

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791197

研究課題名(和文) 生殖細胞のDNAメチル化解析による自閉症候補遺伝子の探索

研究課題名(英文) Search for the candidate genes for autism by the DNA methylation microarray analysis of sperm cells

研究代表者

栃木 衛 (Tochigi, Mamoru)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：40456116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症遺伝研究において父親の生殖細胞(精子)を用いてエピジェネティックな解析を行うことの意義について理論的検討を行うと共に、マイクロアレイを用いたDNAメチル化のゲノムワイドな定量方法の確立を目指し、血液由来DNAを対象としてマイクロアレイによるメチル化解析の予備的検討を行った。定量方法の検討の結果では、同一サンプルであっても必ずしも十分な再現性が得られない場合があり、評価方法にさらなる検討を要することが判明した。

研究成果の概要(英文)：The utility of sperm cells in the epigenetic studies of autism was reviewed. It was concluded that sperm cells from the patients' fathers may be helpful for identifying the candidate genes for autism. It was also tried to establish the method of evaluating the genome-wide DNA methylation status by using microarrays, and investigate the DNA methylation status by using blood cells as a pilot study. As a result, the reproducibility of the method was not enough, and further improvement of the assessment procedure was recommended.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：自閉症 エピジェネティクス マイクロアレイ DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

自閉症は 90%以上の高い遺伝率を示すことから、多因子遺伝病の中でも特に強い遺伝要因の関与が示唆されている (Lintas and Persico, 2009)。しかし、染色体異常に伴って発症する場合や一部の症候群を除けば、現在のところはっきりした原因遺伝子の同定にまでは至っていない。その理由の 1 つは、これまでの研究の多くが、一般集団中にも存在する比較的頻度の高い遺伝子多型が疾患の発症に関与するという Common Variant-Common Disease (CVCD) 仮説に基づいて探索を進めていたことにあると考えられる。実際、2009 年に報告された大規模ゲノムワイド関連研究の結果でも、最も有意な関連を示した多型のオッズ比は 1.19 に過ぎず、今後さらに感受性遺伝子の同定を進めようとするれば少なくとも 1000 人単位のサンプル規模が必要であることが示された (Wang et al., 2009)。

従って、今後も遺伝要因の検討を通して自閉症の病態を明らかにしようとするならば、CVCD 仮説のみならず、頻度は稀ではあるが疾患発症への寄与度の高い変異の存在を想定する Multiple Rare Variant-Common Disease (MRVCD) 仮説や、DNA の配列変化を伴わずに子孫や娘細胞に伝達される遺伝子機能の変化、すなわちエピジェネティックな変異を探索する必要があるものと考えられる。実際、前者については、2003 年以降相次いで関連が指摘された Neuroligin、SHANK3、Neurexin などのシナプス関連遺伝子における変異の頻度は 1%程度かもしくはそれ以下と極めて稀なものである。また、マイクロアレイを用いてゲノムワイドに行われたコピー数多型 (CNV) 解析では、自閉症患者の 10%に de novo CNV が発見されたが、それらはそれぞれ異なるものであり、頻度としてはやはり極めて稀であることが示された (Sebat et al., 2008)。これらの稀な変異やエピジェネティックな変異の関与については、一卵性双生児不一致例のように、同じ遺伝子を共有していながら表現型が異なる症例の存在や、自閉症患者の父親の年齢が高い、すなわち生殖細胞の DNA において加齢に伴った新たな変異が生じている可能性があるという知見からも示唆されている。

報告者は、これまでに東京大学・東海大学・鳥取大学の 3 大学で結成された自閉症 DNA コンソーシアムに参加し、サンプルの拡充に寄与するとともに直接分子遺伝学的研究にも携わって主に SNP を利用した関連研究の手法による成果を発表してきた (Marui et al., 2004; Tochigi et al., 2007; Kato et al., 2008; Tochigi et al., 2008; Kato et al., 2008)。特に、ゲノムインプリンティングが起きる領域である 15 番染色体長腕 11-13 (15q11-q13) についての解析結果では、父親由来アレルのみが発現する領域 (PED)

に位置する SNURF-SNRPN とその下流の HBII-52、さらに母親由来アレルのみが発現する領域 (MED) に位置する ATP10C において有意な関連を見出した (Kato et al., 2008)。SNURF-SNRPN は同領域のインプリンティングの成立に必要な領域 (Imprinting Center) とオーバーラップしており、コードされるタンパクはインプリンティングの制御に関与していると考えられている。HBII-52 は SNURF-SNRPN と一括して転写される non-coding RNA で、核小体低分子 RNA (snoRNA) に分類され、その機能はセロトニン 2C 受容体の RNA 編集制御であることが明らかにされている (Kishore and Stamm, 2006)。これらの発現が脳に限局されていること、また、自閉症とセロトニン機能異常の関連が示唆されていることを考えると、応募者らの得た結果は極めて興味深いものであり、さらに詳しくこの領域を解析する意義があると考えられた。

そこで、報告者は、MRVCD 仮説からのアプローチの試みとして、アレイ CGH や次世代シーケンサーの方法により同領域における微細構造異常の有無の検討を進め、CVCD 仮説・MRVCD 仮説双方からのアプローチによる自閉症分子病態の解明に取り組んだ。

今回構想した研究は、父親の生殖細胞の DNA において加齢に伴って生じた稀な変異やエピジェネティックな変異が自閉症の遺伝要因について大きな役割を果たしているという仮説に基づき、特にこれまで検討がほとんど行われてこなかったエピジェネティックな変異を中心に解析を行おうとするものである。今回構想している計画に沿って研究を展開させることができれば、CVCD 仮説・MRVCD 仮説に加え、エピジェネティクスも含めた包括的なアプローチを試みることができるだけでなく、現在応募者が解析の対象としており、ゲノムインプリンティングというエピジェネティックな機構によって成立する現象と深い関わりのある 15q11-q13 についても新たな知見を付け加えられる可能性がある。報告者は、双極性障害患者の生殖細胞を含む多組織においてエピジェネティックな解析を行って成果を上げており (Kaminsky et al., 2012) 今回その方法論を自閉症にも応用させてより包括的な解析を試み、これまでに得た知見とも関連させながら研究を展開しようとするものである。

2. 研究の目的

父親の生殖細胞の DNA におけるエピジェネティックな変異 (具体的にはメチル化の異常) が自閉症の発症に果たす役割を明らかにする。実際には、自閉症患者群と健常対照群の DNA を比較することにより DNA メチル化の差異があるかどうかを検討し、差異が認められればさらに詳しい解析を行って新たな自閉症候補遺伝子の同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) 精子サンプルの収集

東大病院精神神経科および関連病院の通院患者を中心に、その両親にも研究への協力を求め、患者・家族の血液、および父親の精子の提供を受ける。サンプル数としては20例を目標とし、特に本研究においてはサンプルの確保が極めて重要なステップとなることから、平成24年度は研究活動をこの点に絞って行う。また、自閉症患者群のサンプル収集と並行して、健常対照群のサンプル収集を進める。

(2) マイクロアレイを用いた DNA メチル化の定量

父親の精子から抽出した DNA について、マイクロアレイを用いて全ゲノムにわたりメチル化の状態を定量する。マイクロアレイは市販のものを活用し、受託にて行う。

(3) データ解析

健常対照群との比較により、メチル化の程度に有意な差のある領域を抽出する。また、先行研究や、これまでに応募者が得てきた結果から示唆される領域についてメチル化の状態との関連の有無を検討する。

(4) 候補領域についての詳細な検討

マイクロアレイの結果により得られた候補部位や、先行研究により指摘されてきた候補遺伝子について、パイロシーケンスによる確認実験を行う。また、バイサルファイトシーケンス法による解析も合わせて行い、細胞毎のメチル化の状態についても検討する。

(5) 患者・家族の血液の DNA メチル化状態の検討

父親の精子で DNA メチル化の変異が確認されたら、患者・家族の血液から抽出した DNA でも同様の変異が認められないかどうかを調べ、父親の精子における DNA メチル化の変異の意義についての評価の一助とする。

4. 研究成果

本研究実施にあたって、まずは精子サンプルの収集が大きな課題であり、生殖細胞を扱うことから倫理的配慮が極めて重要で、また社会通念上もサンプルの提供を受ける際に適切な説明を行う必要があると考えられたことから、自閉症の遺伝研究において生殖細胞を扱うことの意義について理論的検討を行い、サンプル収集を適正に実施するための準備とした。

検討した結果によれば、自閉症におけるエピジェネティクス領域の先行研究は MECP2、Fragile X、15q11-13 などの特殊な遺伝子や

染色体領域を対象としたものが中心で、non-syndromic な症例を対象としたゲノムワイドな研究はほとんどなく、疾患と直接関連する臓器である脳組織は現実には入手困難であるという状況にあり、精子のエピジェネティックな変異が自閉症の直接の原因となっている可能性があること、父親の年齢が上昇すると自閉症の罹患率が上昇するという報告があること、エピジェネティクスの代表的なメカニズムであるインプリンティングの異常で現に自閉症関連疾患を発症すること、海外では既に解析の対象となっていることなどを考えると、精子を扱うことの意義は十分にあると結論づけられた。ただし、東大病院精神神経科および関連病院の状況を改めて確認したところ、精子サンプルの収集についてはなお慎重を期する必要があると判断し、倫理的な配慮のもとに当初の予定を変更して、マイクロアレイを用いた DNA メチル化のゲノムワイドな定量方法の確立と、東大病院精神神経科にて保有する自閉症患者の血液サンプルを用いた DNA メチル化解析を先行して実施することとした。

まず、マイクロアレイを用いた DNA メチル化のゲノムワイドな定量方法の確立においては、統合失調症一卵性双生児不一致例および健常一卵性双生児それぞれ3組の血液由来 DNA サンプルを用い、Illumina 社 Infinium HumanMethylation450 によるビーズアレイ解析を3回繰り返して行う (triplicate) ことによって、アレイによるメチル化定量の再現性と評価方法について検討した。このマイクロアレイは、メチル化検出用および非メチル化検出用の45万以上のプロンプが搭載されたもので、CpG アイランド内だけでなく、CpG アイランド外のメチル化サイトもターゲットとされている。各サイトのメチル化の程度は以下の計算式に基づく値によって見積もられ、0.2の値は1%未満の偽陽性率によって確実に検出され、再現性は99%以上とされている。

$$\beta = \frac{\text{Max}(\text{Signal}_B, 0)}{\text{Max}(\text{Signal}_A, 0) + \text{Max}(\text{Signal}_B, 0) + 100}$$

得られた結果を解析したところでは、同一サンプル内の再現性 (相関) よりも、不一致例双生児間の相関の方が高いなど、同一サンプルであっても必ずしも十分な再現性が得られない場合があることが判明したため、マイクロアレイデータの適切な処理・評価方法について現在も検討を行っているところである。

一方、血液サンプルを用いた DNA メチル化解析においては、自閉症患者40例および健常対照群20例について上述の Illumina 社 Infinium HumanMethylation450 による解析を行い、preliminary な結果を得ている。得られたマイクロアレイデータについて、自

閉症患者群を産科合併症の有無で 20 例ずつに分け、それぞれを健常対照群と比較し、メチル化の程度に有意な差(t 値 > 0.1、p 値 < 0.05) を認めたサイトのうち、産科合併症を伴う自閉症に特異的なものとして、27 か所を同定した。この中には CACNA1A などの有力な候補遺伝子内のサイトも含まれており、今後さらに検討を進めてマイクロアレイデータの処理・評価方法が確立されれば、新たな自閉症候補遺伝子を同定できる可能性も大きい。また、今回倫理的な配慮から準備段階までにとどめた精子サンプルの収集についても、状況を見極めつつ取り組み、父親の生殖細胞の DNA におけるメチル化異常が自閉症の発症に果たす役割について検討を行っていく方針である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.teikyo-psy.com/laboratory.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栃木 衛 (TOCHIGI, Mamoru)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号 : 404564116