、
- ② 子の read の 30%以上が、変異アレルを示すこと、
- ③ 両親の変異アレルを示す read がともに 5%以下であること、

の全てを満たすものを Integrative genomics viewer[87]を用いて確認(図 4)し、サンガー法での確認に進んだ (図 5)。

図3 アラインメント・変異のコールのパイプライン

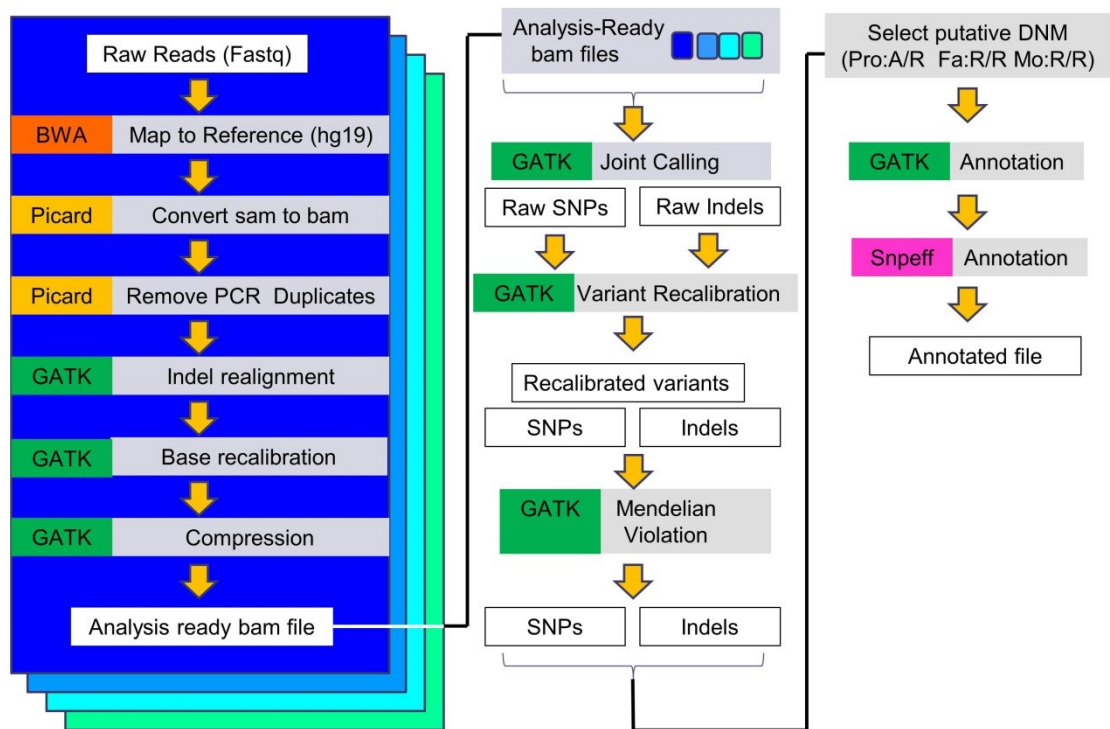


図3: SNV, Indel をコールするパイプラインを図示した。GATK を中心に用いている。

図 4 IGV による De novo 変異候補の確認

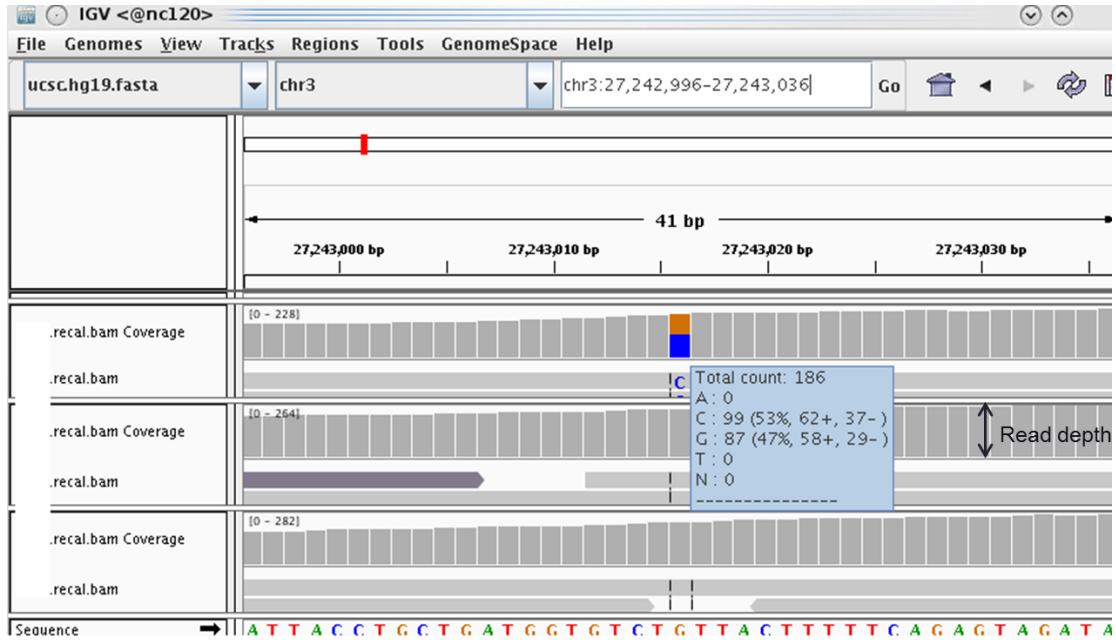


図 4: 横の灰色のバーがショートリードを示す。縦の灰色のバーがそれぞれの座位でのリードを示す。図中央の茶色と青色で示されている座位では、C (青色) を示すリードが 53% で G (茶色) を示すリードが 47% で、患者の総リード数が 186 である。両親の総リード数も 10 以上で、変異アレルを示すリードが 5% 以下なので、Neale の基準を満たしている。

図5 サンガー法による De novo 変異の確認

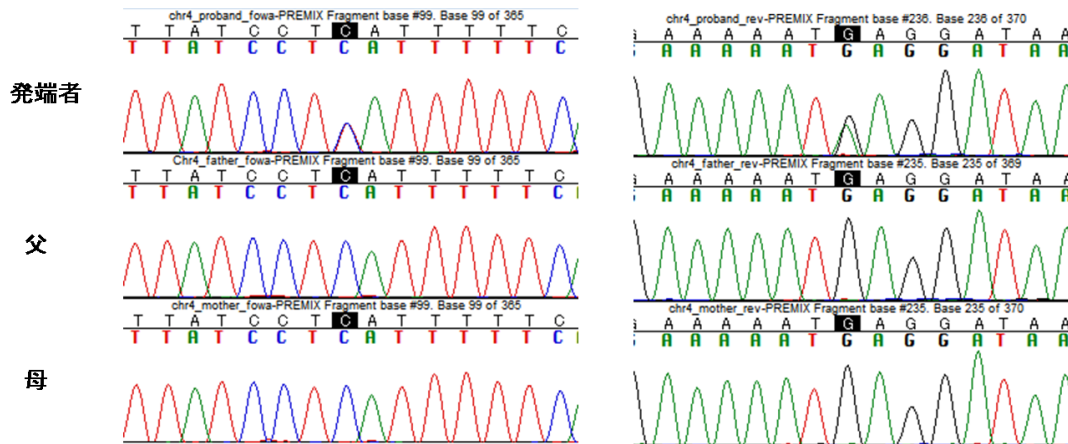


図 5: 左図の中央では発端者（患者）で C（青）と T（赤）の波が重なり、周囲の波高の半分程度となっている。両親では C の波だけで、波高は周囲と同程度である。右図は同じ座位の相補鎖をサンガーシーケンスしたもので、中央では患者で A と G の波が重なり、両親で G の波だけである。

2-4-2 Indel 特異的パイプライン

上記の方法でも indel の同定は困難なことが多いため、indel 同定に特化した Pindel (<http://gmt.genome.wustl.edu/packages/pindel/>) [88] を用いて、それぞれの家系の校正 bam ファイルから、親子の indel をまとめてコールした(図 6)。欠失・短配列の挿入・縦列重複などタイプ別に分かれた indel の候補から、Neale の基準により De novo indel をフィルターした。

図 6 Indel 検出パイプライン

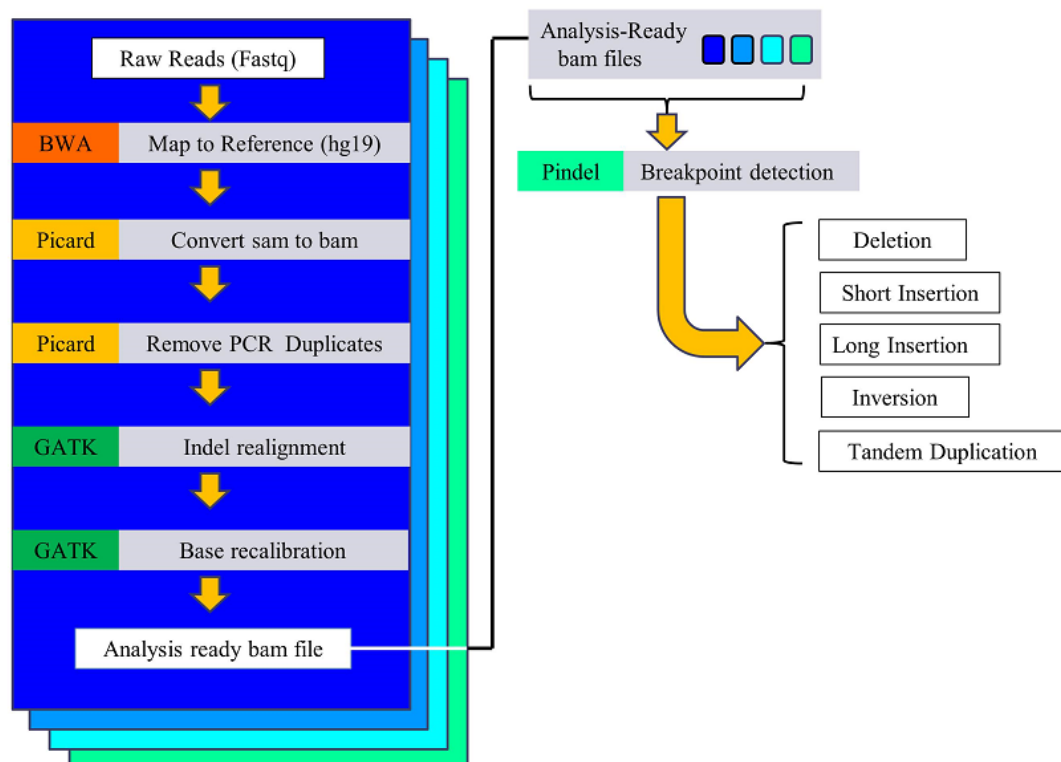


図 6: Indel 検出を強化したパイプラインを図示した。塩基クオリティスコアの較正をするところまでは、SNV/Indel のパイプラインと同じである。

2-4-3 コピー数多型パイプライン

エクソームからコピー数多型を検出するために、きわめて高度な技術による XHMM(<http://atgu.mgh.harvard.edu/xhmm/index.shtml>)[89][90]を使用した。参照ゲノムに比べて Duplication のときには read depth が増加し、deletion のときには低下することを利用する。GATK で各 bam ファイルの read depth を計算し、極端に GC に富む座位・極端な read depth の分布を持つサンプルなどを除外した。主成分

分析（PCA）を行い、サンプルの平均 read depth・座位近傍の GC 内容の多寡・サンプルの性別などに関連することの多い上位の主成分を除外した後に正規化を行なった。隠れマルコフモデルにより CNV を予測し、De novo CNV を検出した(図 7)。PCA・正規化の過程で多数のエクソームシーケンスファイルが必要になったため、シーケンスファイルと表現型情報が登録されている dbGap に申請し、Exome sequencing in schizophrenia families (phs000738.v1.p1)[91][92] の 54 家系 216 名のファイルを使用した。

図 7 コピー数多型検出パイプライン

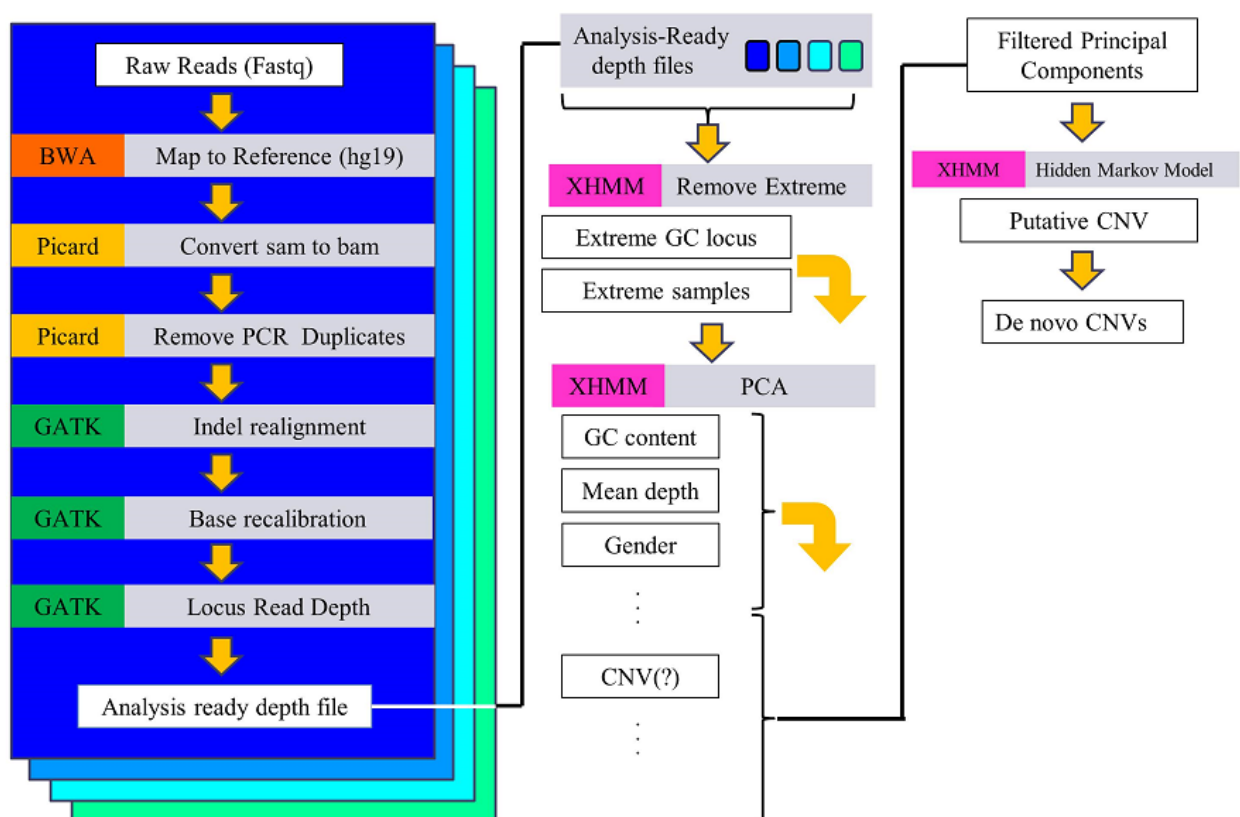


図 7: CNV コールのためのパイプラインを図示した。塩基クオリティスコアを較正するところまでは、SNV/Indel のパイプラインと同じである。

2-5 サンガー法

プライマーは Primer3 v0.4.0(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)を用いて設計し、PCR 増幅を行い、ExoSAP-IT (affymetrix)にて過剰なプライマーと未反応 dNTP 除去し、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer の標準プロトコルに従い、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)を用いて反応を進めた。両親が波形からともにホモであり、患者のみがヘテロであると確認できた変異を De novo 変異と判断した。(図 5)

2-6 機能予測

Polyphen2(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)[93]を用いて、有害な変異を予測した。それに加え、SIFT[94](<http://sift.jcvi.org/>)と PROVEAN[95](<http://provean.jcvi.org/index.php/>)も用いた。それぞれを単独で用いた場合の偽陽性[96]を回避するために、これらのうち2つ以上で有害と判断されたものを、有害アレルとした。

PolyPhen2 は変異アレルの希少性の評価と、翻訳タンパクまたは転写物における機能ドメインの推測、変異を含んだ配列の翻訳タンパクの機能予測により、変異の有害性を判断する。まず BLAST[97]を用いて、参照配列と変異を含んだ

配列それぞれに類似した配列を、生物種全般のゲノムから探索し、類似配列の数を比較して、希少性を評価する。他の生物種に類似した変異を含む配列がほとんどみられない場合は希少だと考えられる。翻訳タンパクの機能予測には UniProtKB/Swiss-Prot database (The UniProt Consortium, 2011)を用いる。次に変異を含む配列の翻訳タンパクの三次元構造をタンパク構造データベースの PDB(<http://www.pdb.org/>)を用いて予測し、極性の変化、化合物の結合部位に与える影響などから、機能予測をする。

SIFT/PROVEAN では、変異アレルを含む配列の転写翻訳産物であるアミノ酸配列の、進化における保存度を定量化し、変異の有害度を予測する。まず PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて、アミノ酸配列の相同配列を検索する。検索された相同配列において、アミノ酸配列の保存の程度を定量化する。配列そのものがほとんど共通である場合には、配列が保存されていると判断され、親水-疎水などの性質が共通する場合には、性質が保存されていると考えられる。高度に保存された部位に、非同義置換などでアミノ酸配列の変化が起きた場合には、有害と予測され、相同配列間にあまり共通性がみられない部位で変化が起きた場合には、有害ではないと判断される。

2-7 健常者および一般集団との比較

有害と考えられる De novo 変異アレルについては、当該 SNV/indel の日本人健常者または一般集団での頻度を確認した。また、有害と考えられる De novo 変異が位置する遺伝子の、日本人集団における有害変異全体の頻度を確認した。日本人健常者および一般集団としては、京都大学 snpDB(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/index.html>)[98](長浜市に居住する 301 人の健康な成人)、および 1000 genome project[99] (日本人 104 名) を用いた。

2-8 中枢神経での解剖学的部位・発達段階特異的発現

健常者の死後脳バンクである Brainspan(<http://www.brainspan.org/>)の RNAseq によるトランスクリプトームを利用し、各遺伝子の中枢神経における解剖学的部位・発達段階特異的な発現パターンを可視化した。トゥレット症候群と健常者の死後脳を比較したトランスクリプトーム[101][102]を通して、トゥレット症候群発症の機序について検討した。

3. 結果

3-1 重症度の比較

本研究への参加基準を満たした孤発例の 14 名と、家族歴が確認された 58 名の間で、男女別に YGTSS と NIMH-OCS を比較した。女性では、YGTSS は孤発例群で得点が有意に高く ($p=0.0175$)、NIMH-OCS に差はなかった。男性では、YGTSS に有意差はみられず、NIMH-OCS は孤発例群で得点が有意に低かった ($p=0.030$) (図 8)。孤発例の特徴としては、女性ではチックが重症であり、男性では強迫症状が軽症であった。

一卵性双生児女児 1 組 2 名を除いて、女性のみ孤発例と家族例を t 検定で比較したところ、YGTSS は孤発例の方が高く ($P=0.012$)、NIMH-OCS は有意差なし、と結論に影響はなかった。

男女を併せて孤発例と家族例を比較すると、YGTSS では孤発例が有意に得点が高く ($P=0.044$)、NIMH-OCS では家族例が有意に得点が高い ($P=0.024$) ことが示された。

図 8-1 男性孤発例と家族例の YGTSS/NIMH-OCS 比較

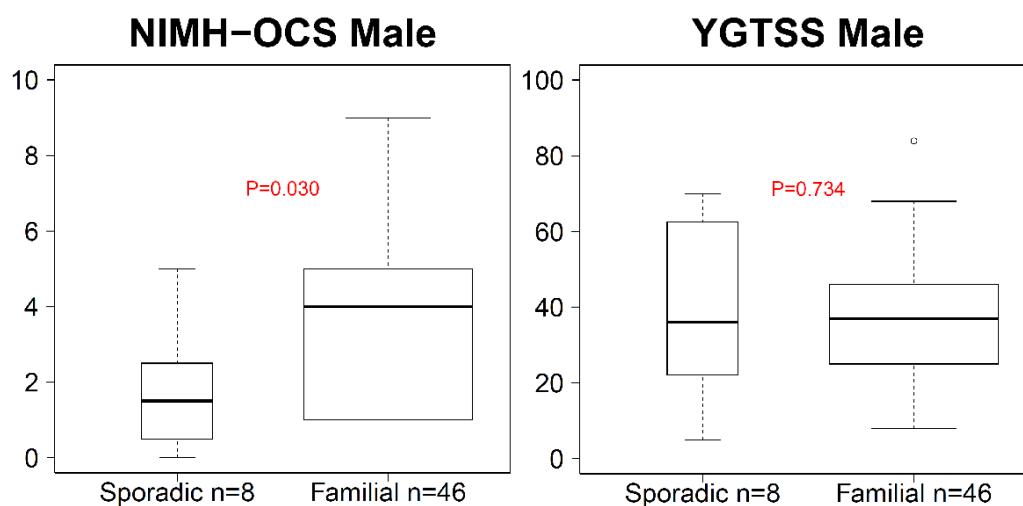


図 8-1: 男性孤発例と家族例の YGTSS (左) と NIMH-OCS (右) の箱グラフを示した。人数は n= で表示し、P 値は赤字で図中に示した。

図 8-2 女性孤発例と家族例の YGTSS/NIMH-OCS 比較

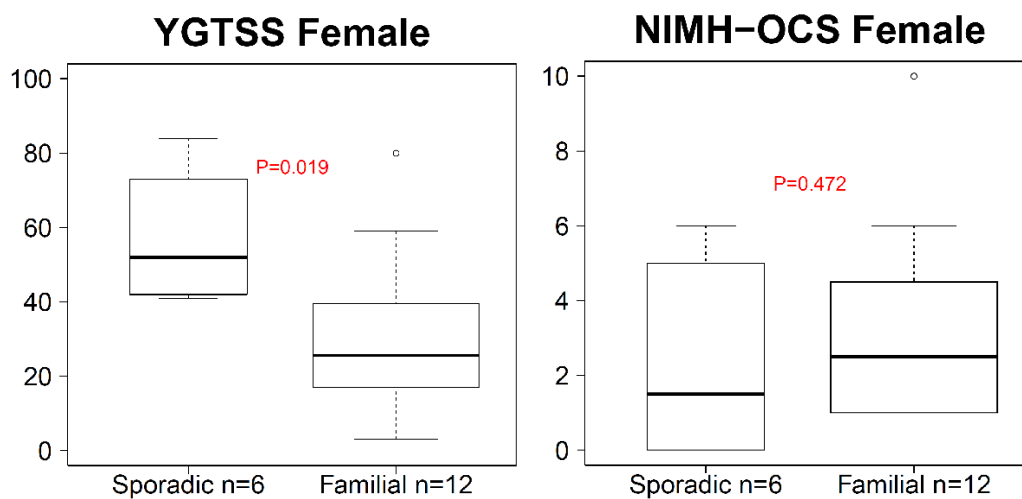


図 8-2: 女性孤発例と家族例の YGTSS、NIMH-OCS の比較の箱グラフを図示した。

表 5 エクソームシーケンス結果の要約

ID	Proband sex	Paternal age(M)	Maternal age(M)	total reads	Target Exome ≥10 Reads, %	Target Exome ≥20 Reads, %	mean coverage	protein coding de novo event
F01	Male	415	384	4121818409	75.9	61.1	45.62	0
F02	Female	422	334	10677926591	94.4	86.6	91.34	2
F04	Female	354	357	10218725577	94.5	86.5	87.42	0
F05	Male	471	463	10491926099	94.4	86.5	89.75	2
F06	Male	512	437	12352035359	95.6	89	105.66	0
F07	Male	350	301	11324108980	95.3	88.3	96.87	3
F12	Male	369	371	6053901734	89.6	76.1	51.79	0
F13	Female	375	361	6738034652	91.1	79.1	57.64	1
F14	Male	391	355	6767497605	90.8	78.6	57.89	0
MZ-P1	Female	391	417	6830276148	91.2	79.3	58.43	0
MZ-P2	Female	391	417	6606778298	90.7	78.4	56.52	0

表 5: 列の左から家族 ID、患者の性別、患者を出産した時の父母の年齢（月）、総リード数、read depth 10 以上の領域の割合、20 以上の割合、平均カバレッジ、コーディング領域の De novo 変異の個数を記載した。

3-2 エクソームシーケンス

エクソームシーケンス結果の要約を、表 5 に示す。SureSelect Human All Exon

V4+UTR Kit (Agilent)を用いた F01 のみ、read depth10 以上の領域が 80%以下だった

たが、その他の SureSelect Human All Exon V5+UTR Kit (Agilent)で濃縮されたサ

ンプルは概ね 90%以上、ターゲット領域を捕捉していた。

3-3 De novo 変異のフィルター

10 家系に対し SNV・INDEL 合計して 335325 箇所の変異がコールされた。そのうちメンデルの法則に従わない部位が 10254 箇所あった。両親がともに参照アレルをホモで示し、患者が変異アレルと参照アレルのヘテロを示す箇所は 627 箇所だった。そのうち 29 か所が Neale の基準を満たした (図 9)。29 か所の内訳は 28 か所の SNV と 1 か所の欠失で (表 6)、そのうち 8 か所がアミノ酸コード領域に位置した。8 か所のうち 4 か所が同義置換、4 か所が非同義置換だった (表 7)。なお GATK の Indel 検出を補う目的で Pindel も用いたが、Neal の基準をクリアする Indel は検出されなかった。また XHMM でも De novo の CNV は検出されなかった。

図 9 変異の絞り込みのフローチャート

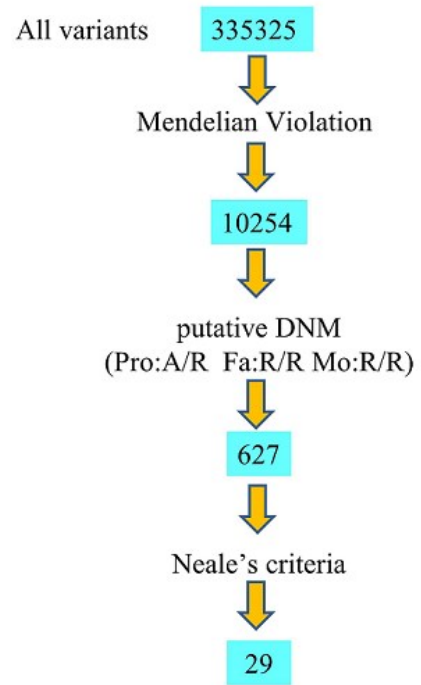


図 9: 335325 箇所の変異から 29 か所に絞り込まれる過程を示した。

表 6 確認された De novo 変異の一覧

ID	chr	location	rsID	Ref	Alt	gene	Amino acid change	type
F01	4	98106426	-	C	T	STPG2		(-)
F02	1	200143149	rs150243341	C	T	NR5A2		Synonymous
F02	2	72357169	-	C	T	CYP26B1		3'UTR
F02	5	38955743	rs140964083	G	A	RICTOR	p.Arg855Trp	Missense
F02	20	24565355	-	G	A	SYNDIG1		intron
F04	11	103350097	-	T	G	DYNC2H1		3'UTR
F05	2	86433141	-	A	T	MRPL35		intron
F05	3	27243016	-	G	C	NEK10	p.Thr156Arg	Missense
F05	6	37298967	-	ACCCAGACTGCCTT	A	TBC1D22B		3'UTR
F05	7	73457135	-	G	A	ELN		intron
F05	20	47863656	rs181019908	G	A	DDX27		3'UTR
F05	20	62324301	rs143740470	C	T	RTEL1		Synonymous
F05	22	17058529	-	C	T	KB-67B5.12		(-)
F06	1	247003822	-	A	G	AHCTF1		intron
F06	11	429741	rs145037462	G	A	ANO9		intron
F06	12	10150806	-	A	C	CLEC12A		3'UTR
F06	14	100757527	-	G	A	SLC25A29		3'UTR
F07	5	138661134	-	C	T	FAM167A		5'UTR
F07	7	100875543	-	G	A	KATNAL1		Synonymous
F07	7	129091523	-	G	A	CAPN1		3'UTR
F07	8	11302116	-	A	G	CLDN15		3'UTR
F07	7	129091523	-	G	T	STRIP2	p.Arg115Leu	Missense
F07	13	30784500	-	C	T	MATR3		Synonymous
F12	11	7670621	-	C	G	PPFIBP2		intron
F12	15	67009692	-	G	A	SMAD6		intron
F13	16	24801656	-	G	C	TNRC6A	p.Val565Leu	Missense
F14	4	76569612	-	C	T	G3BP2		3'UTR
TWIN	3	78647187	-	T	C	ROBO1		3'UTR
TWIN	1	160515108	-	G	A	CD84		(-)

表 6: 列は左から番号、家族 ID、染色体番号、染色体上の位置、dbSNP の rs 番号、参照アレル、変異アレル、遺伝子名、アミノ酸置換、変異タイプを記載した。

表 7 非同義置換

ID	chr	sex	location	rsID	Ref	Alt	gene	Amino acid change
F02	5	female	38955743	rs140964083		G	A RICTOR	p.Arg855Trp
F05	3	male	27243016	(-)		G	C NEK10	p.Thr156Arg
F07	7	male	129091523	(-)		G	T FAM40B	p.Arg115Leu
F13	16	female	24801656	(-)		G	C TNRC6A	p.Val565Leu

表 7: 列の記号は表 6 と同一である。

3-4 サンガー法での確認

29 か所すべてについてサンガー法で De novo 変異が確認された。

非同義置換のサンガーシーケンスの波形を示す（図 10）。

図 10-1 非同義置換のサンガー波形その 1

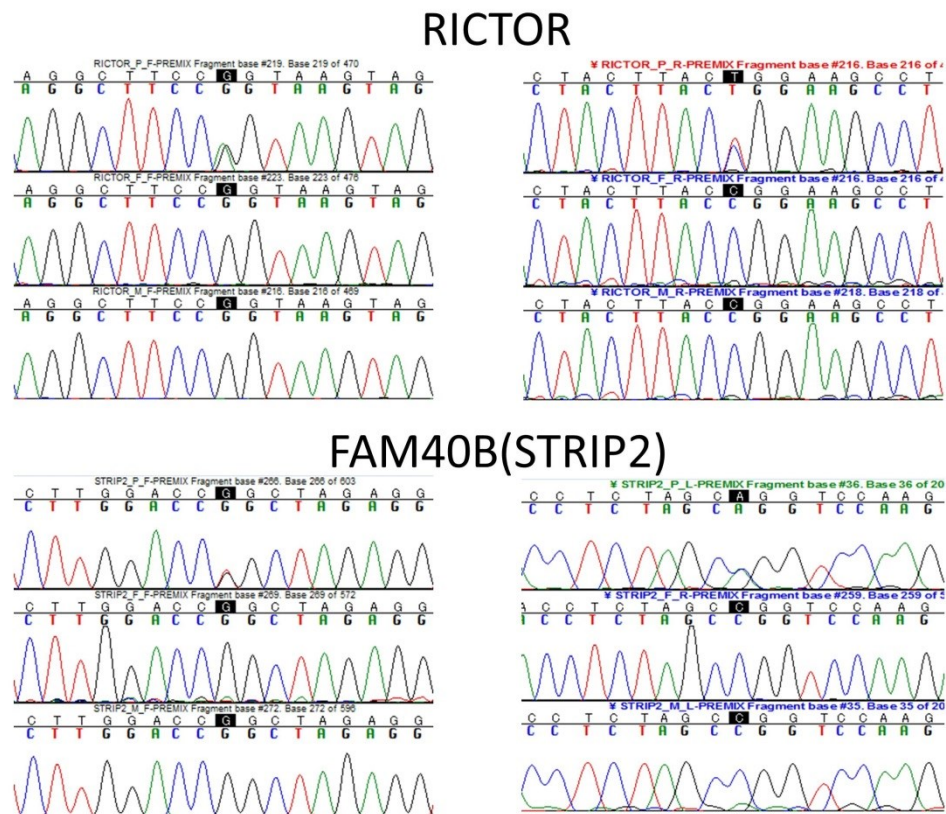


図 10-1: *RICTOR* と *FAM40B* のサンガー法の波形を示した。各図最上段が患者、中段が父親、下段が母親の波形を示す。

図 10-2 非同義置換のサンガー波形その 2

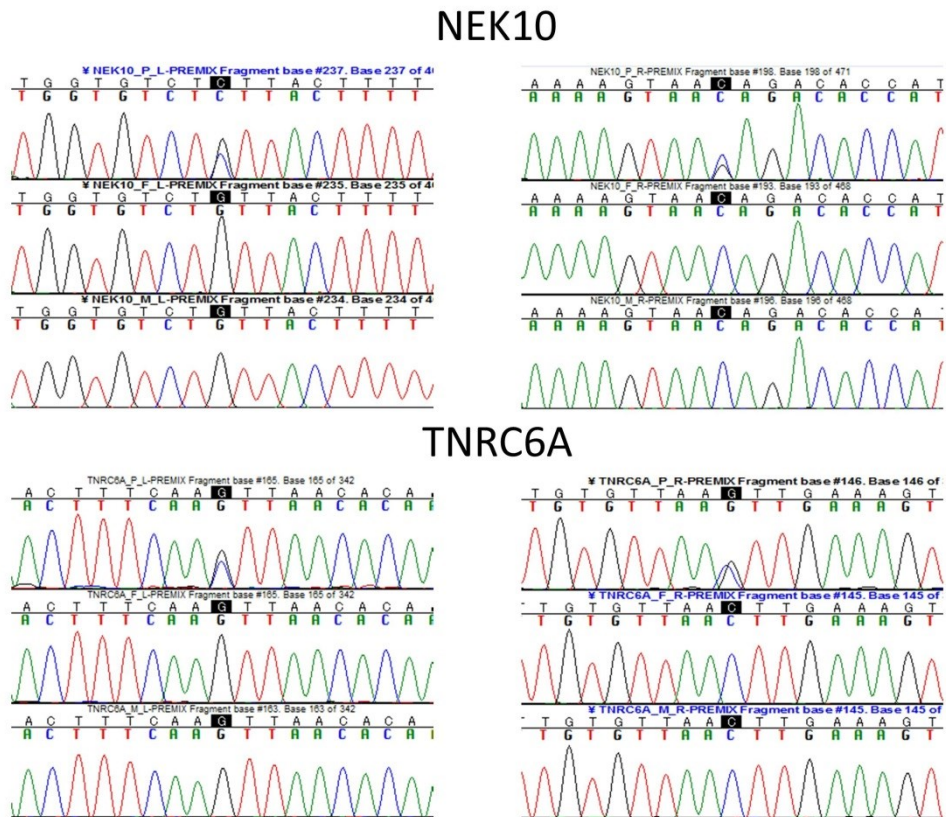


図 10-2: 配列の順序は図 10-1 と同一である。

3-5 機能予測

4 つの非同義置換について、アルゴリズムによる機能予測を行った。*RICTOR* に位置する変異のみが、Polyphen2, SIFT/PROVEAN でともに有害と予測された (表 8)。

表 8 Polyphen2 と SIFT/PROVEAN による機能予測

ID	sex	gene	Polyphen2-prediction	Polyphen2-class	PROVEAN_PREDICTION	SIFT_PREDICTION
F02	female	RICTOR	probably damaging	deleterious	Deleterious	Damaging
F05	male	NEK10	benign	neutral	Neutral	Tolerated
F07	male	FAM40B	benign	neutral	Neutral	Tolerated
F13	female	TNRC6A	benign	neutral	Neutral	Tolerated

表 8: 列は左から染色体番号、染色体上の位置、参照アレル、変異アレル、遺伝子名、Polyphen2 の予測、Polyphen2 の分類クラス、Grantham スコア、GERP スコア、PROVEAN の予測、SIFT の予測を示す。

3-6 健常者集団との比較

京都 DB の日本人健常者集団および 1000 genome project の日本人集団には *RICTOR* の同一 SNV アレルは存在せず、*RICTOR* の他の座位に存在する有害アレルもみられなかった。そのため、本研究で同定した *RICTOR* に位置する変異アレルは、有害であると予測され、*RICTOR* の有害アレルは日本人健常者集団においては極めて稀であるため、トゥレット症候群の発症に影響を及ぼす rare variant である可能性が高いと考えられた。

3-7 中枢神経での解剖学的部位・発達段階特異的発現

非同義置換の位置する 4 遺伝子について、Kang[100]の定義に従って脳バンクに登録されているサンプルの発現情報を 15 の発達段階、さらに 16 の解剖学的構造に分類した(表 9)。 *RICTOR* は period11 から 12 にかけて線条体で発現が相対的に上昇し、*FAM40B* は一貫して線条体での発現が亢進していることが確認された (図 11)。

表 9-1 発達段階の区分

Period	Description	Age
1	Embryonic	4PCW≤Age<8PCW
2	Early fetal	8PCW≤Age<10PCW
3	Early fetal	10PCW≤Age<13PCW
4	Early mid-fetal	13PCW≤Age<16PCW
5	Early mid-fetal	16PCW≤Age<19PCW
6	Late mid-fetal	19PCW≤Age<24PCW
7	Late fetal	24PCW≤Age<38PCW
8	Neonatal and early infancy	0M (birth)≤Age<6M
9	Late infancy	6M≤Age<12M
10	Early childhood	1Y≤Age<6Y
11	Middle and late childhood	6Y≤Age<12Y
12	Adolescence	12Y≤Age<20Y
13	Young adulthood	20Y≤Age<40Y
14	Middle adulthood	40Y≤Age<60Y
15	Late adulthood	60Y≤Age

表 9-1: 15 の発達段階の区分を示す。PCW＝妊娠後の週数、M＝誕生後の月齢、Y＝誕生後の年齢を示す。

表 9-2 脳構造の略称

Abbreviation	Long form
DFC	Dorsolateral prefrontal cortex
VFC	Ventrolateral prefrontal cortex
MFC	Medial prefrontal cortex
OFC	Orbital prefrontal cortex
M1C	Primary motor cortex
S1C	Primary somatosensory cortex
IPC	Posterior inferior parietal cortex
A1C	Primary auditory cortex
STC	Posterior superior temporal cortex
ITC	Inferior temporal cortex
V1C	primary visual cortex
HIP	Hippocampus
AMY	Amygdala
STR	Striatum
MD	Mediodorsal nucleus of the thalamus
CBC	Cerebellar cortex

表 9-2: 脳構造の略称と正式名称の対応を記載した。

図 11 非同義置換のみられた遺伝子の発達段階・脳構造特異的な発現パターン

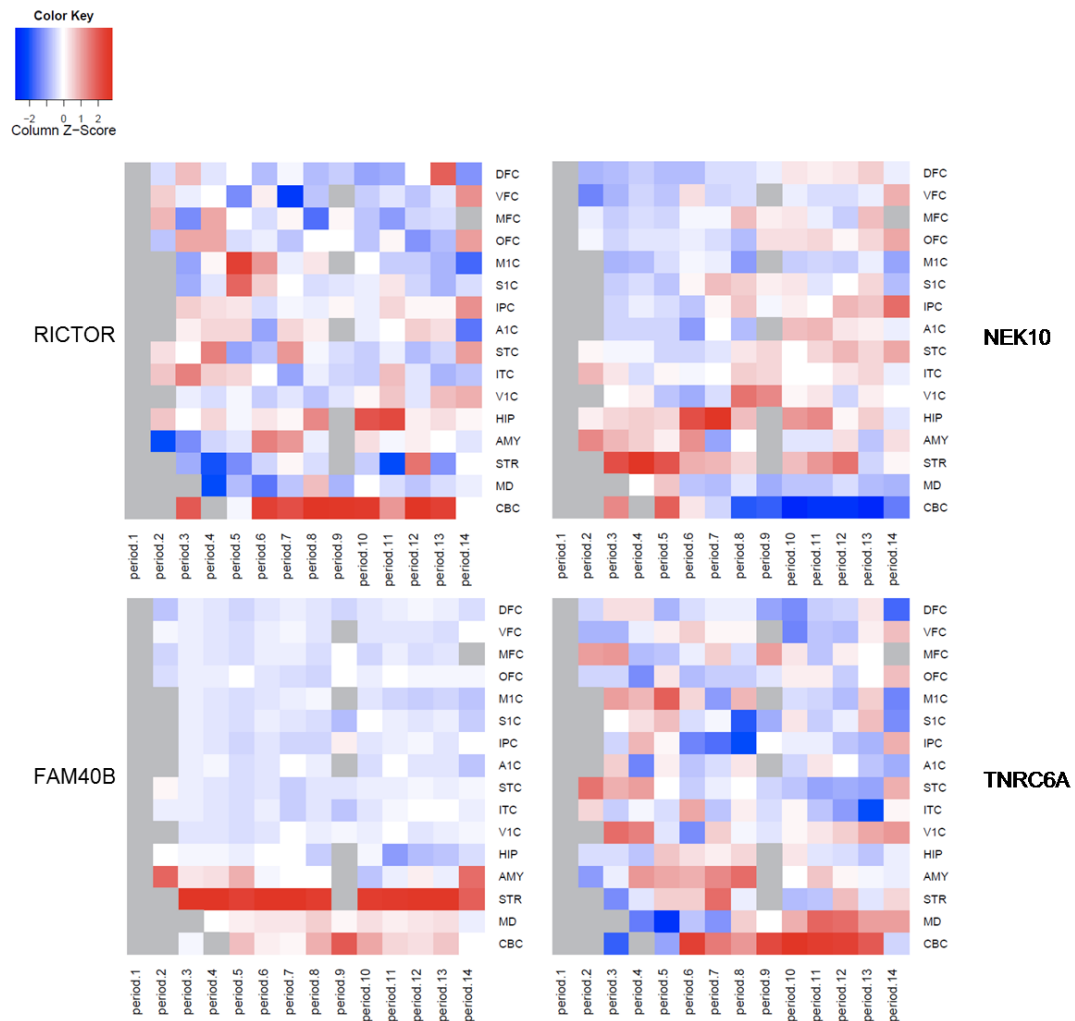


図 11: 横軸が発達時期、縦軸が脳構造に対応している。時期ごとに各脳構造での発現量を正規化し、Z スコアを用いて高発現の部位は赤、低発現は青で示した。灰色の領域は対応するサンプルが欠如している。

4. 考察

トゥレット症候群の女性では、孤発例で家族例に比べてチックが重症であった。この結果からは、孤発例の原因が解明されることで、より重症のチックで病態解明が進展する可能性が示唆され、孤発例の遺伝子異常を解明することを意図した本研究の臨床的意義を補強すると考えた。なお、男性では孤発例で強迫症状が軽症という結果も得られたが、孤発例の方が家族例よりも強迫症状が軽度だとする先行研究[103]と矛盾しなかった。

家族例の集団では、男性の人数が女性の 3.83 倍とほぼ 4 倍になっている。一方で、孤発例の集団では、一卵性双生児を含めた場合で 1.33 倍、除外した場合で 2 倍と、一般的なトゥレット症候群の集団の男女比である 4:1[9]に比べて女性の比率が高くなっている。そのため、本研究の孤発例の集団は、トゥレット症候群としては特殊な集団である。また孤発例集団の両親の出生時の年齢は高くなることが予想される[44]が、平均で父親が 32.9 歳、母親が 31.5 歳と父親の年齢は高くない。そのため、孤発例の集団としても特異である可能性がある。

エクソームエクソームシーケンスにより、29 か所の De novo 変異を特定し、うち 4 か所が非同義置換だった。この 4 か所の中で *RICTOR* に位置する De novo 変異のみが Polyphen2, SIFT/PROVEAN のアルゴリズムを用いて有害アレルと予

測され、機能に重大な影響を及ぼすことが示唆された。

RICTOR に位置する有害アレルは日本人健常者または一般集団においては非常に稀であるため、本研究で特定された *De novo* 変異が、稀な有害変異であることを間接的に支持すると考えられた。また、*RICTOR* は健常者の線条体において、思春期にかけて発現が相対的に上昇していることから、発現量とトゥレット症候群の悪化時期に関連があることが示唆される。その一方で、5-6 歳時の発症時点については、発現量との関連から説明することは困難である。ただし一般的に原因遺伝子の表現パターンと病理学的なパターンは一致しないため、さらなる研究が必要である。

RICTOR は線条体の他に、海馬では 0-12 歳にかけて、扁桃体では胎児期後期に、小脳皮質では胎児期早期から成人期にいたるまで高発現となっている。海馬・扁桃体から腹側線条体には、太い神経線維が投射しており、皮質-線条体-視床-皮質回路の一部となっているため[104][105][106][107][108]、海馬や扁桃は線条体の活動性に影響を与えている。MRI を用いた研究では、トゥレット症候群患者の海馬・扁桃体の体積が健常対照に比べて、大きいことが示されている[109]。小脳は運動[110]・言語機能[111][112]の制御に関わっており、トゥレット症候群では両側の上半月小葉・下半月小葉・後四角小葉・二腹小葉で灰白質の体積が健常対照に比べて小さいことが MRI を用いた研究で示されている[113]。

そこで、*RICTOR* に重点を置きつつ、4 か所の De novo 変異について検討した。

4-1 *RICTOR* の De novo 変異

RICTOR がコードするタンパク *RICTOR* (rapamycin-insensitive compamion of mTOR)は、ホメオスタシスの制御をする mTOR シグナリング経路 (mTOR signaling pathway)に深く関わっている。

4-1-1 mTORC(mTOR 複合体)の構造と *RICTOR*

mTOR (mechanistic target of rapamycin)はセリン/トレオニン キナーゼで、神経細胞を含め真核細胞では普遍的に発現している[114]。mTOR の構造を図 12A に示す。mTOR の機能はそれ自身を含むタンパク複合体である、mTORC1, mTORC2 として実行される。mTORC1, mTORC2 の構造を図 12B に示す。mTOR, mLST8 (もしくは G β L), DEPTOR は両方に共通するが、Protor, *RICTOR*, mSIN1 は mTORC2 に特徴的である。このうち *RICTOR* と mSIN1 は mTORC2 の機能に不可欠だと考えられており、特に *RICTOR* は足場となり mTORC2 の形態維持に貢献している。

mTOR と mTORC1 の RAPTOR や mTORC2 の *RICTOR*、その他のタンパクとの相互作用は HEAT (Hutington, elongation factor 3, a subunit of phosphatase 2A and TOR1) repeat が仲介する[115]。

図 12 mTOR と mTOR 複合体の構造(文献[115]より改変)

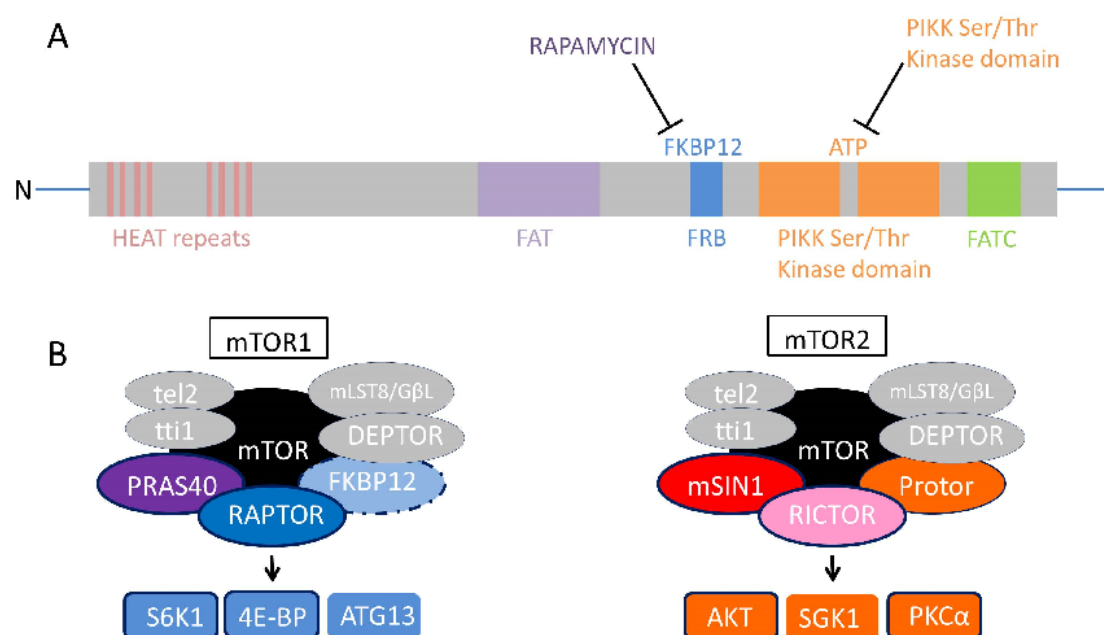


図 12: A. mTOR 遺伝子の機能ドメインを示す。B. 左は mTOR1 複合体、右は mTOR2 複合体とその構成タンパクを表している。

Pfam[116]より得られた *RICTOR* の翻訳タンパクのドメインを図 13 に示す。本研究で同定された SNV は *RICTOR* の RasGEF N 末端ドメインに位置する。Ras GEF (Guanine nucleotide exchange factor for Ras-like small GTPases) タンパクは、Ras ファミリーのためのグアニン核酸交換因子という意味である。

Ras ファミリーは GTPase 活性を持った低分子タンパクである。Ras ファミリーのタンパクは GDP と結合した状態では不活発だが、RasGEF により GDP が GTP に交換されると活性化する。RasGEF は Ras ファミリータンパクを活性化することにより、細胞外シグナルを細胞内に伝達していると考えられている[117]。

Ras ファミリーは転写や細胞増殖、細胞の運動性、細胞死の抑制などに関わっている。Ras は MAP キナーゼファミリーの制御、神経可塑性（シナプス長期増強・長期減弱・シナプス脱増強）、学習と記憶、精神作用物質への反応などに関わっていると想定されている[118]。

図 13 *RICTOR* 翻訳タンパクの機能ドメイン



図 13 本研究で同定された SNV は *RICTOR* の RasGEF N 末端ドメインに位置する。

4-1-2 mTOR signaling pathway

mTOR signaling pathway は、脳神経に関連がある細胞外の因子である神経栄養因子 (BDNF)・インスリン・insulin-like growth factor (IGF1)・vascular endot

hepatic growth factor (VEGF)・ciliary neurotrophic factor (CNTF)・グルタミン酸・
誘導分子などによって活性化される[139][140][141][142]。

mTORC1 は GTPase である Rheb により活性化されるが、Rheb は TSC1・TSC2・
TBC1D7 によって構成される TSC に抑制される[143][144]。TSC は ERK, p90-R
SK・AKT・GSK-3 β により抑制される。さらに上流では PTEN が PI3K を不活化
することにより、mTOR signaling pathway を不活化する。

mTORC1 がリボソームの組み立てを促進し、mTOR2 は mTOR の Ser-2448 部
位で mTORC1 の活性を調節する[145]ため、mTORC1 と mTORC2 は互いの働き
を制御し合っているといえる。mTORC2 の役割については mTORC1 に比べると、
研究が進んでいないが、Akt の Ser473 部位をリン酸化し、Akt を活性化すること
や、細胞の生存・アクチンの細胞骨格の維持・アクチン豊富な樹状突起棘の形
態維持[146][147][148][149]・細胞接着[150]に関わっていると考えられている(図 1
5)。mTORC1 はその下流の 4E-BPs と S61K 1/2 を通して転写・タンパク合成を
促進している。 mTORC1 は転写因子である SREBPs、PGC1 α 、HIF
1 α に作用することにより、脂質合成・ミトコンドリア合成・低酸素環境への
応答などを制御している。また、ULK1 を阻害することで細胞の自食作用を抑制
している。

図 14 mTOR signaling pathway(文献[115]より改変)

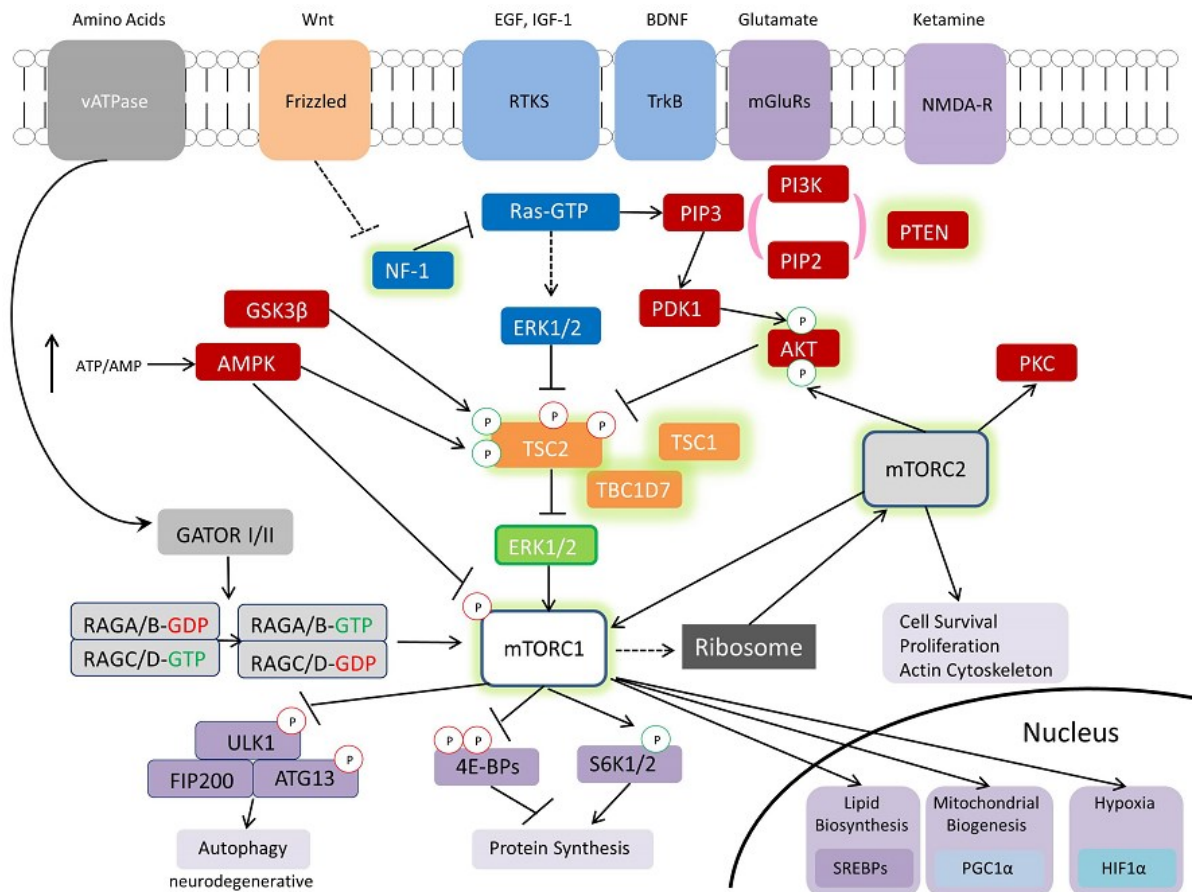


図 14: 細胞内での mTOR pathway の機能を図示した。mTOR2 複合体は図の中段右方に描かれている。

4-1-3 mTOR の脳神経内での機能

mTOR に重大な変異をもつマウスは終脳を欠如した状態になるため、mTOR は脳神経の早期発達において重要だと考えられる[151]。反対に *TSC1/2* または

PTEN の機能欠失により *mTOR* signaling の機能亢進した状態も、神経分化や構造に悪影響を及ぼす。

TSC2 の機能異常により網膜神経細胞のマッピングに異常が起こることがわかっており、*mTOR* signaling は軸索誘導を制御する役割を持ち[141]、神経回路形成にも重要な役割をもつと考えられている。

ザリガニ・アメフラシの実験ではラパマイシンが長期記憶形成を阻害し[152][153]、また海馬をラパマイシンで処理すると長期増強が阻害される[154]。そのため *mTOR* signaling はシナプス可塑性・学習・記憶形成にも関与していると考えられている。また *mTOR* signaling はカロリー摂取行動を制御し、体内のホメオスタシス維持に貢献していると考えられている[155][156][157]。

4-1-4 *mTOR* と精神・神経疾患

NF1・*PTEN*・*TSC1/2* の機能が阻害されると、タンパク合成が障害されることになり、細胞の形態学的異常・神経回路形成異常・その結果としてのシナプス可塑性の異常などが生じて、知的障害・てんかん・自閉症などの神経発達障害の発症につながる（図 15）。

ULK1/2 複合体の機能が障害されて自食作用が低下すること、および *PGC1-*

α の機能が阻害されてミトコンドリア合成が障害されることにより、有害なタンパクの蓄積や老化現象の促進が起きて、アルツハイマー病・パーキンソン病・ハンチントン病など神経変性疾患の発症に関与すると想定されている(図 16)。

RICTOR 自体は精神疾患との関連は、後述の統合失調症マウスモデルで報告されている以外には、報告はない。

図 16 mTOR signaling pathway の異常と神経発達障害（文献[115]より改変）

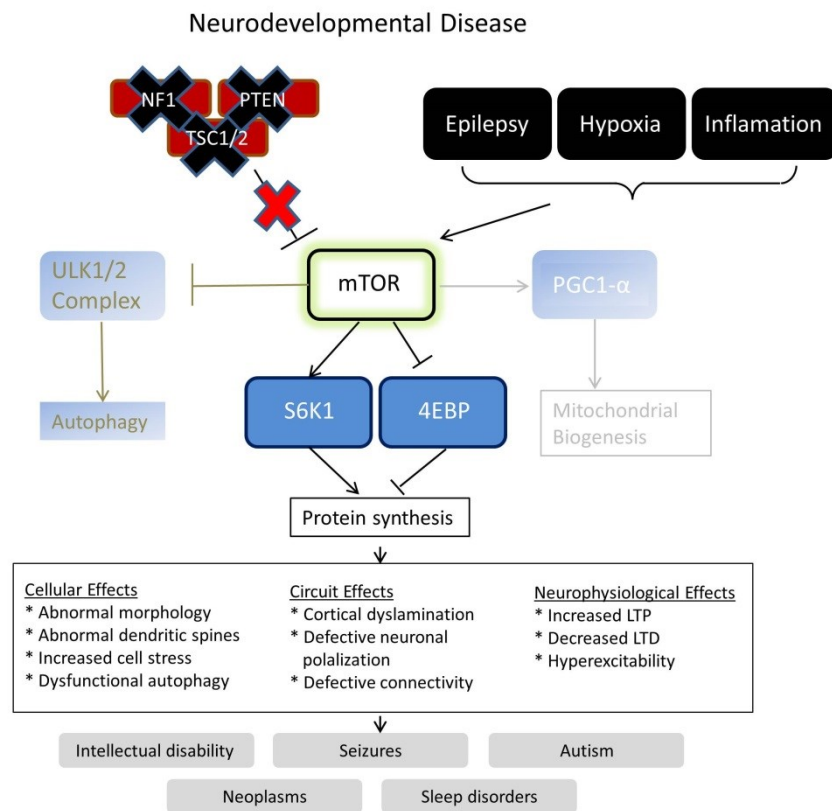


図 15: *NF1*, *PTEN*, *TSC1/2* の異常や、てんかん・低酸素・炎症などにより mTOR signaling pathway に障害が起き、結果として知的障害・けいれん発作・自閉症・悪性腫瘍・睡眠障害などが出現する。

図 16 mTOR signaling pathway の異常と神経変性疾患（文献[115]より改変）

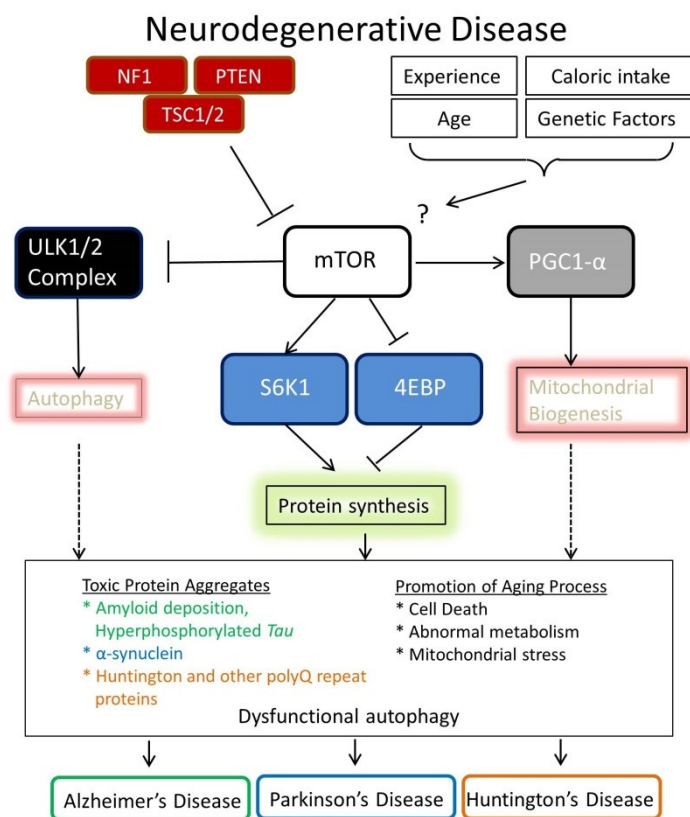


図 16: 加齢・カロリー過多・遺伝的要因などの複合作用で mTOR signaling pathway に障害が起き、結果としてアルツハイマー病やパーキンソン病、ハンチントン病などが引き起こされると考えられている。

また、上述の通り mTOR signaling は精神疾患・発達障害や神経変性疾患に大きく関与している。仮に *RICTOR* がトゥレット症候群の候補遺伝子であるならば、これらの疾患と発症機序に共通点を持つことになる。そのため患者の家族歴から、チックに加えて精神疾患の通院歴や、パーキンソン病などを除外したことは必要だったと考えた。

mTOR シグナリング経路の異常と関連が報告されている神経変性疾患・神経

発達障害・精神疾患と原因遺伝子の一覧を示す（表 10）。

表 10 mTOR signaling pathway の異常に関連する神経精神疾患（文献[115]より改変）

Neurological Disorders Associated with Dysfunctional mTOR Pathway Signaling				
Disease	Responsible Gene Product	Neurological Manifestations	Pathway Activity	Reference
Neurodevelopmental				
Tuberous sclerosis complex	TSC1 or TSC2	E, ASD, ID, tubers, hamartomas, multisystem benign tumors	up	Crino et al., 2006
TBC1D7 syndrome?	TBC1D7	ID, macrocrania, neuropsychiatric	up?	Alfaiz et al., 2014
Autism spectrum with macrocephaly	PTEN	ASD, E, MacroC	up	Zhou and Parada, 2013
Cowden syndrome	PTEN	MacroC, ± ID, CA	up	Pilarski et al., 2013
Bannayan-Riley-Rulvalcaba syndrome	PTEN	MacroC, polyps, ± ID, skin, WM cysts	up	Pilarski et al., 2013
Lhermitte-Duclos disease	PTEN	dysplastic gangliocytomas of the cerebellum	up	Pilarski et al., 2013
Neurofibromatosis type I	NF1	ID, E, OPG	up	Diggs-Andrews and Gutmann, 2013
Nonsyndromic autism	PTEN, mTOR, ?AKT, others...	ASD, E?	up/down	O'Roak et al., 2012
Epileptic encephalopathy	mTOR, others	E, ID	?	Allen et al., 2013
Neurodegenerative				
Alzheimer disease	APP, Presenilins, others	dementia	up?	Caccamo et al., 2011; Spilman et al., 2010
Parkinson disease	α-synuclein, Parkin, PINK1, LRRK2, others	movement disorder, dementia	up?	Bove et al., 2011
Huntington disease	Huntingtin	movement disorder, neuropsychiatric	up?	Ravikumar et al., 2007
Psychiatric				
Major depressive disorder	?	decreased mood, suicidality	down?	Autry et al., 2011; Li et al., 2011
Schizophrenia	AKT1, DISC1, others	hallucinations, delusions, thought disorder, depression	up/down?	Emamian et al., 2004; Kim et al., 2009; Zhou et al., 2013

ASD, autism spectrum disorder; E, epilepsy; ID, intellectual disability; MacroC, macrocephaly; MicroC, microcephaly; OPG, optic pathway glioma; WM, white matter.

表 10: 左から疾患名・原因遺伝子・神経学的所見・pathway の活性の増減・参照文献を記載した。

4-1-5 動物モデルでの知見

神経幹細胞特異的なプロモーター配列である Nestin の後部に組み換え酵素 Cre

を導入したマウスと、*RICTOR* の前後に組み換え標的配列である loxP 配列を導

入したマウスを交配することで、マウスの神経細胞特異的に *RICTOR* をノックアウトすることができる(nRictor KO mice)ことが報告されている[159]。nRictor KO mice の背側線条体では対照群に比べ、細胞膜上のドパミン輸送体の密度・ドパミン取り込みが亢進し、Akt Ser473 部位のリン酸化が低下している[160]。行動面では nRictor KO mice は対照群に比べ自発運動が増加し、繰り返し動作が顕著に増加し、アンフェタミンに過剰反応し、投与後に自発運動が極端に増加する[160]。また腹側線条体でのドパミン D2 受容体の発現量が上昇し、その結果 ERK1/2 のリン酸化が亢進しているが、これらはハロペリドールの投与により対照群と差がない状態に変化する[160]。アンフェタミン投与後の自発運動の増加は、ハロペリドール投与により打ち消される[160]。さらにアデノ随伴ウイルスの一種である、rAAV-Cre ベクターを *RICTOR* の前後に loxP 配列を導入したマウスの背側線条体に注入し、背側線条体の *RICTOR* を選択的に発現消失させると、アンフェタミン投与への過剰発現が亢進する[160]。そのため *RICTOR* の機能を後天的に消失させても、類似の結果が起きているといえる。

これらの知見のうち線条体でのドパミン取り込みの亢進は、トゥレット症候群患者でも報告されている[23][24][25][26]。マウスの繰り返し行動は、ヒトにおけるチックや強迫症状に対応すると考えられており、繰り返し行動の増加したマウスをトゥレット症候群や強迫性障害のモデルとしている[161][162][163][164]

[165]。またトゥレット症候群の薬物治療では主にハロペリドールが用いられ、前述のとおりアンフェタミン投与でチックは顕著に増悪する。そのため **nRictor KO mice** はトゥレット症候群と、行動面・病態生理・薬物投与後の変化に於いて類似点がきわめて多い。

nRictor ノックアウトマウスは、統合失調症のモデルマウスとして開発されている。*RICTOR* のノックアウトマウスにみられた常同運動も、トゥレット症候群のモデルマウスにみられた常同運動も、毛づくろい・仰け反る・頭を動かして鼻を鳴らす・舌を突き出す・顎の震え・ケージを噛む・自分の身体を噛む・頭を振るなどの行動レパトリー[166]の繰り返しを示しているため、類似していると考えられる。

トゥレット症候群と統合失調症は、ともにアンフェタミンなどドパミン作動薬で症状が増悪し、ハロペリドールなどのドパミン受容体拮抗薬で症状が軽減する。驚愕刺激の直前に微弱な刺激が先行することにより、驚愕反応が減弱することをプレパルス・インヒビション (PPI) と呼ぶが、トゥレット症候群[167]と統合失調症[168]の患者では PPI が低下していることが示されている。

これらのことは *RICTOR* がトゥレット症候群の候補遺伝子であることを間接的に支持すると考えられる。

4-1-6 癌と *RICTOR*

癌細胞の体細胞変異データベースである、COSMIC[169]では癌細胞の体細胞変異のうち、*RICTOR* の SNV や Indel が同定された組織は表 11 の通りである。本研究で同定された SNV は *RICTOR* の RasGEF N 末端ドメインに位置するが、Ras には KRAS, NRAS, HRA の 3 つの遺伝子があり、いずれも癌を引き起こすことが知られている[170]。*RICTOR* の体細胞変異が多様な癌で同定されたことは、*RICTOR* タンパクが Ras ファミリーとしての活性を持つことを間接的に支持している。

表 11 COSMIC に登録された体細胞変異

Tissue	%Mutated	Mutated	Tested
Adrenal gland	0.41	1	241
Bone	0.40	2	496
Breast	1.20	19	1583
Central nervous system	0.33	7	2128
Cervix	2.19	7	320
Endometrium	2.54	16	631
Haematopoietic and lymphoid	0.28	6	2139
Kidney	0.67	11	1654
Large intestine	3.02	41	1356
Liver	1.12	18	1611
Lung	1.49	32	2145
Oesophagus	1.77	14	791
Ovary	0.79	7	889
Pancreas	0.39	6	1529
Prostate	0.37	4	1077
Skin	3.45	35	1014
Soft tissue	0.94	4	427
Stomach	3.41	20	587
Upper aerodigestive tract	0.19	2	1026
Urinary tract	1.23	8	652

表 11: COSMIC に登録された体細胞変異のうち、SNV, Indel を抜粋した。各行は検体病理組織を表す。

4-1-7 遺伝子間相互作用

RICTOR と本研究で非同義置換が同定された他の遺伝子 *FAM40B*・*NEK10*・*TNRC6A*、およびトゥレット症候群の候補遺伝子とされる *SLITRK1*・*HDC*・*IMMP2L*・*NLGN4*・*CNTNAP2* との機能面での関連を探索するために、GeneMANIA を用いた。*RICTOR* とその他の 3 遺伝子、およびトゥレット症候群の候補遺伝子との間に直接的な相互作用・共発現・局在の類似などはみとめなかった。また

トゥレット症候群と対照群で CNV を比較した研究[171]で、トゥレット症候群に有意に多く、2 名以上のトゥレット症候群患者が保持していた CNV が存在する 26 遺伝子と *RICTOR* の相互作用を調べたところ、*PPP2R2B* との間にタンパク間相互作用があり、*DNAJC15* との間に発現量の相関がみとめられた。トゥレット症候群と対照群との GWAS[32]で補正前の P 値が 0.001 以下だったマーカーが存在する、もしくは近傍に存在する 378 遺伝子と *RICTOR* の相互作用を調べたところ、共発現 (Coexpression)・タンパク間相互作用・発現の共調整・共通するタンパクドメインをみとめた遺伝子がみられた (表 12)

表 12 GWAS の上位マーカーと *RICTOR* の相互作用

Networks	Genes
Coexpression	<i>ARHGAP15, ZBTB21, FBXO7, SMG1</i>
Physical interactions	<i>PREX1, DEPTOR</i>
Genetic interactions	<i>DCD, ME3, LACRT, ERO1L, CYP261B, PSMC6, SMG1, BTG4, TXK, ZNF638, RGS6</i>
Shared protein domeins	<i>TAF2, ARID1B, PUM1, ELMO1, ELMO2, SMG1, RAPIGDS1, AGBL1</i>

表 12 Coexpression は共発現、Physical interactions はタンパク間相互作用、Genetic interaction は発現の共調整、Shared protein domeins は共通するタンパクドメインを指す。

4-1-8 トウレット症候群と *RICTOR*

トゥレット症候群やパーキンソン病などの運動症状で、病態との関連が想定

されてきた線条体では、神経細胞の 95%以上が中間有棘細胞である[119][120]。

黒質に直接投射する中間有棘細胞は、直接経路もしくは線条体黒質路と呼ばれ

る回路を形成し、黒質以外の構造（例えば淡蒼球外側・視床下核）を経て黒質

に投射する中間有棘細胞は、間接経路もしくは線条体淡蒼球路と呼ばれる[121]。

中間有棘細胞はドパミン神経の支配を受けているが、直接経路の細胞表面には D

1 受容体が主に発現し、間接経路の表面には D2 受容体が発現しており[122]、大

まかに直接経路は運動を開始するのに必要で、間接経路は余計な動きを抑制す

るのに必要だと考えられている[123][124]。

このうち直接経路ではドパミンが結合した D1 受容体が $G\alpha_{olf}$ 、アデニル酸シ

クラゼを活性化し[125][126]、ATP から cAMP を合成する。cAMP はプロテイ

ンキナーゼ A (PKA) をリン酸化し、PKA は DARPP-32 を活性化する[127]。D

ARPP-32 は PP1 を抑制し[127]、ERK を活性化する。活性化された ERK は Δ fos

B[128][129]と mTORC1[130][131]を活性化する。PP1 が抑制され Δ fosB と mTOR

C1 が活性化された状態で LTP (Long-term potentiation) が起きる[132]。LTP、L

TD (Long-term depression)、脱増強のバランスによって線条体シナプスの可塑性

が維持されている（図 14） [133]。ERK は Ras-GTP によってリン酸化された Raf

により MEK とともに活性化する回路も存在する[133]。

パーキンソン病などの変性疾患では線条体シナプスの可塑性が障害されてい

ることが報告されている[134]。特にパーキンソン病患者が長期間レボドパを投与された後に出現する、レボドパ誘引性ジスキネジア[135]では、直接経路において D1 受容体から ERK を経るカスケードの機能が亢進しているために、LTP が亢進し、LTD と脱増強が障害されていることが、不随意運動の原因の一つと考えられている[133][136]。

図 17 直接経路でのシナプス可塑性の変化（文献[133]より改変）

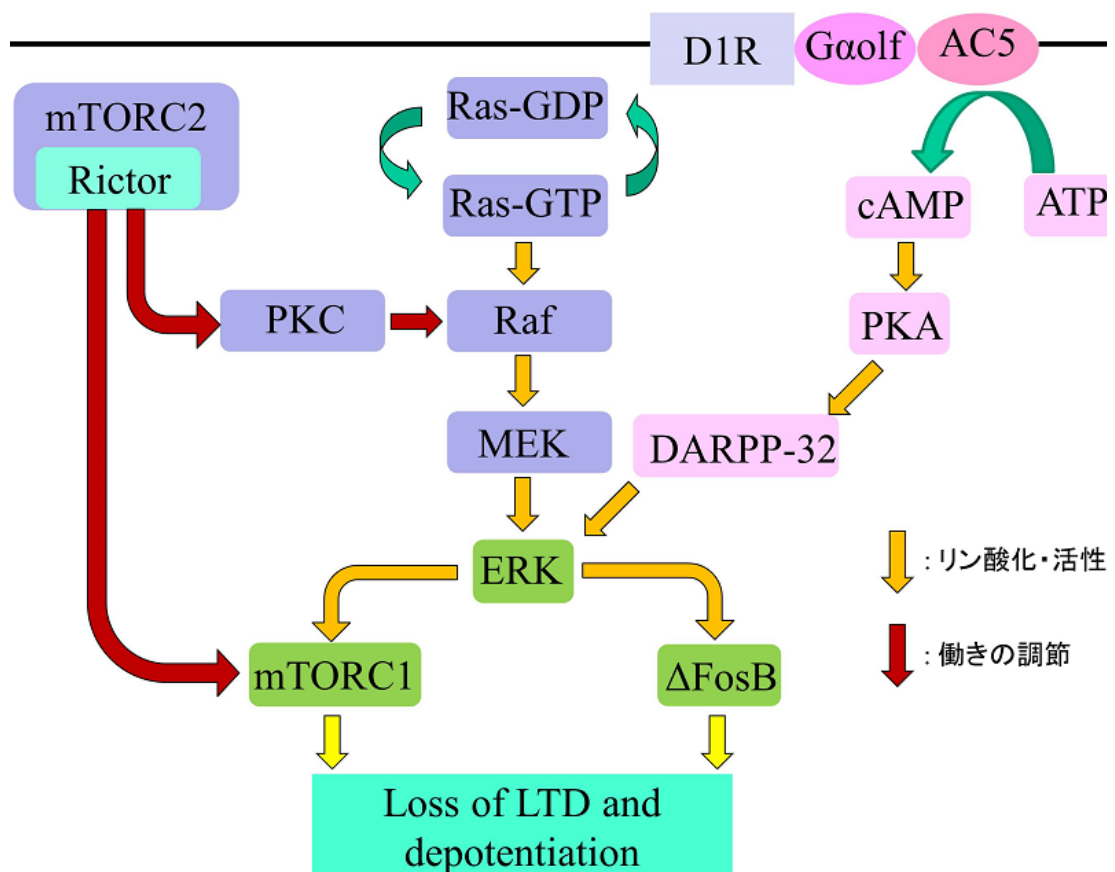


図 17: D1 受容体・Ras のカスケード反応を示す。D1 受容体・Ras いずれのカスケードも ERK のリン酸化を経て、長期増強を促進する。いずれかのカスケード反応の亢進により、長期減弱・脱増強が阻害される。

トゥレット症候群患者の線条体ニューロンのシナプス可塑性についての報告はないが、末梢からの神経電気刺激と運動野への経頭蓋磁気刺激を繰り返す、連合性ペア刺激を利用した研究[137]で、運動野のニューロンのシナプス可塑性に健常対照との間に差異がみられており、線条体ニューロンのシナプス可塑性にも差異がある可能性がある。

本研究で同定した RICTOR 遺伝子の変異が存在する、RasGEF モジュールは、Ras-GDP から Ras-GTP への変換を促し[138]、下流の Raf、MEK、ERK の活性化を促す[133]。そのため、RasGEF モジュールの活動性の変化により線条体ニューロンのシナプス可塑性に変化が生じて、トゥレット症候群でみられる運動症状が出現している可能性がある。

4-2 *FAM40B*

前述のとおり尾状核は MRI を用いた形態学的研究で、一貫して体積縮小が報告されており[20]、その度合いが成人後のチックの重症度と相関を示している[21]。トゥレット症候群の線条体のドパミン神経の機能異常が指摘されてきており、線条体はトゥレット症候群発症において重要な部位だとみなされている。

FAM40B は Period3（妊娠 13 週）から Period14(40 歳～60 歳)まで一貫して線条体

で発現が上昇している。また **Period2** の未熟な神経構造を成熟後の構造(表 12)に分類したところ、**Period2** でも線条体の *FAM40B* の発現が上昇していた (図 17)。そのため *FAM40B* は妊娠 8 週後の時期から発現上昇していることがわかった。

またトゥレット症候患者の死後脳線条体では、健常人に比べ *FAM40B* は発現低下していた[102]ことから、*FAM40B* の機能不全・発現低下とトゥレット症候群発症の関連性も推測される。

FAM40B は striatin-interacting phosphatase and kinase (STRIPAK) complex の一部として細胞の増殖や分化を制御していると考えられている[172]。

表 13 **Period2** 一時的・未熟な構造と成熟した構造の対応

一時的な構造・未熟な組織	成熟した構造
motor-somatosensory cortex (M1C/S1C)	Primary motor cortex (M1C)
parietal neocortex	Primary somatosensory cortex (S1C)
parietal neocortex	Posterior inferior parietal cortex (IPC)
temporal neocortex	Primary auditory cortex (A1C)
occipital neocortex	primary visual cortex (V1C)
lateral ganglionic eminence	Striatum (STR)
medial ganglionic eminence	Striatum (STR)
caudal ganglionic eminence	Striatum (STR)
dorsal thalamus	Mediodorsal nucleus of the thalamus (MD)
Upper (rostral) rhombic lip	Cerebellar cortex(CBC)

表 13: 一時的・未分化な構造と成熟後の構造の対応を記載した。

図 18 Period2 を含めた *FAM40B* の発現傾向

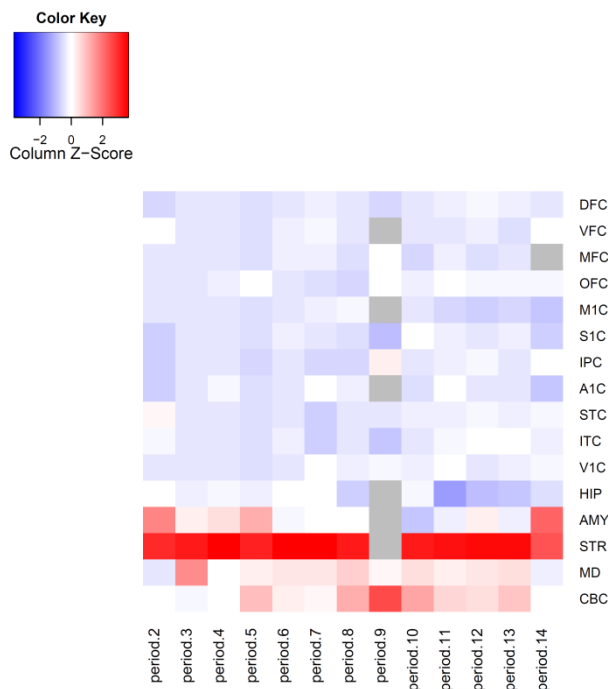


図 18: *FAM40B* について、未分化・一時的構造を成熟後の構造に対応させて、ヒートマップを再構成した。

4-3 *NEK10*

NEK10 は、有糸分裂のサイクルを制御する NEK(NIMA Related Kinase)ファミリーに属し、主に紫外線により DNA 損傷が起きた細胞の G2 期から M 期への移行を阻害し、DNA 複製を停止させる役割を担っている[173][174]。*NEK10* は乳癌との関連の報告が数編ある[175][176]。

4-4 *TNRC6A*

TNRC6A は核内・細胞質内でアルゴノートタンパクを誘導して、マイクロ RNA を介した遺伝子サイレンシングを制御している。*TNRC6A* は細胞質ではアルゴノートタンパクとともに、mRNA への転写抑制をしたり、mRNA の分解を惹起している。核内では機序が不明だが、遺伝子サイレンシングに関わっていると考えられている[177][178][179]。

TNRC6A はハンチントン病の関連遺伝子の *Hungtintin* の発現制御にも関わっており[180]、卵黄嚢の成長にも必要であるという報告もある[181]。また食道癌・前立腺癌[182]・胃癌・直腸癌[183]の発症にも関与すると報告されている。

4-5 考察の総括

本研究で得られた孤発例での *RICTOR* の遺伝子変異が、原因遺伝子であることを検討するためには、さらなる検証実験が必要である。動物実験では、*RICTOR* のノックアウトマウスを作製し、チック関連行動を明確に確認することが求められる。遺伝子研究的には、トゥレット症候群の多数の患者と、チックのない健常対照群の *RICTOR* 遺伝子のシーケンスを行い、有害な変異の数を比較し、統計学的な差を検討し、発症と遺伝子変異の関連を確認することが求められる。

トゥレット症候群の患者の多くは、複合的な遺伝形式による発症と考えられ、孤発例の方が少ない。しかし本研究で示された通り、孤発例の方が重症である傾向があるので、トゥレット症候群の重症例の病態解明や、治療法の探索に貢献する可能性がある。

4-6 本研究の限界

第一に両親の幼少期・思春期のチックの有無について、全面的に両親の記憶に基づいて評価しているが、数十年前の記憶はしばしば信頼できないことがある[184]。トゥレット症候群の孤発例の研究のために、この問題を回避するためには、長期にわたる縦断的研究が必要となる。

第二にトゥレット症候群患者本人と両親には面接することが可能だったが、その他の第二度近親およびいそこには面接できていないため、本人・両親の申告に基づく評価となっている。

第三に対照群である、家族歴のあるトゥレット症候群患者のエクソームは行っていないので、*De novo* のミスセンス変異や有害変異が、孤発例で増加しているのか、評価できていない。

第四に研究参加を断った患者・家族がおり、詳細な家族歴・環境因子が不明である。家族歴の有無が判明して、家族例もしくは孤発例に加わったとき、YGTSS、NIMH-OCS の分布が変わる可能性がある。

第五に本研究では非同義置換から候補変異を絞り込む手法をとり、また費用・計算機資源的な理由から、ホールゲノムシーケンスではなく、エクソームシーケンスの方が適切であると判断した。しかし、*non-coding* 領域については

原理的に評価できない。また CNV についてはエクソームシーケンスを用いた評価しか行っておらず、より検出率の高いマイクロアレイやホールゲノムシーケンスを用いた検出を行っていないため、十分に評価できていない可能性がある。

5. 結語

トゥレット症候群の孤発例と家族歴のある患者の臨床評価を比較し、特に女性において孤発例が家族歴のある患者より重症であることを確認した。

エクソームシーケンスにより、10 家系に 4 つの非同義置換を同定した。

そのうち *RICTOR* は 2 つのアルゴリズムにより有害な変異であると予測された。同じ座位の変異は日本人にはなく、*RICTOR* の有害変異は日本人集団には他にみられないため、この有害変異はきわめて稀な変異であると考えられた。

健常者における *RICTOR* の発現は思春期にかけて相対的に亢進しており、トゥレット症候群の経過との関連が示唆された。また、*RICTOR* は神経発達に関与する mTOR signaling pathway に含まれており、神経発達障害であるトゥレット症候群の発症に影響を及ぼしている可能性が支持される。また神経細胞特異的に *RICTOR* をノックアウトしたマウスでは、トゥレット症候群に類似したチック様の行動がみられ、トゥレット症候群で報告されている線条体のドパミン取り込

みの亢進が見られ、機能的にも *RICTOR* の有害変異とトゥレット症候群発症の関連が支持されている。

このように、トゥレット症候群孤発例のエクソンシーケンスにより見出された *do novo* 変異と、文献的考察から、*RICTOR* がトゥレット症候群の候補遺伝子として有望であると考えた。

文献

- [1] J. F. Leckman and D. J. Cohen, *Wiley: Tourette's Syndrome -- Tics, Obsessions, Compulsions: Developmental Psychopathology and Clinical Care*. Wiley & Sons, New York, 1999.
- [2] 金生由紀子, “チック障害、トゥレット障害,” in 現代児童青年精神医学, 改訂第2版 ed., 山崎晃資, Ed. 大阪: 永井書店, 2012, pp. 241–250.
- [3] APA, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision*, 4th edition. Washington, DC: American Psychiatric Association, 2000.
- [4] J. F. Leckman and M. H. Bloch, “Tic Disorders,” in *Rutter's Child and Adolescent Psychiatry*, 5版 ed., S. M. Rutter, D. Bishop, D. Pine, S. Scott, J. S. Stevenson, E. A. Taylor, and A. Thapar, Eds. Malden, Mass.: Wiley-Blackwell, 2010, pp. 719–736.
- [5] E. C. Rindner, “Living with Tourette's syndrome,” *J. Psychosoc. Nurs. Ment. Health Serv.*, vol. 45, no. 8, pp. 19–23, Aug. 2007.
- [6] C. M. Eddy, R. Rizzo, M. Gulisano, A. Agodi, M. Barchitta, P. Calì, M. M. Robertson, and A. E. Cavanna, “Quality of life in young people with Tourette syndrome: a controlled study,” *J. Neurol.*, vol. 258, no. 2, pp. 291–301, Feb. 2011.
- [7] I. Jalenques, F. Galland, L. Malet, D. Morand, G. Legrand, C. Auclair, A. Hartmann, P. Derost, and F. Durif, “Quality of life in adults with Gilles de la Tourette Syndrome,” *BMC Psychiatry*, vol. 12, no. 1, p. 109, 2012.
- [8] J. E. Swain, L. Scahill, P. J. Lombroso, R. A. King, and J. F. Leckman, “Tourette Syndrome and Tic Disorders: A Decade of Progress,” *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, vol. 46, no. 8, pp. 947–968, Aug. 2007.
- [9] J. M. Scharf, L. L. Miller, C. A. Gauvin, J. Alabiso, C. A. Mathews, and Y. Ben-Shlomo, “Population prevalence of Tourette syndrome: A systematic review and meta-analysis,” *Mov. Disord.*, vol. 30, no. 2, pp. 221–228, Feb. 2015.
- [10] F. Nomoto and Y. Machiyama, “An epidemiological study of tics,” *Jpn. J. Psychiatry Neurol.*, vol. 44, no. 4, pp. 649–655, Dec. 1990.
- [11] D. Mataix-Cols, K. Isomura, A. Pérez-Vigil, Z. Chang, C. Rück, K. J. Larsson, J. F. Leckman, E. Serlachius, H. Larsson, and P. Lichtenstein, “Familial Risks of Tourette Syndrome and Chronic Tic Disorders: A Population-Based Cohort Study,” *JAMA Psychiatry*, vol. 72, no. 8, p. 787, Aug. 2015.
- [12] R. A. Price, K. K. Kidd, D. J. Cohen, D. L. Pauls, and J. F. Leckman, “A twin study of Tourette syndrome,” *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 42, no. 8, pp. 815–820, Aug. 1985.
- [13] J. A. O'Rourke, J. M. Scharf, D. Yu, and D. L. Pauls, “The genetics of Tourette syndrome: A review,” *J. Psychosom. Res.*, vol. 67, no. 6, pp. 533–545, Dec. 2009.

- [14]C. A. Mathews and M. A. Grados, "Familiality of Tourette Syndrome, Obsessive-Compulsive Disorder, and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Heritability Analysis in a Large Sib-Pair Sample," *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, vol. 50, no. 1, pp. 46–54, Jan. 2011.
- [15]C. A. Mathews, J. M. Scharf, L. L. Miller, C. Macdonald-Wallis, D. A. Lawlor, and Y. Ben-Shlomo, "Association between pre- and perinatal exposures and Tourette syndrome or chronic tic disorder in the ALSPAC cohort," *Br. J. Psychiatry*, vol. 204, no. 1, pp. 40–45, Jan. 2014.
- [16]T.-K. Chao, J. Hu, and T. Pringsheim, "Prenatal risk factors for Tourette Syndrome: a systematic review," *BMC Pregnancy Childbirth*, vol. 14, no. 1, p. 53, 2014.
- [17]S. E. Swedo, H. L. Leonard, M. Garvey, B. Mittleman, A. J. Allen, S. Perlmutter, L. Lougee, S. Dow, J. Zamkoff, and B. K. Dubbert, "Pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections," *FOCUS*, 2014.
- [18]M. E. Hirschtritt, P. C. Lee, D. L. Pauls, Y. Dion, M. A. Grados, C. Illmann, R. A. King, P. Sandor, W. M. McMahon, G. J. Lyon, D. C. Cath, R. Kurlan, M. M. Robertson, L. Osiecki, J. M. Scharf, and C. A. Mathews, "Lifetime Prevalence, Age of Risk, and Genetic Relationships of Comorbid Psychiatric Disorders in Tourette Syndrome," *JAMA Psychiatry*, vol. 72, no. 4, p. 325, Apr. 2015.
- [19]A. Stokes, H. N. Bawden, P. R. Camfield, J. E. Backman, and J. M. Dooley, "Peer problems in Tourette's disorder," *Pediatrics*, vol. 87, no. 6, pp. 936–942, Jun. 1991.
- [20]J. A. Church and B. L. Schlaggar, "Pediatric Tourette syndrome: Insights from recent neuroimaging studies," *J. Obsessive-Compuls. Relat. Disord.*, vol. 3, no. 4, pp. 386–393, Oct. 2014.
- [21]M. H. Bloch, J. F. Leckman, H. Zhu, and B. S. Peterson, "Caudate volumes in childhood predict symptom severity in adults with Tourette syndrome," *Neurology*, vol. 65, no. 8, pp. 1253–1258, Oct. 2005.
- [22]L. Scahill, G. Erenberg, C. M. Berlin, C. Budman, B. J. Coffey, J. Jankovic, L. Kiessling, R. A. King, R. Kurlan, A. Lang, J. Mink, T. Murphy, S. Zinner, J. Walkup, and Tourette Syndrome Association Medical Advisory Board: Practice Committee, "Contemporary assessment and pharmacotherapy of Tourette syndrome," *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.*, vol. 3, no. 2, pp. 192–206, Apr. 2006.
- [23]K. R. Müller-Vahl, G. Berding, T. Brücke, H. Kolbe, G. J. Meyer, H. Hundeshagen, R. Dengler, W. H. Knapp, and H. M. Emrich, "Dopamine transporter binding in Gilles de la Tourette syndrome," *J. Neurol.*, vol. 247, no. 7, pp. 514–520, 2000.
- [24]J. Serra-Mestres, H. A. Ring, D. C. Costa, S. Gacinovic, Z. Walker, A. J. Lees, M. M. Robertson, and M. R. Trimble, "Dopamine transporter binding in Gilles de la

- Tourette syndrome: a [123I] FP-CIT/SPECT study,” *Acta Psychiatr. Scand.*, vol. 109, no. 2, pp. 140–146, 2004.
- [25] K. Cheon, “Dopamine transporter density of the basal ganglia assessed with [123I]IPT SPECT in drug-naïve children with Tourette’s disorder,” *Psychiatry Res. Neuroimaging*, vol. 130, no. 1, pp. 85–95, Jan. 2004.
- [26] R. L. Albin, R. A. Koeppe, N. I. Bohnen, T. E. Nichols, P. Meyer, K. Wernette, S. Minoshima, M. R. Kilbourn, and K. A. Frey, “Increased ventral striatal monoaminergic innervation in Tourette syndrome,” *Neurology*, vol. 61, no. 3, pp. 310–315, 2003.
- [27] D. L. Pauls and J. F. Leckman, “The inheritance of Gilles de la Tourette’s syndrome and associated behaviors. Evidence for autosomal dominant transmission,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 315, no. 16, pp. 993–997, Oct. 1986.
- [28] J. T. Walkup, M. C. LaBuda, H. S. Singer, J. Brown, M. A. Riddle, and O. Hurko, “Family study and segregation analysis of Tourette syndrome: evidence for a mixed model of inheritance,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 59, no. 3, pp. 684–693, Sep. 1996.
- [29] C. L. Barr, K. G. Wigg, E. Zovko, P. Sandor, and L. C. Tsui, “No evidence for a major gene effect of the dopamine D4 receptor gene in the susceptibility to Gilles de la Tourette syndrome in five Canadian families,” *Am. J. Med. Genet.*, vol. 67, no. 3, pp. 301–305, May 1996.
- [30] P. M. Brett, D. Curtis, M. M. Robertson, and H. M. Gurling, “Exclusion of the 5-HT_{1A} serotonin neuroreceptor and tryptophan oxygenase genes in a large British kindred multiply affected with Tourette’s syndrome, chronic motor tics, and obsessive-compulsive behavior,” *Am. J. Psychiatry*, vol. 152, no. 3, pp. 437–440, Mar. 1995.
- [31] I.-C. Chou, C.-H. Tsai, C.-C. Lee, H.-T. Kuo, Y.-A. Hsu, C.-I. Li, and F.-J. Tsai, “Association analysis between Tourette’s syndrome and dopamine D1 receptor gene in Taiwanese children,” *Psychiatr. Genet.*, vol. 14, no. 4, pp. 219–221, Dec. 2004.
- [32] J. M. Scharf, D. Yu, C. A. Mathews, B. M. Neale, S. E. Stewart, J. A. Fagerness, P. Evans, E. Gamazon, C. K. Edlund, S. K. Service, A. Tikhomirov, L. Osiecki, C. Illmann, A. Pluzhnikov, A. Konkashbaev, L. K. Davis, B. Han, J. Crane, P. Moorjani, A. T. Crenshaw, M. A. Parkin, V. I. Reus, T. L. Lowe, M. Rangel-Lugo, S. Chouinard, Y. Dion, S. Girard, D. C. Cath, J. H. Smit, R. A. King, T. V. Fernandez, J. F. Leckman, K. K. Kidd, J. R. Kidd, A. J. Pakstis, M. W. State, L. D. Herrera, R. Romero, E. Fournier, P. Sandor, C. L. Barr, N. Phan, V. Gross-Tsur, F. Benarroch, Y. Pollak, C. L. Budman, R. D. Bruun, G. Erenberg, A. L. Naarden, P. C. Lee, N. Weiss, B. Kremeyer, G. B. Berrío, D. D. Campbell, J. C. Cardona Silgado, W. C. Ochoa, S. C. Mesa

- Restrepo, H. Muller, A. V. Valencia Duarte, G. J. Lyon, M. Leppert, J. Morgan, R. Weiss, M. A. Grados, K. Anderson, S. Davarya, H. Singer, J. Walkup, J. Jankovic, J. A. Tischfield, G. A. Heiman, D. L. Gilbert, P. J. Hoekstra, M. M. Robertson, R. Kurlan, C. Liu, J. R. Gibbs, A. Singleton, North American Brain Expression Consortium, J. Hardy, UK Human Brain Expression Database, E. Strengman, R. A. Ophoff, M. Wagner, R. Moessner, D. B. Mirel, D. Posthuma, C. Sabatti, E. Eskin, D. V. Conti, J. A. Knowles, A. Ruiz-Linares, G. A. Rouleau, S. Purcell, P. Heutink, B. A. Oostra, W. M. McMahon, N. B. Freimer, N. J. Cox, and D. L. Pauls, "Genome-wide association study of Tourette's syndrome," *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 6, pp. 721–728, Jun. 2013.
- [33] J. F. Abelson, K. Y. Kwan, B. J. O'Roak, D. Y. Baek, A. A. Stillman, T. M. Morgan, C. A. Mathews, D. L. Pauls, M.-R. Rašin, M. Gunel, and others, "Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's syndrome," *Science*, vol. 310, no. 5746, pp. 317–320, 2005.
- [34] I.-C. Chou, L. Wan, S.-C. Liu, C.-H. Tsai, and F.-J. Tsai, "Association of the *Slit* and *Trk*-like 1 gene in Taiwanese patients with Tourette syndrome," *Pediatr. Neurol.*, vol. 37, no. 6, pp. 404–406, Dec. 2007.
- [35] I. Karagiannidis, R. Rizzo, Z. Tarnok, T. Wolanczyk, J. Hebebrand, M. M. Nöthen, G. Lehmkuhl, L. Farkas, P. Nagy, C. Barta, U. Szymanska, G. Panteloglou, D. M. Miranda, Y. Feng, P. Sandor, C. Barr, TSGeneSEE, and P. Paschou, "Replication of association between a *SLITRK1* haplotype and Tourette Syndrome in a large sample of families," *Mol. Psychiatry*, vol. 17, no. 7, pp. 665–668, Jul. 2012.
- [36] A. G. Ercan-Sencicek, A. A. Stillman, A. K. Ghosh, K. Bilguvar, B. J. O'Roak, C. E. Mason, T. Abbott, A. Gupta, R. A. King, D. L. Pauls, and others, "L-histidine decarboxylase and Tourette's syndrome," *N. Engl. J. Med.*, vol. 362, no. 20, pp. 1901–1908, 2010.
- [37] M. Xu, L. Li, H. Ohtsu, and C. Pittenger, "Histidine decarboxylase knockout mice, a genetic model of Tourette syndrome, show repetitive grooming after induced fear," *Neurosci. Lett.*, vol. 595, pp. 50–53, May 2015.
- [38] E. Petek, C. Windpassinger, J. B. Vincent, J. Cheung, A. P. Boright, S. W. Scherer, P. M. Kroisel, and K. Wagner, "Disruption of a novel gene (*IMMP2L*) by a breakpoint in 7q31 associated with Tourette syndrome," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 68, no. 4, pp. 848–858, 2001.
- [39] A. Lawson-Yuen, J.-S. Saldivar, S. Sommer, and J. Picker, "Familial deletion within *NLGN4* associated with autism and Tourette syndrome," *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*, vol. 16, no. 5, pp. 614–618, May 2008.

- [40]A. J. M. H. Verkerk, C. A. Mathews, M. Joosse, B. H. J. Eussen, P. Heutink, and B. A. Oostra, "CNTNAP2 is disrupted in a family with gilles de la tourette syndrome and obsessive compulsive disorder," *Genomics*, vol. 82, no. 1, pp. 1–9, Jul. 2003.
- [41]H. Deng, K. Gao, and J. Jankovic, "The genetics of Tourette syndrome," *Nat. Rev. Neurol.*, Mar. 2012.
- [42]D. G. Lichter, J. Dmochowski, L. A. Jackson, and K. S. Trinidad, "Influence of family history on clinical expression of Tourette's syndrome," *Neurology*, vol. 52, no. 2, pp. 308–308, Jan. 1999.
- [43]L. Burd, R. Severud, M. Klug, and J. Kerbeshian, "Prenatal and perinatal risk factors for Tourette disorder.," *J. Perinat. Med.*, vol. 27, no. 4, pp. 295–302, 1999.
- [44]A. Kong, M. L. Frigge, G. Masson, S. Besenbacher, P. Sulem, G. Magnusson, S. A. Gudjonsson, A. Sigurdsson, A. Jonasdottir, A. Jonasdottir, W. S. W. Wong, G. Sigurdsson, G. B. Walters, S. Steinberg, H. Helgason, G. Thorleifsson, D. F. Gudbjartsson, A. Helgason, O. T. Magnusson, U. Thorsteinsdottir, and K. Stefansson, "Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk," *Nature*, vol. 488, no. 7412, pp. 471–475, Aug. 2012.
- [45]R. A. Power, S. Kyaga, R. Uher, J. H. MacCabe, N. Långström, M. Landen, P. McGuffin, C. M. Lewis, P. Lichtenstein, and A. C. Svensson, "Fecundity of Patients With Schizophrenia, Autism, Bipolar Disorder, Depression, Anorexia Nervosa, or Substance Abuse vs Their Unaffected Siblings," *JAMA Psychiatry*, vol. 70, no. 1, p. 22, Jan. 2013.
- [46]L. Jouan, J. Gauthier, P. A. Dion, and G. A. Rouleau, "Rare Variants in Complex Traits: Novel Identification Strategies and the Role of de novo Mutations," *Hum. Hered.*, vol. 74, no. 3–4, pp. 215–225, 2012.
- [47]C. S. Ku, C. Polychronakos, E. K. Tan, N. Naidoo, Y. Pawitan, D. H. Roukos, M. Mort, and D. N. Cooper, "A new paradigm emerges from the study of de novo mutations in the context of neurodevelopmental disease," *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 2, pp. 141–153, Feb. 2013.
- [48]H. F. Noshirvani, Y. Kasvikis, I. M. Marks, F. Tsakiris, and W. O. Monteiro, "Gender-divergent aetiological factors in obsessive-compulsive disorder.," *Br. J. Psychiatry*, vol. 158, no. 2, pp. 260–263, Feb. 1991.
- [49]L. M. Champion, W. A. Fulton, and G. A. Shady, "Tourette's Syndrome and social functioning in a Canadian population.," *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 12, no. 3, pp. 255–257, Sep. 1988.
- [50]P. L. Nichols, "Familial mental retardation," *Behav. Genet.*, vol. 14, no. 3, pp. 161–170, May 1984.

- [51] E. B. Robinson, K. E. Samocha, J. A. Kosmicki, L. McGrath, B. M. Neale, R. H. Perlis, and M. J. Daly, "Autism spectrum disorder severity reflects the average contribution of de novo and familial influences," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 42, pp. 15161–15165, Oct. 2014.
- [52] V. Eapen and M. Robertson, "Are there distinct subtypes in Tourette syndrome? Pure-Tourette syndrome versus Tourette syndrome-plus, and simple versus complex tics," *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, p. 1431, Jun. 2015.
- [53] M. W. State, "The Genetics of Child Psychiatric Disorders: Focus on Autism and Tourette Syndrome," *Neuron*, vol. 68, no. 2, pp. 254–269, Oct. 2010.
- [54] E. B. Robinson, P. Lichtenstein, H. Anckarsater, F. Happe, and A. Ronald, "Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, no. 13, pp. 5258–5262, Mar. 2013.
- [55] S. Jacquemont, B. P. Coe, M. Hersch, M. H. Duyzend, N. Krumm, S. Bergmann, J. S. Beckmann, J. A. Rosenfeld, and E. E. Eichler, "A Higher Mutational Burden in Females Supports a 'Female Protective Model' in Neurodevelopmental Disorders," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 94, no. 3, pp. 415–425, Mar. 2014.
- [56] D. H. Skuse, R. S. James, D. V. Bishop, B. Coppin, P. Dalton, G. Aamodt-Leeper, M. Bacarese-Hamilton, C. Creswell, R. McGurk, and P. A. Jacobs, "Evidence from Turner's syndrome of an imprinted X-linked locus affecting cognitive function," *Nature*, vol. 387, no. 6634, pp. 705–708, Jun. 1997.
- [57] D. H. Skuse, "Imprinting, the X-chromosome, and the male brain: explaining sex differences in the liability to autism," *Pediatr. Res.*, vol. 47, no. 1, pp. 9–16, Jan. 2000.
- [58] E. Fombonne, "Epidemiology of pervasive developmental disorders," *Pediatr. Res.*, vol. 65, no. 6, pp. 591–598, 2009.
- [59] I. Iossifov, B. J. O'Roak, S. J. Sanders, M. Ronemus, N. Krumm, D. Levy, H. A. Stessman, K. T. Witherspoon, L. Vives, K. E. Patterson, J. D. Smith, B. Paepers, D. A. Nickerson, J. Dea, S. Dong, L. E. Gonzalez, J. D. Mandell, S. M. Mane, M. T. Murtha, C. A. Sullivan, M. F. Walker, Z. Waqar, L. Wei, A. J. Willsey, B. Yamrom, Y. Lee, E. Grabowska, E. Dalkic, Z. Wang, S. Marks, P. Andrews, A. Leotta, J. Kendall, I. Hakker, J. Rosenbaum, B. Ma, L. Rodgers, J. Troge, G. Narzisi, S. Yoon, M. C. Schatz, K. Ye, W. R. McCombie, J. Shendure, E. E. Eichler, M. W. State, and M. Wigler, "The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder," *Nature*, vol. 515, no. 7526, pp. 216–221, Oct. 2014.
- [60] I. Iossifov, M. Ronemus, D. Levy, Z. Wang, I. Hakker, J. Rosenbaum, B. Yamrom, Y. Lee, G. Narzisi, A. Leotta, J. Kendall, E. Grabowska, B. Ma, S. Marks, L. Rodgers, A.

- Stepansky, J. Troge, P. Andrews, M. Bekritsky, K. Pradhan, E. Ghiban, M. Kramer, J. Parla, R. Demeter, L. L. Fulton, R. S. Fulton, V. J. Magrini, K. Ye, J. C. Darnell, R. B. Darnell, E. R. Mardis, R. K. Wilson, M. C. Schatz, W. R. McCombie, and M. Wigler, "De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum," *Neuron*, vol. 74, no. 2, pp. 285–299, Apr. 2012.
- [61] L. Burd, J. Kerbeshian, M. Wikenheiser, and W. Fisher, "Prevalence of Gilles de la Tourette's syndrome in North Dakota adults," *Am. J. Psychiatry*, vol. 143, no. 6, pp. 787–788, Jun. 1986.
- [62] L. Burd, J. Kerbeshian, M. Wikenheiser, and W. Fisher, "A prevalence study of Gilles de la Tourette syndrome in North Dakota school-age children," *J. Am. Acad. Child Psychiatry*, vol. 25, no. 4, pp. 552–553, Jul. 1986.
- [63] K. Bilgüvar, A. K. Oztürk, A. Louvi, K. Y. Kwan, M. Choi, B. Tatli, D. Yalnizoğlu, B. Tüysüz, A. O. Cağlayan, S. Gökben, H. Kaymakçalan, T. Barak, M. Bakircioğlu, K. Yasuno, W. Ho, S. Sanders, Y. Zhu, S. Yilmaz, A. Dinçer, M. H. Johnson, R. A. Bronen, N. Koçer, H. Per, S. Mane, M. N. Pamir, C. Yalçinkaya, S. Kumandaş, M. Topçu, M. Ozmen, N. Sestan, R. P. Lifton, M. W. State, and M. Günel, "Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations," *Nature*, vol. 467, no. 7312, pp. 207–210, Sep. 2010.
- [64] B. Xu, J. L. Roos, S. Levy, E. J. van Rensburg, J. A. Gogos, and M. Karayiorgou, "Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia," *Nat. Genet.*, vol. 40, no. 7, pp. 880–885, Jul. 2008.
- [65] J. Sebat, B. Lakshmi, D. Malhotra, J. Troge, C. Lese-Martin, T. Walsh, B. Yamrom, S. Yoon, A. Krasnitz, J. Kendall, A. Leotta, D. Pai, R. Zhang, Y.-H. Lee, J. Hicks, S. J. Spence, A. T. Lee, K. Puura, T. Lehtimäki, D. Ledbetter, P. K. Gregersen, J. Bregman, J. S. Sutcliffe, V. Jobanputra, W. Chung, D. Warburton, M.-C. King, D. Skuse, D. H. Geschwind, T. C. Gilliam, K. Ye, and M. Wigler, "Strong association of de novo copy number mutations with autism," *Science*, vol. 316, no. 5823, pp. 445–449, Apr. 2007.
- [66] B. J. O'Roak, P. Deriziotis, C. Lee, L. Vives, J. J. Schwartz, S. Girirajan, E. Karakoc, A. P. MacKenzie, S. B. Ng, C. Baker, M. J. Rieder, D. A. Nickerson, R. Bernier, S. E. Fisher, J. Shendure, and E. E. Eichler, "Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations," *Nat. Genet.*, vol. 43, no. 6, pp. 585–589, Jun. 2011.
- [67] B. J. O'Roak, L. Vives, S. Girirajan, E. Karakoc, N. Krumm, B. P. Coe, R. Levy, A. Ko, C. Lee, J. D. Smith, E. H. Turner, I. B. Stanaway, B. Vernet, M. Malig, C. Baker, B. Reilly, J. M. Akey, E. Borenstein, M. J. Rieder, D. A. Nickerson, R. Bernier, J.

- Shendure, and E. E. Eichler, "Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations," *Nature*, vol. 485, no. 7397, pp. 246–250, Apr. 2012.
- [68] B. M. Neale, Y. Kou, L. Liu, A. Ma'ayan, K. E. Samocha, A. Sabo, C.-F. Lin, C. Stevens, L.-S. Wang, V. Makarov, P. Polak, S. Yoon, J. Maguire, E. L. Crawford, N. G. Campbell, E. T. Geller, O. Valladares, C. Schafer, H. Liu, T. Zhao, G. Cai, J. Lihm, R. Dannenfelser, O. Jabado, Z. Peralta, U. Nagaswamy, D. Muzny, J. G. Reid, I. Newsham, Y. Wu, L. Lewis, Y. Han, B. F. Voight, E. Lim, E. Rossin, A. Kirby, J. Flannick, M. Fromer, K. Shakir, T. Fennell, K. Garimella, E. Banks, R. Poplin, S. Gabriel, M. DePristo, J. R. Wimbish, B. E. Boone, S. E. Levy, C. Betancur, S. Sunyaev, E. Boerwinkle, J. D. Buxbaum, E. H. Cook Jr, B. Devlin, R. A. Gibbs, K. Roeder, G. D. Schellenberg, J. S. Sutcliffe, and M. J. Daly, "Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders," *Nature*, vol. 485, no. 7397, pp. 242–245, Apr. 2012.
- [69] S. J. Sanders, M. T. Murtha, A. R. Gupta, J. D. Murdoch, M. J. Raubeson, A. J. Willsey, A. G. Ercan-Sencicek, N. M. DiLullo, N. N. Parikshak, J. L. Stein, M. F. Walker, G. T. Ober, N. A. Teran, Y. Song, P. El-Fishawy, R. C. Murtha, M. Choi, J. D. Overton, R. D. Bjornson, N. J. Carriero, K. A. Meyer, K. Bilguvar, S. M. Mane, N. Šestan, R. P. Lifton, M. Günel, K. Roeder, D. H. Geschwind, B. Devlin, and M. W. State, "De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism," *Nature*, vol. 485, no. 7397, pp. 237–241, Apr. 2012.
- [70] I. Iossifov, M. Ronemus, D. Levy, Z. Wang, I. Hakker, J. Rosenbaum, B. Yamrom, Y. Lee, G. Narzisi, A. Leotta, J. Kendall, E. Grabowska, B. Ma, S. Marks, L. Rodgers, A. Stepansky, J. Troge, P. Andrews, M. Bekritsky, K. Pradhan, E. Ghiban, M. Kramer, J. Parla, R. Demeter, L. L. Fulton, R. S. Fulton, V. J. Magrini, K. Ye, J. C. Darnell, R. B. Darnell, E. R. Mardis, R. K. Wilson, M. C. Schatz, W. R. McCombie, and M. Wigler, "De Novo Gene Disruptions in Children on the Autistic Spectrum," *Neuron*, vol. 74, no. 2, pp. 285–299, Apr. 2012.
- [71] P. J. Hamilton, N. G. Campbell, S. Sharma, K. Erreger, F. Herborg Hansen, C. Saunders, A. N. Belovich, M. J. Daly, R. A. Gibbs, E. Boerwinkle, J. D. Buxbaum, E. H. Cook, B. Devlin, E. T. Lim, B. M. Neale, K. Roeder, A. Sabo, G. D. Schellenberg, C. Stevens, J. S. Sutcliffe, M. A. Sahai, E. H. Cook, U. Gether, H. S. Mchaourab, H. J. G. Matthies, J. S. Sutcliffe, and A. Galli, "De novo mutation in the dopamine transporter gene associates dopamine dysfunction with autism spectrum disorder," *Mol. Psychiatry*, vol. 18, no. 12, pp. 1315–1323, Dec. 2013.
- [72] M. Fromer, A. J. Pocklington, D. H. Kavanagh, H. J. Williams, S. Dwyer, P. Gormley,

- L. Georgieva, E. Rees, P. Palta, D. M. Ruderfer, N. Carrera, I. Humphreys, J. S. Johnson, P. Roussos, D. D. Barker, E. Banks, V. Milanova, S. G. Grant, E. Hannon, S. A. Rose, K. Chambert, M. Mahajan, E. M. Scolnick, J. L. Moran, G. Kirov, A. Palotie, S. A. McCarroll, P. Holmans, P. Sklar, M. J. Owen, S. M. Purcell, and M. C. O'Donovan, "De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks," *Nature*, vol. 506, no. 7487, pp. 179–184, Jan. 2014.
- [73] H. Lee, M. -c. A. Lin, H. I. Kornblum, D. M. Papazian, and S. F. Nelson, "Exome sequencing identifies de novo gain of function missense mutation in KCND2 in identical twins with autism and seizures that slows potassium channel inactivation," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 23, no. 13, pp. 3481–3489, Jul. 2014.
- [74] C. Helsmoortel, A. T. Vulto-van Silfhout, B. P. Coe, G. Vandeweyer, L. Rooms, J. van den Ende, J. H. M. Schuurs-Hoeijmakers, C. L. Marcelis, M. H. Willemsen, L. E. L. M. Vissers, H. G. Yntema, M. Bakshi, M. Wilson, K. T. Witherspoon, H. Malmgren, A. Nordgren, G. Annerén, M. Fichera, P. Bosco, C. Romano, B. B. A. de Vries, T. Kleefstra, R. F. Kooy, E. E. Eichler, and N. Van der Aa, "A SWI/SNF-related autism syndrome caused by de novo mutations in ADNP," *Nat. Genet.*, vol. 46, no. 4, pp. 380–384, Feb. 2014.
- [75] S. E. McCarthy, J. Gillis, M. Kramer, J. Lihm, S. Yoon, Y. Berstein, M. Mistry, P. Pavlidis, R. Solomon, E. Ghiban, E. Antoniou, E. Kelleher, C. O'Brien, G. Donohoe, M. Gill, D. W. Morris, W. R. McCombie, and A. Corvin, "De novo mutations in schizophrenia implicate chromatin remodeling and support a genetic overlap with autism and intellectual disability," *Mol. Psychiatry*, vol. 19, no. 6, pp. 652–658, Jun. 2014.
- [76] S. Dong, M. F. Walker, N. J. Carriero, M. DiCola, A. J. Willsey, A. Y. Ye, Z. Waqar, L. E. Gonzalez, J. D. Overton, S. Frahm, J. F. Keaney, N. A. Teran, J. Dea, J. D. Mandell, V. Hus Bal, C. A. Sullivan, N. M. DiLullo, R. O. Khalil, J. Gockley, Z. Yuksel, S. M. Sertel, A. G. Ercan-Sencicek, A. R. Gupta, S. M. Mane, M. Sheldon, A. I. Brooks, K. Roeder, B. Devlin, M. W. State, L. Wei, and S. J. Sanders, "De Novo Insertions and Deletions of Predominantly Paternal Origin Are Associated with Autism Spectrum Disorder," *Cell Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 16–23, Oct. 2014.
- [77] A. Pinggera, A. Lieb, B. Benedetti, M. Lampert, S. Monteleone, K. R. Liedl, P. Tuluc, and J. Striessnig, "CACNA1D De Novo Mutations in Autism Spectrum Disorders Activate Cav1.3 L-Type Calcium Channels," *Biol. Psychiatry*, vol. 77, no. 9, pp. 816–822, May 2015.
- [78] R. Fukai, Y. Hiraki, H. Yofune, Y. Tsurusaki, M. Nakashima, H. Saitsu, F. Tanaka, N. Miyake, and N. Matsumoto, "A case of autism spectrum disorder arising from a de

- novo missense mutation in POGZ,” *J. Hum. Genet.*, vol. 60, no. 5, pp. 277–279, May 2015.
- [79] R. Lozano, A. Vino, C. Lozano, S. E. Fisher, and P. Deriziotis, “A de novo FOXP1 variant in a patient with autism, intellectual disability and severe speech and language impairment,” *Eur. J. Hum. Genet.*, Apr. 2015.
- [80] M. Hara, C. Ohba, Y. Yamashita, H. Saitsu, N. Matsumoto, and T. Matsuishi, “De novo SHANK3 mutation causes Rett syndrome-like phenotype in a female patient,” *Am. J. Med. Genet. A.*, vol. 167, no. 7, pp. 1593–1596, Jul. 2015.
- [81] D. V. Sheehan, Y. Lecrubier, K. H. Sheehan, P. Amorim, J. Janavs, E. Weiller, T. Hergueta, R. Baker, and G. C. Dunbar, “The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10,” *J. Clin. Psychiatry*, vol. 59 Suppl 20, pp. 22–33;quiz 34–57, 1998.
- [82] T. Otsubo, K. Tanaka, R. Koda, J. Shinoda, N. Sano, S. Tanaka, H. Aoyama, M. Mimura, and K. Kamijima, “Reliability and validity of Japanese version of the Mini-International Neuropsychiatric Interview,” *Psychiatry Clin. Neurosci.*, vol. 59, no. 5, pp. 517–526, Oct. 2005.
- [83] “Clomipramine in the treatment of patients with obsessive-compulsive disorder. The Clomipramine Collaborative Study Group,” *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 48, no. 8, pp. 730–738, Aug. 1991.
- [84] H. Li and R. Durbin, “Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform,” *Bioinform. Oxf. Engl.*, vol. 25, no. 14, pp. 1754–1760, Jul. 2009.
- [85] A. McKenna, M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernytsky, K. Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly, and M. A. DePristo, “The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data,” *Genome Res.*, vol. 20, no. 9, pp. 1297–1303, Sep. 2010.
- [86] P. Cingolani, A. Platts, L. L. Wang, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, S. J. Land, X. Lu, and D. M. Ruden, “A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3,” *Fly (Austin)*, vol. 6, no. 2, pp. 80–92, Apr. 2012.
- [87] J. T. Robinson, H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E. S. Lander, G. Getz, and J. P. Mesirov, “Integrative genomics viewer,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 29, no. 1, pp. 24–26, Jan. 2011.
- [88] K. Ye, M. H. Schulz, Q. Long, R. Apweiler, and Z. Ning, “Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from

- paired-end short reads,” *Bioinformatics*, vol. 25, no. 21, pp. 2865–2871, Nov. 2009.
- [89] C. S. Poultney, A. P. Goldberg, E. Drapeau, Y. Kou, H. Harony-Nicolas, Y. Kajiwar, S. De Rubeis, S. Durand, C. Stevens, K. Rehnström, A. Palotie, M. J. Daly, A. Ma’ayan, M. Fromer, and J. D. Buxbaum, “Identification of Small Exonic CNV from Whole-Exome Sequence Data and Application to Autism Spectrum Disorder,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 93, no. 4, pp. 607–619, Oct. 2013.
- [90] M. Fromer, J. L. Moran, K. Chambert, E. Banks, S. E. Bergen, D. M. Ruderfer, R. E. Handsaker, S. A. McCarroll, M. C. O’Donovan, M. J. Owen, G. Kirov, P. F. Sullivan, C. M. Hultman, P. Sklar, and S. M. Purcell, “Discovery and Statistical Genotyping of Copy-Number Variation from Whole-Exome Sequencing Depth,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 91, no. 4, pp. 597–607, May 2012.
- [91] S. Gulsuner, T. Walsh, A. C. Watts, M. K. Lee, A. M. Thornton, S. Casadei, C. Rippey, H. Shahin, D. Braff, K. S. Cadenhead, M. E. Calkins, D. J. Dobie, R. Freedman, M. Green, T. Greenwood, R. E. Gur, R. C. Gur, L. Lazzeroni, G. Light, K. Nuechterlein, A. Olincy, A. Radant, A. Ray, N. Schork, L. J. Seidman, L. Siever, J. Silverman, W. S. Stone, C. Sugar, N. Swerdlow, D. Tsuang, M. Tsuang, B. Turetsky, T. Aduroja, T. Allen, L. D. Bradford, M. E. Calkins, B. Devlin, N. B. Edwards, R. Ganguli, R. C. P. Go, R. E. Gur, R. C. Gur, J. Kwentus, A. C. Lahti, P. Lyons, K. Mathos, R. May, S. McLeod-Bryant, J. P. McEvoy, L. Montgomery-Barefield, V. L. Nimgaonkar, J. O’Jile, A. Santos, R. M. Savage, C. L. Swanson Jr., W. Wilson, V. L. Nimgaonkar, R. C. P. Go, R. M. Savage, N. R. Swerdlow, R. E. Gur, D. L. Braff, M.-C. King, and J. M. McClellan, “Spatial and Temporal Mapping of De Novo Mutations in Schizophrenia to a Fetal Prefrontal Cortical Network,” *Cell*, vol. 154, no. 3, pp. 518–529, Aug. 2013.
- [92] S. Gulsuner and J. M. McClellan, “De Novo Mutations in Schizophrenia Disrupt Genes Co-Expressed in Fetal Prefrontal Cortex,” *Neuropsychopharmacology*, vol. 39, no. 1, pp. 238–239, Jan. 2014.
- [93] I. A. Adzhubei, S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov, and S. R. Sunyaev, “A method and server for predicting damaging missense mutations,” *Nat. Methods*, vol. 7, no. 4, pp. 248–249, Apr. 2010.
- [94] P. Kumar, S. Henikoff, and P. C. Ng, “Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm,” *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 7, pp. 1073–1081, 2009.
- [95] Y. Choi, G. E. Sims, S. Murphy, J. R. Miller, and A. P. Chan, “Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 10, p. e46688, Oct. 2012.
- [96] L. A. Miosge, M. A. Field, Y. Sontani, V. Cho, S. Johnson, A. Palkova, B.

- Balakishnan, R. Liang, Y. Zhang, S. Lyon, and others, “Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 37, pp. E5189–E5198, 2015.
- [97] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman, “Basic local alignment search tool,” *J. Mol. Biol.*, vol. 215, no. 3, pp. 403–410, Oct. 1990.
- [98] M. Narahara, K. Higasa, S. Nakamura, Y. Tabara, T. Kawaguchi, M. Ishii, K. Matsubara, F. Matsuda, and R. Yamada, “Large-Scale East-Asian eQTL Mapping Reveals Novel Candidate Genes for LD Mapping and the Genomic Landscape of Transcriptional Effects of Sequence Variants,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, p. e100924, Jun. 2014.
- [99] R. M. Durbin, D. L. Altshuler, R. M. Durbin, G. R. Abecasis, D. R. Bentley, A. Chakravarti, A. G. Clark, F. S. Collins, F. M. De La Vega, P. Donnelly, M. Egholm, P. Flicek, S. B. Gabriel, R. A. Gibbs, B. M. Knoppers, E. S. Lander, H. Lehrach, E. R. Mardis, G. A. McVean, D. A. Nickerson, L. Peltonen, A. J. Schafer, S. T. Sherry, J. Wang, R. K. Wilson, R. A. Gibbs, D. Deiros, M. Metzker, D. Muzny, J. Reid, D. Wheeler, J. Wang, J. Li, M. Jian, G. Li, R. Li, H. Liang, G. Tian, B. Wang, J. Wang, W. Wang, H. Yang, X. Zhang, H. Zheng, E. S. Lander, D. L. Altshuler, L. Ambrogio, T. Bloom, K. Cibulskis, T. J. Fennell, S. B. Gabriel, D. B. Jaffe, E. Shefler, C. L. Sougnez, D. R. Bentley, N. Gormley, S. Humphray, Z. Kingsbury, P. Koko-Gonzales, J. Stone, K. J. McKernan, G. L. Costa, J. K. Ichikawa, C. C. Lee, R. Sudbrak, H. Lehrach, T. A. Borodina, A. Dahl, A. N. Davydov, P. Marquardt, F. Mertes, W. Nietfeld, P. Rosenstiel, S. Schreiber, A. V. Soldatov, B. Timmermann, M. Tolzmann, M. Egholm, J. Affourtit, D. Ashworth, S. Attiya, M. Bachorski, E. Buglione, A. Burke, A. Caprio, C. Celone, S. Clark, D. Connors, B. Desany, L. Gu, L. Guccione, K. Kao, A. Kebbel, J. Knowlton, M. Labrecque, L. McDade, C. Mealmaker, M. Minderman, A. Nawrocki, F. Niazi, K. Pareja, R. Ramenani, D. Riches, W. Song, C. Turcotte, S. Wang, E. R. Mardis, R. K. Wilson, D. Dooling, L. Fulton, R. Fulton, G. Weinstock, R. M. Durbin, J. Burton, D. M. Carter, C. Churcher, A. Coffey, A. Cox, A. Palotie, M. Quail, T. Skelly, J. Stalker, H. P. Swerdlow, D. Turner, A. De Witte, S. Giles, R. A. Gibbs, D. Wheeler, M. Bainbridge, D. Challis, A. Sabo, F. Yu, J. Yu, J. Wang, X. Fang, X. Guo, R. Li, Y. Li, R. Luo, S. Tai, H. Wu, H. Zheng, X. Zheng, Y. Zhou, G. Li, J. Wang, H. Yang, G. T. Marth, E. P. Garrison, W. Huang, A. Indap, D. Kural, W.-P. Lee, W. Fung Leong, A. R. Quinlan, C. Stewart, M. P. Stromberg, A. N. Ward, J. Wu, C. Lee, R. E. Mills, X. Shi, M. J. Daly, M. A. DePristo, D. L. Altshuler, A. D. Ball, E. Banks, T. Bloom, B. L. Browning, K. Cibulskis, T. J. Fennell, K. V. Garimella, S. R. Grossman, R. E. Handsaker, M. Hanna, C. Hartl, D. B. Jaffe, A. M.

Kernytsky, J. M. Korn, H. Li, J. R. Maguire, S. A. McCarroll, A. McKenna, J. C. Nemesh, A. A. Philippakis, R. E. Poplin, A. Price, M. A. Rivas, P. C. Sabeti, S. F. Schaffner, E. Shefler, I. A. Shlyakhter, D. N. Cooper, E. V. Ball, M. Mort, A. D. Phillips, P. D. Stenson, J. Sebat, V. Makarov, K. Ye, S. C. Yoon, C. D. Bustamante, A. G. Clark, A. Boyko, J. Degenhardt, S. Gravel, R. N. Gutenkunst, M. Kaganovich, A. Keinan, P. Lacroute, X. Ma, A. Reynolds, L. Clarke, P. Flicek, F. Cunningham, J. Herrero, S. Keenen, E. Kulesha, R. Leinonen, W. M. McLaren, R. Radhakrishnan, R. E. Smith, V. Zalunin, X. Zheng-Bradley, J. O. Korb, A. M. Stütz, S. Humphray, M. Bauer, R. Keira Cheetham, T. Cox, M. Eberle, T. James, S. Kahn, L. Murray, A. Chakravarti, K. Ye, F. M. De La Vega, Y. Fu, F. C. L. Hyland, J. M. Manning, S. F. McLaughlin, H. E. Peckham, O. Sakarya, Y. A. Sun, E. F. Tsung, M. A. Batzer, M. K. Konkel, J. A. Walker, R. Sudbrak, M. W. Albrecht, V. S. Amstislavskiy, R. Herwig, D. V. Parkhomchuk, S. T. Sherry, R. Agarwala, H. M. Khouri, A. O. Morgulis, J. E. Paschall, L. D. Phan, K. E. Rotmistrovsky, R. D. Sanders, M. F. Shumway, C. Xiao, G. A. McVean, A. Auton, Z. Iqbal, G. Lunter, J. L. Marchini, L. Moutsianas, S. Myers, A. Tumian, B. Desany, J. Knight, R. Winer, D. W. Craig, S. M. Beckstrom-Sternberg, A. Christoforides, A. A. Kurdoglu, J. V. Pearson, S. A. Sinari, W. D. Tembe, D. Haussler, A. S. Hinrichs, S. J. Katzman, A. Kern, R. M. Kuhn, M. Przeworski, R. D. Hernandez, B. Howie, J. L. Kelley, S. Cord Melton, G. R. Abecasis, Y. Li, P. Anderson, T. Blackwell, W. Chen, W. O. Cookson, J. Ding, H. Min Kang, M. Lathrop, L. Liang, M. F. Moffatt, P. Scheet, C. Sidore, M. Snyder, X. Zhan, S. Zöllner, P. Awadalla, F. Casals, Y. Idaghdour, J. Keebler, E. A. Stone, M. Zilversmit, L. Jorde, J. Xing, E. E. Eichler, G. Aksay, C. Alkan, I. Hajirasouliha, F. Hormozdiari, J. M. Kidd, S. Cenk Sahinalp, P. H. Sudmant, E. R. Mardis, K. Chen, A. Chinwalla, L. Ding, D. C. Koboldt, M. D. McLellan, D. Dooling, G. Weinstock, J. W. Wallis, M. C. Wendl, Q. Zhang, R. M. Durbin, C. A. Albers, Q. Ayub, S. Balasubramaniam, J. C. Barrett, D. M. Carter, Y. Chen, D. F. Conrad, P. Danecek, E. T. Dermitzakis, M. Hu, N. Huang, M. E. Hurles, H. Jin, L. Jostins, T. M. Keane, S. Quang Le, S. Lindsay, Q. Long, D. G. MacArthur, S. B. Montgomery, L. Parts, J. Stalker, C. Tyler-Smith, K. Walter, Y. Zhang, M. B. Gerstein, M. Snyder, A. Abyzov, S. Balasubramanian, R. Bjornson, J. Du, F. Grubert, L. Habegger, R. Haraksingh, J. Jee, E. Khurana, H. Y. K. Lam, J. Leng, X. Jasmine Mu, A. E. Urban, Z. Zhang, Y. Li, R. Luo, G. T. Marth, E. P. Garrison, D. Kural, A. R. Quinlan, C. Stewart, M. P. Stromberg, A. N. Ward, J. Wu, C. Lee, R. E. Mills, X. Shi, S. A. McCarroll, E. Banks, M. A. DePristo, R. E. Handsaker, C. Hartl, J. M. Korn, H. Li, J. C. Nemesh, J. Sebat, V. Makarov, K. Ye, S. C. Yoon, J. Degenhardt, M. Kaganovich, L. Clarke, R. E. Smith, X. Zheng-Bradley, J.

- O. Korbelt, S. Humphray, R. Keira Cheetham, M. Eberle, S. Kahn, L. Murray, K. Ye, F. M. De La Vega, Y. Fu, H. E. Peckham, Y. A. Sun, M. A. Batzer, M. K. Konkel, J. A. Walker, C. Xiao, Z. Iqbal, B. Desany, T. Blackwell, M. Snyder, J. Xing, E. E. Eichler, G. Aksay, C. Alkan, I. Hajirasouliha, F. Hormozdiari, J. M. Kidd, K. Chen, A. Chinwalla, L. Ding, M. D. McLellan, J. W. Wallis, M. E. Hurles, D. F. Conrad, K. Walter, Y. Zhang, M. B. Gerstein, M. Snyder, A. Abyzov, J. Du, F. Grubert, R. Haraksingh, J. Jee, E. Khurana, H. Y. K. Lam, J. Leng, X. Jasmine Mu, A. E. Urban, Z. Zhang, R. A. Gibbs, M. Bainbridge, D. Challis, C. Coafra, H. Dinh, C. Kovar, S. Lee, D. Muzny, L. Nazareth, J. Reid, A. Sabo, F. Yu, J. Yu, G. T. Marth, E. P. Garrison, A. Indap, W. Fung Leong, A. R. Quinlan, C. Stewart, A. N. Ward, J. Wu, K. Cibulskis, T. J. Fennell, S. B. Gabriel, K. V. Garimella, C. Hartl, E. Shefler, C. L. Sougnez, J. Wilkinson, A. G. Clark, S. Gravel, F. Grubert, L. Clarke, P. Flicek, R. E. Smith, X. Zheng-Bradley, S. T. Sherry, H. M. Khouri, J. E. Paschall, M. F. Shumway, C. Xiao, G. A. McVean, S. J. Katzman, G. R. Abecasis, T. Blackwell, E. R. Mardis, D. Dooling, L. Fulton, R. Fulton, D. C. Koboldt, R. M. Durbin, S. Balasubramanian, A. Coffey, T. M. Keane, D. G. MacArthur, A. Palotie, C. Scott, J. Stalker, C. Tyler-Smith, M. B. Gerstein, S. Balasubramanian, A. Chakravarti, B. M. Knoppers, G. R. Abecasis, C. D. Bustamante, N. Gharani, R. A. Gibbs, L. Jorde, J. S. Kaye, A. Kent, T. Li, A. L. McGuire, G. A. McVean, P. N. Ossorio, C. N. Rotimi, Y. Su, L. H. Toji, C. Tyler-Smith, L. D. Brooks, A. L. Felsenfeld, J. E. McEwen, A. Abdallah, C. R. Juenger, N. C. Clegg, F. S. Collins, A. Duncanson, E. D. Green, M. S. Guyer, J. L. Peterson, A. J. Schafer, G. R. Abecasis, D. L. Altshuler, A. Auton, L. D. Brooks, R. M. Durbin, R. A. Gibbs, M. E. Hurles, and G. A. McVean, "A map of human genome variation from population-scale sequencing," *Nature*, vol. 467, no. 7319, pp. 1061–1073, Oct. 2010.
- [100] H. J. Kang, Y. I. Kawasawa, F. Cheng, Y. Zhu, X. Xu, M. Li, A. M. M. Sousa, M. Pletikos, K. A. Meyer, G. Sedmak, T. Guennel, Y. Shin, M. B. Johnson, Ž. Krsnik, S. Mayer, S. Fertuzinhos, S. Umlauf, S. N. Lisgo, A. Vortmeyer, D. R. Weinberger, S. Mane, T. M. Hyde, A. Huttner, M. Reimers, J. E. Kleinman, and N. Šestan, "Spatio-temporal transcriptome of the human brain," *Nature*, vol. 478, no. 7370, pp. 483–489, Oct. 2011.
- [101] J. J. Hong, C. R. Loiselle, D. Y. Yoon, O. Lee, K. G. Becker, and H. S. Singer, "Microarray analysis in Tourette syndrome postmortem putamen," *J. Neurol. Sci.*, vol. 225, no. 1–2, pp. 57–64, Oct. 2004.
- [102] J. B. Lenington, G. Coppola, Y. Kataoka-Sasaki, T. V. Fernandez, D. Palejev, Y. Li, A. Huttner, M. Pletikos, N. Šestan, J. F. Leckman, and F. M. Vaccarino,

- “Transcriptome Analysis of the Human Striatum in Tourette Syndrome,” *Biol. Psychiatry*, Jul. 2014.
- [103] D. G. Lichter, J. Dmochowski, L. A. Jackson, and K. S. Trinidad, “Influence of family history on clinical expression of Tourette’s syndrome,” *Neurology*, vol. 52, no. 2, pp. 308–308, Jan. 1999.
- [104] J. L. Fudge, K. Kunishio, P. Walsh, C. Richard, and S. N. Haber, “Amygdaloid projections to ventromedial striatal subterritories in the primate,” *Neuroscience*, vol. 110, no. 2, pp. 257–275, Mar. 2002.
- [105] F. T. Russchen, I. Bakst, D. G. Amaral, and J. L. Price, “The amygdalostriatal projections in the monkey. An anterograde tracing study,” *Brain Res.*, vol. 329, no. 1, pp. 241–257, Mar. 1985.
- [106] S. B. Floresco, C. L. Todd, and A. A. Grace, “Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 21, no. 13, pp. 4915–4922, Jul. 2001.
- [107] P. O’Donnell and A. A. Grace, “Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 15, no. 5 Pt 1, pp. 3622–3639, May 1995.
- [108] A. Ishikawa and S. Nakamura, “Convergence and interaction of hippocampal and amygdalar projections within the prefrontal cortex in the rat,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 23, no. 31, pp. 9987–9995, Nov. 2003.
- [109] Peterson BS, Choi HA, Hao X, and et al, “MORphologic features of the amygdala and hippocampus in children and adults with tourette syndrome,” *Arch. Gen. Psychiatry*, vol. 64, no. 11, pp. 1281–1291, Nov. 2007.
- [110] M. Glickstein and K. Doron, “Cerebellum: connections and functions,” *Cerebellum Lond. Engl.*, vol. 7, no. 4, pp. 589–594, 2008.
- [111] M. Frings, A. Dimitrova, C. F. Schorn, H.-G. Elles, C. Hein-Kropp, E. R. Gizewski, H. C. Diener, and D. Timmann, “Cerebellar involvement in verb generation: an fMRI study,” *Neurosci. Lett.*, vol. 409, no. 1, pp. 19–23, Nov. 2006.
- [112] S. E. Petersen, P. T. Fox, M. I. Posner, M. Mintun, and M. E. Raichle, “Positron emission tomographic studies of the cortical anatomy of single-word processing,” *Nature*, vol. 331, no. 6157, pp. 585–589, Feb. 1988.
- [113] R. H. Tobe, R. Bansal, D. Xu, X. Hao, J. Liu, J. Sanchez, and B. S. Peterson, “Cerebellar morphology in Tourette syndrome and obsessive-compulsive disorder,” *Ann. Neurol.*, vol. 67, no. 4, pp. 479–487, Apr. 2010.
- [114] D. M. Sabatini, “Interaction of RAFT1 with Gephyrin Required for

- Rapamycin-Sensitive Signaling,” *Science*, vol. 284, no. 5417, pp. 1161–1164, May 1999.
- [115] J. O. Lipton and M. Sahin, “The Neurology of mTOR,” *Neuron*, vol. 84, no. 2, pp. 275–291, Oct. 2014.
- [116] R. D. Finn, A. Bateman, J. Clements, P. Coghill, R. Y. Eberhardt, S. R. Eddy, A. Heger, K. Hetherington, L. Holm, J. Mistry, E. L. L. Sonnhammer, J. Tate, and M. Punta, “Pfam: the protein families database,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. D1, pp. D222–D230, Jan. 2014.
- [117] L. A. Feig, “Regulation of Neuronal Function by Ras-GRF Exchange Factors,” *Genes Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 306–319, Mar. 2011.
- [118] H. R. Bourne, D. A. Sanders, and F. McCormick, “The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions,” *Nature*, vol. 348, no. 6297, pp. 125–132, Nov. 1990.
- [119] J. M. Tepper, F. Tecuapetla, T. Koós, and O. Ibáñez-Sandoval, “Heterogeneity and diversity of striatal GABAergic interneurons,” *Front. Neuroanat.*, vol. 4, p. 150, 2010.
- [120] A. C. Kreitzer, “Physiology and pharmacology of striatal neurons,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 32, pp. 127–147, 2009.
- [121] C. R. Gerfen, T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, and D. R. Sibley, “D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons,” *Science*, vol. 250, no. 4986, pp. 1429–1432, Dec. 1990.
- [122] C. R. Gerfen and D. J. Surmeier, “Modulation of striatal projection systems by dopamine,” *Annu. Rev. Neurosci.*, vol. 34, pp. 441–466, 2011.
- [123] J. W. Mink, “The Basal Ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns,” *Arch. Neurol.*, vol. 60, no. 10, pp. 1365–1368, Oct. 2003.
- [124] A. Nambu, “Seven problems on the basal ganglia,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 18, no. 6, pp. 595–604, Dec. 2008.
- [125] D. Hervé, M. Lévi-Strauss, I. Marey-Semper, C. Verney, J. P. Tassin, J. Glowinski, and J. A. Girault, “G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 13, no. 5, pp. 2237–2248, May 1993.
- [126] X. Zhuang, L. Belluscio, and R. Hen, “G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 20, no. 16, p. RC91, Aug. 2000.

- [127] P. Greengard, P. B. Allen, and A. C. Nairn, "Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade," *Neuron*, vol. 23, no. 3, pp. 435–447, Jul. 1999.
- [128] S. Fasano, E. Bezard, A. D'Antoni, V. Francardo, M. Indrigo, L. Qin, S. Doveró, M. Cerovic, M. A. Cenci, and R. Brambilla, "Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced dyskinesia," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 50, pp. 21824–21829, Dec. 2010.
- [129] S. Schuster, A. Nadjar, J. T. Guo, Q. Li, C. Ittrich, B. Hengerer, and E. Bezard, "The 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor lovastatin reduces severity of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements in experimental Parkinson's disease," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 28, no. 17, pp. 4311–4316, Apr. 2008.
- [130] X. Long, Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa, and J. Avruch, "Rheb binds and regulates the mTOR kinase," *Curr. Biol. CB*, vol. 15, no. 8, pp. 702–713, Apr. 2005.
- [131] L. Ma, Z. Chen, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and P. P. Pandolfi, "Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis," *Cell*, vol. 121, no. 2, pp. 179–193, Apr. 2005.
- [132] P. Tsokas, E. A. Grace, P. Chan, T. Ma, S. C. Sealton, R. Iyengar, E. M. Landau, and R. D. Blitzer, "Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation," *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 25, no. 24, pp. 5833–5843, Jun. 2005.
- [133] M. Feyder, A. Bonito-Oliva, and G. Fisone, "L-DOPA-Induced Dyskinesia and Abnormal Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons: Focus on Dopamine D1 Receptor-Mediated Transmission," *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 5, 2011.
- [134] D. J. Surmeier, J. Plotkin, and W. Shen, "Dopamine and synaptic plasticity in dorsal striatal circuits controlling action selection," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 19, no. 6, pp. 621–628, Dec. 2009.
- [135] J. A. Obeso, C. W. Olanow, and J. G. Nutt, "Levodopa motor complications in Parkinson's disease," *Trends Neurosci.*, vol. 23, no. 10 Suppl, pp. S2–7, Oct. 2000.
- [136] M. Cerovic, V. Bagetta, V. Pendolino, V. Ghiglieri, S. Fasano, I. Morella, N. Hardingham, A. Heuer, A. Papale, F. Marchisella, C. Giampà, P. Calabresi, B. Picconi, and R. Brambilla, "Derangement of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) dependent striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia," *Biol. Psychiatry*, vol. 77, no. 2, pp. 106–

115, Jan. 2015.

- [137] V. C. Brandt, E. Niessen, C. Ganos, U. Kahl, T. Bäumer, and A. Münchau, “Altered synaptic plasticity in Tourette’s syndrome and its relationship to motor skill learning,” *PloS One*, vol. 9, no. 5, p. e98417, 2014.
- [138] H. R. Bourne, D. A. Sanders, and F. McCormick, “The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism,” *Nature*, vol. 349, no. 6305, pp. 117–127, Jan. 1991.
- [139] N. Takei, N. Inamura, M. Kawamura, H. Namba, K. Hara, K. Yonezawa, and H. Nawa, “Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites,” *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 24, no. 44, pp. 9760–9769, Nov. 2004.
- [140] G. Lenz and J. Avruch, “Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 46, pp. 38121–38124, Nov. 2005.
- [141] D. Nie, A. Di Nardo, J. M. Han, H. Baharanyi, I. Kramvis, T. Huynh, S. Dabora, S. Codeluppi, P. P. Pandolfi, E. B. Pasquale, and M. Sahin, “Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance,” *Nat. Neurosci.*, vol. 13, no. 2, pp. 163–172, Feb. 2010.
- [142] C. Quevedo, M. Salinas, and A. Alcázar, “Regulation of cap-dependent translation by insulin-like growth factor-1 in neuronal cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 291, no. 3, pp. 560–566, Mar. 2002.
- [143] Y. Li, K. Inoki, and K.-L. Guan, “Biochemical and functional characterizations of small GTPase Rheb and TSC2 GAP activity,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 18, pp. 7965–7975, Sep. 2004.
- [144] K. Inoki, Y. Li, T. Xu, and K.-L. Guan, “Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling,” *Genes Dev.*, vol. 17, no. 15, pp. 1829–1834, Aug. 2003.
- [145] C. A. Hoeffler and E. Klann, “mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease,” *Trends Neurosci.*, vol. 33, no. 2, pp. 67–75, Feb. 2010.
- [146] E. Jacinto, R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Rüeegg, A. Hall, and M. N. Hall, “Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 1122–1128, Nov. 2004.
- [147] V. Thomanetz, N. Angliker, D. Cloëtta, R. M. Lustenberger, M. Schweighauser, F. Oliveri, N. Suzuki, and M. A. Rüeegg, “Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology,” *J. Cell Biol.*, vol. 201,

- no. 2, pp. 293–308, Apr. 2013.
- [148] J. Huang, C. C. Dibble, M. Matsuzaki, and B. D. Manning, “The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 12, pp. 4104–4115, Jun. 2008.
 - [149] D. D. Sarbassov, S. M. Ali, S. Sengupta, J.-H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard, and D. M. Sabatini, “Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB,” *Mol. Cell*, vol. 22, no. 2, pp. 159–168, Apr. 2006.
 - [150] L. Chen, B. Xu, L. Liu, C. Liu, Y. Luo, X. Chen, M. Barzegar, J. Chung, and S. Huang, “Both mTORC1 and mTORC2 are involved in the regulation of cell adhesion,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 9, pp. 7136–7150, Mar. 2015.
 - [151] K. E. Hentges, B. Sirry, A. C. Gingeras, D. Sarbassov, N. Sonenberg, D. Sabatini, and A. S. Peterson, “FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 24, pp. 13796–13801, Nov. 2001.
 - [152] V. Beaumont, N. Zhong, R. Fletcher, R. C. Froemke, and R. S. Zucker, “Phosphorylation and local presynaptic protein synthesis in calcium- and calcineurin-dependent induction of crayfish long-term facilitation,” *Neuron*, vol. 32, no. 3, pp. 489–501, Nov. 2001.
 - [153] A. Casadio, K. C. Martin, M. Giustetto, H. Zhu, M. Chen, D. Bartsch, C. H. Bailey, and E. R. Kandel, “A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis,” *Cell*, vol. 99, no. 2, pp. 221–237, Oct. 1999.
 - [154] S. J. Tang, G. Reis, H. Kang, A.-C. Gingras, N. Sonenberg, and E. M. Schuman, “A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 1, pp. 467–472, Jan. 2002.
 - [155] D. Cota, K. Proulx, K. A. B. Smith, S. C. Kozma, G. Thomas, S. C. Woods, and R. J. Seeley, “Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake,” *Science*, vol. 312, no. 5775, pp. 927–930, May 2006.
 - [156] H. Mori, K. Inoki, H. Münzberg, D. Opland, M. Faouzi, E. C. Villanueva, T. Ikenoue, D. Kwiatkowski, O. A. MacDougald, M. G. Myers, and K.-L. Guan, “Critical role for hypothalamic mTOR activity in energy balance,” *Cell Metab.*, vol. 9, no. 4, pp. 362–374, Apr. 2009.
 - [157] S.-B. Yang, A.-C. Tien, G. Boddupalli, A. W. Xu, Y. N. Jan, and L. Y. Jan, “Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons,” *Neuron*, vol. 75, no. 3, pp. 425–436, Aug.

2012.

- [158] J. H. Kotaleski and K. T. Blackwell, “Modelling the molecular mechanisms of synaptic plasticity using systems biology approaches,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 11, no. 4, pp. 239–251, Apr. 2010.
- [159] M. A. Siuta, S. D. Robertson, H. Kocalis, C. Saunders, P. J. Gresch, V. Khatri, C. Shiota, J. P. Kennedy, C. W. Lindsley, L. C. Daws, D. B. Polley, J. Veenstra-Vanderweele, G. D. Stanwood, M. A. Magnuson, K. D. Niswender, and A. Galli, “Dysregulation of the Norepinephrine Transporter Sustains Cortical Hypodopaminergia and Schizophrenia-Like Behaviors in Neuronal Rictor Null Mice,” *PLoS Biol.*, vol. 8, no. 6, p. e1000393, Jun. 2010.
- [160] O. I. Dadalko, M. Siuta, A. Poe, K. Erreger, H. J. G. Matthies, K. Niswender, and A. Galli, “mTORC2/Rictor Signaling Disrupts Dopamine-Dependent Behaviors via Defects in Striatal Dopamine Neurotransmission,” *J. Neurosci.*, vol. 35, no. 23, pp. 8843–8854, Jun. 2015.
- [161] E. J. Nordstrom and F. H. Burton, “A transgenic model of comorbid Tourette’s syndrome and obsessive-compulsive disorder circuitry,” *Mol. Psychiatry*, vol. 7, no. 6, pp. 617–625, Jul. 2002.
- [162] L. Castellan Baldan, K. A. Williams, J.-D. Gallezot, V. Pogorelov, M. Rapanelli, M. Crowley, G. M. Anderson, E. Loring, R. Gorczyca, E. Billingslea, S. Wasyluk, K. E. Panza, A. G. Ercan-Sencicek, K. Krusong, B. L. Leventhal, H. Ohtsu, M. H. Bloch, Z. A. Hughes, J. H. Krystal, L. Mayes, I. de Araujo, Y.-S. Ding, M. W. State, and C. Pittenger, “Histidine Decarboxylase Deficiency Causes Tourette Syndrome: Parallel Findings in Humans and Mice,” *Neuron*, vol. 81, no. 1, pp. 77–90, Jan. 2014.
- [163] M. Xu, L. Li, H. Ohtsu, and C. Pittenger, “Histidine decarboxylase knockout mice, a genetic model of Tourette syndrome, show repetitive grooming after induced fear,” *Neurosci. Lett.*, vol. 595, pp. 50–53, May 2015.
- [164] K. C. Berridge, J. W. Aldridge, K. R. Houchard, and X. Zhuang, “Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette’s,” *BMC Biol.*, vol. 3, no. 1, p. 4, 2005.
- [165] M. Xu, A. Kobets, J.-C. Du, J. Lenington, L. Li, M. Banasr, R. S. Duman, F. M. Vaccarino, R. J. DiLeone, and C. Pittenger, “Targeted ablation of cholinergic interneurons in the dorsolateral striatum produces behavioral manifestations of Tourette syndrome,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 3, pp. 893–898, Jan. 2015.
- [166] A. E. Kelley, “Measurement of rodent stereotyped behavior,” *Curr. Protoc. Neurosci.*, pp. 8–8, 2001.

- [167] F. X. Castellanos, E. J. Fine, D. Kaysen, W. L. Marsh, J. L. Rapoport, and M. Hallett, "Sensorimotor gating in boys with Tourette's syndrome and ADHD: Preliminary results," *Biol. Psychiatry*, vol. 39, no. 1, pp. 33–41, Jan. 1996.
- [168] D. Braff, C. Stone, E. Callaway, M. Geyer, I. Glick, and L. Bali, "Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics," *Psychophysiology*, vol. 15, no. 4, pp. 339–343, Jul. 1978.
- [169] S. A. Forbes, D. Beare, P. Gunasekaran, K. Leung, N. Bindal, H. Boutselakis, M. Ding, S. Bamford, C. Cole, S. Ward, C. Y. Kok, M. Jia, T. De, J. W. Teague, M. R. Stratton, U. McDermott, and P. J. Campbell, "COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. D1, pp. D805–D811, Jan. 2015.
- [170] D. Vigil, J. Cherfils, K. L. Rossman, and C. J. Der, "Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 10, no. 12, pp. 842–857, Dec. 2010.
- [171] T. V. Fernandez, S. J. Sanders, I. R. Yurkiewicz, A. G. Ercan-Sencicek, Y.-S. Kim, D. O. Fishman, M. J. Raubeson, Y. Song, K. Yasuno, W. S. C. Ho, K. Bilguvar, J. Glessner, S. H. Chu, J. F. Leckman, R. A. King, D. L. Gilbert, G. A. Heiman, J. A. Tischfield, P. J. Hoekstra, B. Devlin, H. Hakonarson, S. M. Mane, M. Günel, and M. W. State, "Rare Copy Number Variants in Tourette Syndrome Disrupt Genes in Histaminergic Pathways and Overlap with Autism," *Biol. Psychiatry*, vol. 71, no. 5, pp. 392–402, Mar. 2012.
- [172] V. Wagh, M. X. Doss, D. Sabour, R. Niemann, K. Meganathan, S. Jagtap, J. A. Gaspar, M. A. Ardestani, S. Papadopoulos, M. Gajewski, J. Winkler, J. Hescheler, and A. Sachinidis, "Fam40b is required for lineage commitment of murine embryonic stem cells," *Cell Death Dis.*, vol. 5, p. e1320, 2014.
- [173] A. M. Fry, L. O'Regan, S. R. Sabir, and R. Bayliss, "Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 19, pp. 4423–4433, Oct. 2012.
- [174] L. S. Moniz and V. Stambolic, "Nek10 Mediates G2/M Cell Cycle Arrest and MEK Autoactivation in Response to UV Irradiation," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, no. 1, pp. 30–42, Jan. 2011.
- [175] A. C. Antoniou, J. Beesley, L. McGuffog, O. M. Sinilnikova, S. Healey, S. L. Neuhausen, Y. C. Ding, T. R. Rebbeck, J. N. Weitzel, H. T. Lynch, C. Isaacs, P. A. Ganz, G. Tomlinson, O. I. Olopade, F. J. Couch, X. Wang, N. M. Lindor, V. S. Pankratz, P. Radice, S. Manoukian, B. Peissel, D. Zaffaroni, M. Barile, A. Viel, A. Allavena, V. Dall'Olio, P. Peterlongo, C. I. Szabo, M. Zikan, K. Claes, B. Poppe, L.

Foretova, P. L. Mai, M. H. Greene, G. Rennert, F. Lejbkowitz, G. Glendon, H. Ozcelik, I. L. Andrulis, for the Ontario Cancer Genetics Network, M. Thomassen, A.-M. Gerdes, L. Sunde, D. Cruger, U. Birk Jensen, M. Caligo, E. Friedman, B. Kaufman, Y. Laitman, R. Milgrom, M. Dubrovsky, S. Cohen, A. Borg, H. Jernstrom, A. Lindblom, J. Rantala, M. Stenmark-Askmal, B. Melin, for SWE-BRCA, K. Nathanson, S. Domchek, A. Jakubowska, J. Lubinski, T. Huzarski, A. Osorio, A. Lasa, M. Duran, M.-I. Tejada, J. Godino, J. Benitez, U. Hamann, M. Kriege, N. Hoogerbrugge, R. B. van der Luit, C. J. v. Asperen, P. Devilee, E. J. Meijers-Heijboer, M. J. Blok, C. M. Aalfs, F. Hogervorst, M. Rookus, for HEBON, M. Cook, C. Oliver, D. Frost, D. Conroy, D. G. Evans, F. Laloo, G. Pichert, R. Davidson, T. Cole, J. Cook, J. Paterson, S. Hodgson, P. J. Morrison, M. E. Porteous, L. Walker, M. J. Kennedy, H. Dorkins, S. Peock, for EMBRACE, A. K. Godwin, D. Stoppa-Lyonnet, A. de Pauw, S. Mazoyer, V. Bonadona, C. Lasset, H. Dreyfus, D. Leroux, A. Hardouin, P. Berthet, L. Faivre, for GEMO, C. Loustalot, T. Noguchi, H. Sobol, E. Rouleau, C. Nogues, M. Frenay, L. Venat-Bouvet, for GEMO, J. L. Hopper, M. B. Daly, M. B. Terry, E. M. John, S. S. Buys, Y. Yassin, A. Miron, D. Goldgar, for the Breast Cancer Family Registry, C. F. Singer, A. C. Dressler, D. Gschwantler-Kaulich, G. Pfeiler, T. V. O. Hansen, L. Jonson, B. A. Agnarsson, T. Kirchhoff, K. Offit, V. Devlin, A. Dutra-Clarke, M. Piedmonte, G. C. Rodriguez, K. Wakeley, J. F. Boggess, J. Basil, P. E. Schwartz, S. V. Blank, A. E. Toland, M. Montagna, C. Casella, E. Imyanitov, L. Tihomirova, I. Blanco, C. Lazaro, S. J. Ramus, L. Sucheston, B. Y. Karlan, J. Gross, R. Schmutzler, B. Wappenschmidt, C. Engel, A. Meindl, M. Lochmann, N. Arnold, S. Heidemann, R. Varon-Mateeva, D. Niederacher, C. Sutter, H. Deissler, D. Gadzicki, S. Preisler-Adams, K. Kast, I. Schonbuchner, T. Caldes, M. de la Hoya, K. Aittomaki, H. Nevanlinna, J. Simard, A. B. Spurdle, H. Holland, X. Chen, for kConFab, R. Platte, G. Chenevix-Trench, D. F. Easton, and on behalf of CIMBA, "Common Breast Cancer Susceptibility Alleles and the Risk of Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Implications for Risk Prediction," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 23, pp. 9742–9754, Dec. 2010.

- [176] S. Ahmed, G. Thomas, M. Ghoussaini, C. S. Healey, M. K. Humphreys, R. Platte, J. Morrison, M. Maranian, K. A. Pooley, R. Luben, D. Eccles, D. G. Evans, O. Fletcher, N. Johnson, I. dos Santos Silva, J. Peto, M. R. Stratton, N. Rahman, K. Jacobs, R. Prentice, G. L. Anderson, A. Rajkovic, J. D. Curb, R. G. Ziegler, C. D. Berg, S. S. Buys, C. A. McCarty, H. S. Feigelson, E. E. Calle, M. J. Thun, W. R. Diver, S. Bojesen, B. G. Nordestgaard, H. Flyger, T. Dörk, P. Schürmann, P. Hillemanns, J. H.

- Karstens, N. V. Bogdanova, N. N. Antonenkova, I. V. Zalutsky, M. Bermisheva, S. Fedorova, E. Khusnutdinova, D. Kang, K.-Y. Yoo, D. Y. Noh, S.-H. Ahn, P. Devilee, C. J. van Asperen, R. A. E. M. Tollenaar, C. Seynaeve, M. Garcia-Closas, J. Lissowska, L. Brinton, B. Peplonska, H. Nevanlinna, T. Heikkinen, K. Aittomäki, C. Blomqvist, J. L. Hopper, M. C. Southey, L. Smith, A. B. Spurdle, M. K. Schmidt, A. Broeks, R. R. van Hien, S. Cornelissen, R. L. Milne, G. Ribas, A. González-Neira, J. Benitez, R. K. Schmutzler, B. Burwinkel, C. R. Bartram, A. Meindl, H. Brauch, C. Justenhoven, U. Hamann, J. Chang-Claude, R. Hein, S. Wang-Gohrke, A. Lindblom, S. Margolin, A. Mannermaa, V.-M. Kosma, V. Kataja, J. E. Olson, X. Wang, Z. Fredericksen, G. G. Giles, G. Severi, L. Baglietto, D. R. English, S. E. Hankinson, D. G. Cox, P. Kraft, L. J. Vatten, K. Hveem, M. Kumle, A. Sigurdson, M. Doody, P. Bhatti, B. H. Alexander, M. J. Hooning, A. M. W. van den Ouweland, R. A. Oldenburg, M. Schutte, P. Hall, K. Czene, J. Liu, Y. Li, A. Cox, G. Elliott, I. Brock, M. W. R. Reed, C.-Y. Shen, J.-C. Yu, G.-C. Hsu, S.-T. Chen, H. Anton-Culver, A. Ziogas, I. L. Andrulis, J. A. Knight, J. Beesley, E. L. Goode, F. Couch, G. Chenevix-Trench, R. N. Hoover, B. A. J. Ponder, D. J. Hunter, P. D. P. Pharoah, A. M. Dunning, S. J. Chanock, and D. F. Easton, “Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2,” *Nat. Genet.*, vol. 41, no. 5, pp. 585–590, May 2009.
- [177] K. Nishi, T. Takahashi, M. Suzawa, T. Miyakawa, T. Nagasawa, Y. Ming, M. Tanokura, and K. Ui-Tei, “Control of the localization and function of a miRNA silencing component TNRC6A by Argonaute protein,” *Nucleic Acids Res.*, p. gkv1026, Oct. 2015.
- [178] K. Nishi, A. Nishi, T. Nagasawa, and K. Ui-Tei, “Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus,” *RNA*, vol. 19, no. 1, pp. 17–35, Jan. 2013.
- [179] C. Méndez, C. L. Ahlenstiel, and A. D. Kelleher, “Post-transcriptional gene silencing, transcriptional gene silencing and human immunodeficiency virus,” *World J. Virol.*, vol. 4, no. 3, pp. 219–244, Aug. 2015.
- [180] J. Hu, J. Liu, D. Yu, Y. Chu, and D. R. Corey, “Mechanism of allele-selective inhibition of huntingtin expression by duplex RNAs that target CAG repeats: function through the RNAi pathway,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 40, no. 22, pp. 11270–11280, Dec. 2012.
- [181] Z. Jiang, N. Yu, P. Kuang, M. Chen, F. Shao, G. Martin, D. H. K. Chui, W. V. Cardoso, X. Ai, and J. Lü, “Trinucleotide repeat containing 6a (Tnrc6a)-mediated microRNA function is required for development of yolk sac endoderm,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 8, pp. 5979–5987, Feb. 2012.

- [182] N. J. Yoo, S. Y. Hur, M. S. Kim, J. Y. Lee, and S. H. Lee, "Immunohistochemical analysis of RNA-induced silencing complex-related proteins AGO2 and TNRC6A in prostate and esophageal cancers," *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.*, vol. 118, no. 4, pp. 271–276, Apr. 2010.
- [183] M. S. Kim, J. E. Oh, Y. R. Kim, S. W. Park, M. R. Kang, S. S. Kim, C. H. Ahn, N. J. Yoo, and S. H. Lee, "Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers," *J. Pathol.*, vol. 221, no. 2, pp. 139–146, Jun. 2010.
- [184] T. E. Moffitt, R. Houts, P. Asherson, D. W. Belsky, D. L. Corcoran, M. Hammerle, H. Harrington, S. Hogan, M. H. Meier, G. V. Polanczyk, and others, "Is Adult ADHD a Childhood-Onset Neurodevelopmental Disorder? Evidence From a Four-Decade Longitudinal Cohort Study," *Am. J. Psychiatry*, 2015.

謝辞

本稿を終えるにあたり、貴重な時間を遣い、本研究に快くご協力頂きました患者様、ご家族の皆様に深く感謝いたします。

研究の機会を与えて下さり、ご指導頂いた東京大学大学院医学系研究科 脳神経学専攻こころの発達医学教室 金生 由紀子 准教授、桑原 斉 准教授、精神医学教室 笠井 清登 教授に深謝を申し上げます。共同研究者として研究について貴重なご助言を下さった、東京大学医学部附属病院ゲノム医学センターの辻省次 教授、三井 純 先生、石浦 浩之 先生、東京大学新領域創成科学研究科の森下 真一 教授、吉村 淳 先生、土井 晃一郎 先生に深謝を致します。研究全般についてご指導頂いた、東京大学大学院教育学研究科 佐々木 司 教授、医学系研究科 精神医学教室 垣内千尋 准教授、帝京大学医学部 精神神経科学講座 栃木 衛 准教授、医学系研究科 こころの発達医学教室 川久保 友紀 先生に深謝致します。実験全般についてご指導頂いた、医学系研究科 分子精神医学講座の先生方、精神医学講座 西村 文親 先生に感謝いたします。解析環境の整備についてご指導頂いた東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター 宮野 悟 教授に感謝いたします。

統計解析について貴重なご助言を頂いた東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 ヒトゲノム多様性研究室 大橋順 准教授に深謝いたします。

患者様をご紹介頂いた、東京都立小児総合医療センター 総合診療科・児童思
春期精神科の先生方、小児総合医療センターでの研究にご協力頂いた大倉 勇史
先生に感謝いたします。信愛会 さくら病院での研究にご協力頂いた青木 直人
先生に感謝いたします。患者様の採血や臨床評価でご協力頂いた、東京大学 学
生相談ネットワーク本部の島田 隆史 先生、大学院医学系研究科 こころの発達
医学 稲井 彩 先生、古川 賢臣 先生に感謝いたします。