

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18591165
 研究課題名(和文) エピジェネティクス機構の解析を中心とした自閉性障害の
 病因遺伝子解明
 研究課題名(英文) candidate gene analysis for autism focusing on the epigenetic
 mechanism
 研究代表者
 山形 崇倫 (YAMAGATA TAKANORI)
 自治医科大学・医学部・准教授
 研究者番号 00239857

研究成果の概要：

自閉性障害の病因・病態に遺伝子不活化などのエピジェネティクス機構が関与していると推定し、Rett 症候群の病因遺伝子 *MECP2* により発現調節されている遺伝子群について解析した。自閉性障害患者における変異解析の結果、*DLX6* に患者のみで変異が検出された。また、一部の患者リンパ芽球で *DLX5* と他の遺伝子の発現増加が検出された。一部の自閉性障害患者で、これらの遺伝子や遺伝子発現調節機構が病態に関連していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：自閉症、エピジェネティクス、*MECP2*、*DLX5*、*DLX6*

1. 研究開始当初の背景

自閉性障害(Autism spectrum disorder、以下、ASD と略す)は、社会性の障害、コミュニケーション障害、反復的、常同的行動を特徴とする発達障害で、発症率は高く、7-8/1000 人と推定されている。

近年、連鎖解析や候補遺伝子解析などによる病因遺伝子解明研究が、世界的になされているが、ごく少数例に *Neurologin* や *SHANK3* 遺伝子の変異が同定されたのみで、ほとんどの患者で病因遺伝子は不明である。

また、一部の患者に *de novo* の copy number variation (CNV) が検出されている。病因となる遺伝子が多数ある可能性、いくつかの遺伝性素因と環境因子の相互作用により発症する多因子遺伝の可能性などが考えられている。また、*imprinting* 領域である 15q 染色体重複を持つ患者で、重複部位が母由来の時に ASD を発症することや、自閉症状を示す Rett 症候群の病因遺伝子 *MECP2* が遺伝子不活化に関与していることなどから、ASD 発症にエピジェネティクス機構の関与も推定される。

Rett 症候群は、手の常同運動と痙攣、呼吸異常、自閉症状を特徴とする発達障害で、病因遺伝子として *MECP2* が同定されている。*MECP2* は標的遺伝子の転写調節領域のメチル化部位に結合し、遺伝子の発現を抑制、あるいは促進して転写を調節しており、*MECP2* の機能が欠如することにより、標的遺伝子の発現が過剰あるいは低下することが報告されている。Rett 症候群の諸症状は *MECP2* により調節される遺伝子の発現異常によるものと考えられ、標的遺伝子の同定が進められている。自閉症状は Rett 症候群の主要な症状の一つであるので、*MECP2* により調節を受けている遺伝子は、ASD の候補遺伝子であると考えられる。例えば、ASD 患者や双極性障害患者のリンパ球において、*MECP2* により発現が調節されている *BDNF* の発現パターンが変化していたことが報告されており、*MECP2* により発現調節を受けている遺伝子、なかでも神経形成と機能に関与する遺伝子は、ASD の候補遺伝子と考えられる。

一方、ASD の病因遺伝子座研究において、染色体 7q21 に連鎖が報告されている。7q21 領域は、*MECP2* 結合部位を有する imprinting 領域を含んでおり、そこに局在する *DLX5* は *MECP2* により調節を受けていると報告されている。*DLX5* とそれに隣接する *DLX6* は、神経発生に働く homeobox 遺伝子である。

2. 研究の目的

本研究では、ASD の発症と、エピジェネティクス機構の異常との関連性を解析し、ASD の病因、病態を解明するために、まず、ASD との連鎖が報告されている 7q21 に局在する *DLX5* と *DLX6* を主に解析した。さらに、7q21 以外に局在し *MECP2* により発現調節されている *BDNF*、*SGK1*、*FXYD1*、*IGF2*、*IGFBP3* についても解析した。*DLX5* は脳とリンパ球で imprinting されていると報告されており、ASD 患者のリンパ芽球を用いて、遺伝子発現異常の有無を real-time PCR で解析すると同時に、遺伝子変異解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子変異解析

① 対象

informed consent が得られた、3-23 歳の ASD 患者 63 名。

② 方法

リンパ芽球から DNA を抽出し、各遺伝子の全エクソンとその近傍を PCR で増幅した。

得られた PCR 試料について、変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)法で塩基配列異常のスクリーニングを行った。DHPLC 法で異常を検出した PCR 産物は、直接塩基配列決定法により、塩基配列を確認した。確認した塩基配列異常については、正常対照者 212 名においてその有無を確認した。

(2) 遺伝子発現解析

① 対象

ASD 患者 10 名、正常対照者 6 名を解析した。ASD 患者のうち 4 名は典型的な自閉症であり、軽度から中等度の知的障害を認め、2 名は高機能自閉症、1 名は Asperger 症候群であり、他の 3 名は、特定不能の広汎性発達障害、精神遅滞であった。広汎性発達障害患者の 1 名のみ女性で、他は男性で、正常対照者は全員男性であった。

さらに、遺伝子変異解析で、R219H 変異を検出した ASD 患者兄弟例 2 名の遺伝子発現解析も行った。

② 方法

ASD 患者および正常対照者、それぞれのリンパ芽球から RNA を抽出、cDNA を作製し、遺伝子発現を real-time PCR 法で解析した。Real-time PCR は、7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA) を使用し、95°C 20 秒で反応後、95°C 3 秒、62°C 30 秒の反応を 60 サイクル行った。個々の遺伝子の発現レベルの解析は、Applied Biosystems 社の既製のプライマーを用い、Human GAPDH (2X) (Applied Biosystems, CA) を内因性コントロールとして使用した。解析は Applied Biosystems 7500 Fast System SDS Software v1.3.1. で行い、解析結果は、正常対照者 C42 の発現結果を 1.0 として、各々の遺伝子の発現量を相対的比率により示した。ASD 患者群と正常対照者群の発現量の平均値は、F 検定により分散分析を行い、Welch の t 検定により統計的解析を行った。なお、発現量の解析は、細胞浮遊液 3 回採取したものを解析し、結果を平均した。

(3) Allele specific expression analysis

① 対象

DLX5 の 3'UTR に C7/C8 mononucleotide repeat polymorphism を検出した、患者 2 名、正常対照者 2 名。

② 方法

mononucleotide repeat polymorphism 周囲の領域を PCR により増幅し、直接塩基配列決定法で各アレルの発現量を解析した。

4. 研究成果

A. DLX5 および DLX6 解析

(1) 遺伝子変異解析

① *DLX5* では、ASD 患者 63 名中 24 名がヘテロ接合体、すなわち 126 アレル中 24 アレルが、C8 mononucleotide repeat polymorphism であった。

疾患に関連する変異は検出されなかった。

② *DLX6* では、2 種類の塩基置換を検出した。一つは患者 63 名中 2 名で検出された G450A で、アミノ酸変化はなく SNP と考えられ、正常対照者では、212 名中 1 名で検出された。他の一つは、G656A で、R219H のアミノ酸変化をきたす。この塩基置換は、1 名の男児 ASD 患者で検出されたが、212 名の正常対照者では検出されなかった。この患者の男児同胞 1 名でも同じ変異を検出した。G656A 変異を検出したこの男児同胞例 2 名の *DLX6* の発現解析の結果、2 名のうち一方の *DLX6* 発現量は正常対照者の発現量と同様であったが、他方の発現は増加していた。

表 1. 遺伝子変異解析で検出された塩基変異

Gene	Base	AA	Pt	Cont
<i>DLX5</i>	3' UTR	C7/C8	24/64	
<i>DLX6</i>	G450A	Q150Q	2/63	1/212 ($p=0.07$)
<i>DLX6</i>	G656A	R219H	1/63	0/212

(2) 遺伝子発現解析

① 正常対照者 C42 の発現量を 1.0 として、各々のサンプルの発現量を相対的比率で示した (図 3)。 *DLX5* においては、ASD 患者群の平均発現レベルは、正常対照者群の平均発現レベルと統計学的有意差はなかった ($p = 0.08$) (図 3-a)。しかし、A6、A35、A56、A68 の 4 名の ASD では、正常対照群よりも高い発現レベルを示した (図 3-b)。これら 4 名の臨床的特徴を以下に示す。

A6 は広汎性発達遅滞および知的障害の女児で、社会性の障害があり、また言語コミュニケーションが困難であり、多動、パニックがあった。しかし、この患者には、反復性常動運動、こだわりの強さなどはなかった。A35 は Asperger 症候群の男児で、知的障害はなく、言語発達はほぼ正常であったが、社会性の障害が見られた。この患者は、時折パニッ

クを起こし、こだわりの強さが見られた。A56 は典型的な自閉症で、軽度知的障害のある男児であった。この男児は、多動があり、時折パニックが見られた。A68 は中等度知的障害とパニックのある典型的自閉症患者だった。

発現の増加がなかった ASD 患者 6 名の臨床的背景は、軽度から中等度の知的障害を認める典型的な自閉症 2 名、高機能自閉症 2 名、他の 2 名は特定不能の広汎性発達障害、精神遅滞の患者であり、*DLX5* の発現が増加している ASD 患者群と増加していない ASD 患者群で、臨床的特徴に一定の傾向はなかった。

② *DLX6* の発現レベルは、サンプルごとに異なり、一定の傾向はなかった。また、*DLX6* の発現は非常に低く、3 名では、発現を検出できず、患者群と正常対照群では統計学的有意差はなかった ($p = 0.48$) (図 3-a)。

③ 対照として、*PEG10* の発現解析も行った。ASD 患者群の *PEG10* の発現は、正常対照群と統計学的有意差はなかった ($p = 0.52$) (図 3-a)。

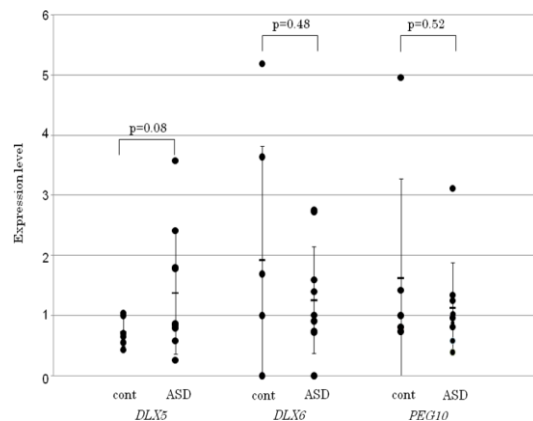


図 3. 遺伝子発現解析

(3) Allele specific expression analysis

① *DLX5* の 3'UTR に C7/C8 mononucleotide repeat polymorphism を検出した 2 名の ASD 患者と、2 名の正常対照者で、*DLX5* は両方のアレルが発現しており、不活化を受けていないと判断された。

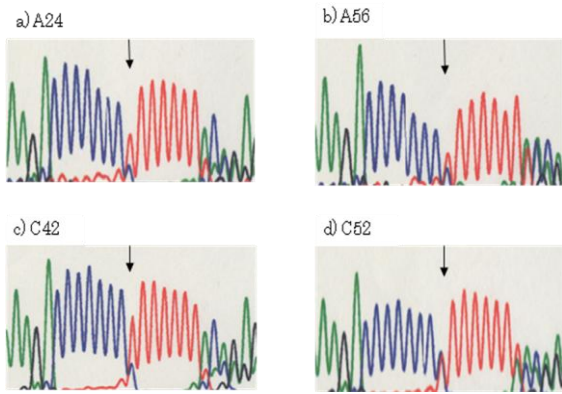


図 5. *DLX5* C7/C8 多型を持つアレルの発現

B. 7q31 以外に局在する遺伝子解析

(1) 遺伝子変異解析

SGK1 および *BDNF* を解析した。

SGK1 では、ASD 患者において、A348G、C720T の塩基置換を検出したが、正常対照でも同率に検出された。

BDNF に遺伝子変異は検出されなかった。

(2) 遺伝子発現解析

SGK1 では、ASD 患者の平均発現レベルは、正常対照群よりも高値で、統計的有意差を認めた (cont vs. ASD ; $p < 0.05$) が、明らかに高値を示したのは、A6、A14、A68、A84 の 4 名であり、他は対照とほぼ同等の発現レベルであった (図 6)。

BDNF と *FXYP1* の発現レベルは、ASD 患者群、対照群で差異はなかった。

IGF2 の発現レベルは、5 名の ASD 患者では、対照群より高値であったが、統計的有意差はなかった (図 6)。

IGFBP3 の発現レベルは、ASD 患者、対照において個体により発現量は大きくことなり、一定の傾向はなかった (図 6)。

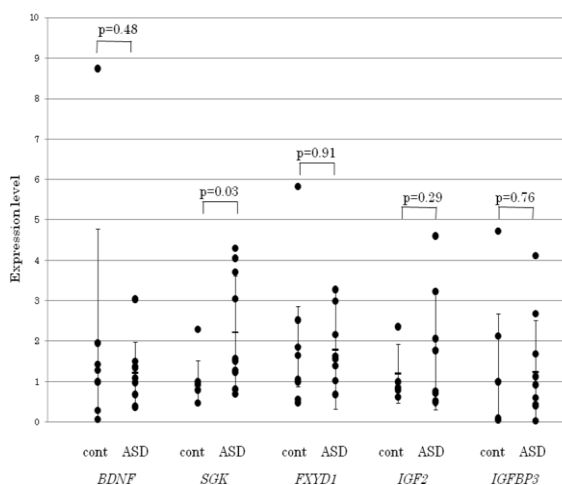


図 6. 遺伝子発現解析

(4) 考察

ASD の候補遺伝子を同定するため、*DLX5*、*BDNF*、*SGK1*、さらに *DLX5* に隣接し *DLX* family のサブタイプである *DLX6* の遺伝子変異解析を行った結果、*DLX6* では、患者兄弟例の 2 名で G656A 変異を検出した。この変異は、212 名の正常対照者では検出されなかった。両親の解析は行えなかったが、この変異はこれまでは報告されていない変異であり、正常対照でも検出されず、種間で保存されているアミノ酸の変化を来すことなどから、ASD の発症に関連する変異の可能性が示唆された。

ASD 患者の *DLX5* 発現量は、平均値は正常対照と有意差はなかったが、10 名中 4 名の患者で遺伝子発現レベルが増加していた。培養リンパ芽球を用いた解析であり、培養条件等による遺伝子発現の変化や遺伝子発現量が少ないため正確に検出されていないなどの要因により影響されている可能性も否定できないが、これらの患者においては、*DLX5* の発現調節の異常、あるいは、*DLX5* シグナル下流の分子の異常など、遺伝子発現調節に関与する何らかの分子学的機序の破綻が ASD の病態に関連している可能性も推察された。

DLX5 と *DLX6* は、GABA 神経系の発生にも関与することが示されている。これまでの解析報告で、ASD 患者に *DLX5* と *DLX6* に変異は検出されていないが、*DLX6* で患者に変異が検出されたことや、*DLX5* の発現が多い患者が検出されたことなどから、*DLX5* と *DLX6* が一部の患者において ASD 発症に関与している可能性が推察された。

SGK1 では、ASD 患者における遺伝子発現レベルは、正常対照群よりも統計的に有意に高値を示し、特に 4 名の ASD 患者では発現量が多かった。これらの患者では、*MECP2* に関連した、*SGK1* の発現を調節する何らかの機序の破綻が病態に関与している可能性も考えられた。

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 2 件)

1) Nakashima N, Yamagata T, Mori M, Kuwajima M, Suwa K, Momoi MY. Expression analysis and mutation detection of *DLX5* and *DLX6* in autism.

Brain Dev. 査読あり 2009. In press.

2) Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, Momoi MY. Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり 2008;377:926-929.

[学会発表] (計 4 件)

① Nakashima N, Yamagata T, et al: Imprinted genes relating with MECP2 in 7q21 are not major causative genes for autism. The 56th Annual Meeting for the American Society of Human Genetics. 2006年10月10日 New Orleans.

② Zhiling Y, Yamagata T, et al: G-protein coupled receptor genes as genetic risk factor for autism. 第49回日本小児神経学会総会 2007年7月6日 大阪.

③ The 58th Annual Meeting for the American Society of Human Genetics.

Nakashima N, Yamagata T, et al: Genes relating synaps in 7q31 as Candidate genes for Autism. 2008年11月14日 Philadelphia,

④ Saito M, Yamagata T, et al: Syntrophin- γ 2 that interacts with neuroligins is not related with autism. 2008年11月12日 Philadelphia

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 崇倫 (YAMAGATA TAKANORI)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号 00239857

(2) 研究分担者

森 雅人 (MORI MASATO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号 10337347

中島 尚美 (NAKASHIMA NAOMI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号 20337330

桑島 真理 (KUWAJIMA MARI)

自治医科大学・医学部・研究生

研究者番号 30398515

(3) 連携研究者