

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04889

研究課題名(和文) 自閉症スペクトラムと注意欠如・多動性障害の病態解明

研究課題名(英文) The clarification of pathophysiology in Autism Spectrum Disorder and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder

研究代表者

中村 和彦 (Nakamura, Kazuhiko)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：80263911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害は遺伝学的要因が大きいと考えられていることから、日本人の自閉症スペクトラム障害患者に対して遺伝学的な研究を実施した。その結果、自閉症スペクトラム障害患者に特徴的なゲノムのコピー数異常領域が見出された。また、その領域は欧米人を対象とした結果と重複していたが、日本人の場合オッズ比が高かったことから、発症に関わるより決定的なコピー数異常領域であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Since ASD have been thought to be arisen from genetic factors, we examined genetic analysis in Japanese patients with autism spectrum disorder (ASD). This study revealed that the patients with ASD have the characteristic copy number variation region and these regions were overlapped with previous studies in Westerners patients with ASD. However, the odds ratio was higher than previous study. This result indicated that detected region was crucial for Japanese patients with ASD.

研究分野：児童・思春期精神医学

キーワード：Autism Spectrum Disorder ADHD

## 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム (Autism Spectrum Disorder: ASD)は、有病率の上昇により臨床的にも注目されている神経発達障害の一つで診断基準は現在なお流動的で、今回の診断基準改訂においては主症状が二つにカテゴリー化された。一つは社会的コミュニケーションともう一つは限局された反復的な行動である。この二つが揃って初めて ASD と診断される。しかしながら、全く相互連関のない異なる症状の二つが融合することで疾病が成り立つことであり病態学的には未解明である点に着目した。

ASD は遺伝学的要因が大きいと考えられており、我々は ASD 関連遺伝子を各種報告してきた。また、画像研究では ASD のセロトニン系の障害に注目し、帯状回におけるセロトニン系の障害と ASD の社会的コミュニケーション障害との相関があり、視床のセロトニン系の障害と ASD の限局された反復的な行動との相関があるとの報告を行った。さらに脳内ミクログリアの活性が高いほど社会的コミュニケーション障害の重症度が高いことを明らかにした。以上の研究成果から我々は ASD が二つの疾患の合併症であり、それらは遺伝学的要因が決め、環境要因は症状の重症度に関与するとの仮説を考案した。さらに我々は ASD の発症に関する 2 ヒットモデルを適応し、ASD になりやすい家族性の common variants が 1 ヒット目であり、それに 2 ヒット目として、個々の ASD の *de novo* 遺伝子変異があると考えた。そして今までの Genome-Wide Association Study (GWAS)研究において、対象症例を多くしても、オッズ値が上がらず、さらに欧米人 ASD サンプルの中に、アジア人 ASD サンプルを入れると有意差がなくなることも明らかになっている。したがって、欧米人 ASD とアジア人 ASD については、GWAS 研究における common variant における共通性よりは、ASD の個々の *de novo* 変異の起こり方が欧米人 ASD とアジア人 ASD 異なると推測できるため、コミュニティベースの日本人 5 歳児を対象として遺伝学的研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、コミュニティベースの 5 歳児に対して、CNV 解析による遺伝学的な探索を行う。また、欧米人と比較して特徴的なコピー数異常ゲノム領域が認められるかを明らかにし、さらにコミュニティベースのサンプルにおける ASD 診断の有効性について検討する。

## 3. 研究の方法

アメリカ神経学会 American Academy of Neurology (AAN) が推奨した 2 段階のアルゴ

リズムに従って診断を行い、CNV 解析では、健常者 129 (男児:64、女児:65)名、ASD 患者 67 (男児:43、女児:24)名を対象とした。また、Attention-Deficit/Hyperactivity disorder (AD/HD)との併存が約 60%であったため併存症も含めて解析した。被験者から末梢血を採取しゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA は精製度や断片化の有無を確認したのち、Affymetrix Genome-Wide human SNP6.0 キットを用いて、CNV 解析を行った。Penn CNV によるコピー数異常の検出には、QC (Quality Control):  $0.4 < \text{かつ}$  MAPD (the Median of the Absolute values of all Pairwise Differences):  $< 0.4$  を満たしたサンプルのみを用いた。また、隠れマルコフモデルにより Copy Number を推定し、CN=2 以外をコピー数異常領域とし、CN=0, 1 を deletion、CN=3, 4 を duplicate と判定した。健常者と比較して ASD 患者群においてコピー数異常が見られた領域は、Chi-squared test により算出し、 $P < 0.05$  で有意差ありと見なした。

## 4. 研究成果

欧米人を対象とした先行研究では、健常者と比較して ASD 患者 1 人あたりのコピー数異常領域の箇所が多いことが報告されていたが、我々の研究では、健常者 37.8 (男児:38.2、女児:37.4)箇所、ASD 患者 37.4 (男児:38.0、女児: 36.8)箇所と有意差は認められなかった (Student's t-test,  $P = 0.466$ )。また、表に示すようなゲノム領域において ASD 患者で有意にオッズ比が高いコピー数異常領域を検出した。欧米人を対象とした CNV 解析では、本研究で明らかになったいずれの領域もコピー数異常があることが複数報告されており、日本人においても欧米人と共通のコピー数異常ゲノム領域が原因であることが明らかになった。しかしながら、先行研究の場合オッズ比が 1.2~1.6 と小さい一方で、日本人を対象とした本研究の結果ではオッズ比が 2.0~3.5 と比較的高い値を示したことから、日本人においては ASD 発症に関わる、より決定的なコピー数異常ゲノム領域であることが示唆された。12q21.31~q21.33 には遺伝子が含まれておらず、4q13.2 には *UBA6*、8p23.1 には *MCPHI* と *PINXI*、18q12.3 には *RIT2* と *SETBP2* が含まれている。これらの遺伝子の点突然変異は rare ではあるが、ASD と関連していることが知られている。以上のコピー数異常ゲノム領域や遺伝子が日本人 ASD において、より決定的な原因となっているかは今後検討する予定である。また、AD/HD との併存も含めて解析しているため、より詳細な解析をする場合には、被験者数を増やし、AD/HD との併存の有無や ASD の症状により分類分けを行なった方が、良いのではないかと示唆が得られた。

表. ASD 患者の特徴的なコピー数異常領域

染色体	領域	CNV タイプ	オッズ比	P-value
chr12	q21.31~ q21.33	deletion	2.63	0.013
chr4	q13.2	duplication	2.89	0.02
chr8	p23.1	deletion-duplication	3.47	0.03
chr18	q12.3	deletion-duplication	2.05	0.043

ASD は客観的なバイオマーカーが存在しないため、ガイドラインに従っても診断が難しいことが多い。そのため、血中バイオマーカー、遺伝学的なバイオマーカーの探索が世界中で行われているが、人種・個人差が大きいため、同定されていない。しかしながら、コミュニティーベースであれば、人種による影響は受けないと考えられ、また5歳児を対象とすることで環境的要因を限りなく排除できるため、明らかにしたコピー数異常ゲノム領域をもとにして、診断アルゴリズムが構築できるかを検討した。

個々の ASD 患者が共通のコピー数異常領域があるかを検討したが、被験者数の絶対数が少なかったこと、患者において特徴的なコピー数異常ゲノム領域が少なかったこともあり十分な検出力は得られなかった。また、健常者と共通のコピー数異常ゲノム領域を保持している ASD 患者も多いため、ASD 患者におけるコピー数異常ゲノム領域の共通性あるいはそれらの組み合わせを利用した ASD 診断は有効ではないことが明らかになった。オッズ比の高いコピー数異常領域が検出されたことは、日本人 ASD 患者にとって、発症の決定的要因になりうる可能性が示された。

#### 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 10 件)

Takahashi M, Wang G, Adachi M, Jiang F, Jiang Y, Saito M, Nakamura K, Differences in sleep problems between Japanese and Chinese preschoolers: a cross-cultural comparison within the Asian region. *Sleep Med.* 査読有、2018 Jan 4;48:42-48. doi: 10.1016/j.sleep.2017.11.1145. [Epub ahead of print]

Takata A, Miyake N, Tsurusaki Y, Fukai R, Miyatake S, Koshimizu E, Kushima I, Okada T, Morikawa M, Uno Y, Ishizuka K, Nakamura K, Tsujii M, Yoshikawa T, Toyota T, Okamoto N, Hiraki Y, Hashimoto R, Yasuda Y, Saitoh S, Ohashi K, Sakai Y, Ohga S, Hara T, Kato M, Nakamura K, Ito

A, Seiwa C, Shirahata E, Osaka H, Matsumoto A, Takeshita S, Tohyama J, Saikusa T, Matsuishi T, Nakamura T, Tsuboi T, Kato T, Suzuki T, Saito H, Nakashima M, Mizuguchi T, Tanaka F, Mori N, Ozaki N, Matsumoto N. Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. *Cell Rep.* 査読有、2018 Jan 16;22(3):734-747. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.074.

Takahashi M, Adachi M, Takayanagi N, Yasuda S, Tanaka M, Osato-Kaneda A, Masuda T, Nakai A, Saito M, Kuribayashi M, Nakamura K. Coordination difficulties in preschool-aged children are associated with maternal parenting stress: A community-based cross-sectional study. *Res Dev Disabil.* 査読有、2017 Nov;70:11-21. doi:10.1016/j.ridd.2017.08.002.

Nikaido Y, Furukawa T, Shimoyama S, Yamada J, Migita K, Koga K, Kushikata T, Hirota K, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S. Propofol Anesthesia Is Reduced in Phospholipase C-Related Inactive Protein Type-1 Knockout Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 査読有、2017 Jun;361(3):367-374. doi: 10.1124/jpet.116.239145.

Takahashi M, Adachi M, Yasuda S, Osato-Kaneda A, Saito M, Kuribayashi M, Nakamura K. Prevalence of sleep problems in Japanese preschoolers in a medium-sized city: Community-based survey using the Children's Sleep Habits Questionnaire. *Pediatr Int.* 査読有、2017 Jun;59(6):747-750. doi: 10.1111/ped.13281.

Morimura N, Yasuda H, Yamaguchi K, Katayama KI, Hatayama M, Tomioka NH, Odagawa M, Kamiya A, Iwayama Y, Maekawa M, Nakamura K, Matsuzaki H, Tsujii M, Yamada K, Yoshikawa T, Aruga J. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrln2/SALM1-deficient mice. *Nat Commun.* 査読有、2017 Jun 12;8:15800. doi: 10.1038/ncomms15800.

Kasahara T, Ishiwata M, Kakiuchi C, Fuke S, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Minabe Y, Nakamura K, Iwata Y, Fujii K, Kanba S, Ujike H, Kusumi I, Kataoka M, Matoba N, Takata A, Iwamoto K, Yoshikawa T, Kato T. Enrichment of deleterious variants of mitochondrial DNA polymerase gene (POLG1) in bipolar disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 査読有、2017 Aug;71(8):518-529. doi: 10.1111/pcn.12496.

Furukawa T, Shimoyama S, Miki Y, Nikaido Y, Koga K, Nakamura K, Wakabayashi K, Ueno S. Chronic diazepam administration increases the

expression of Lcn2 in the CNS. *Pharmacology Research & Perspectives*, 査読有、2017;5(1):e00283, doi:10.1002/prp2.283

Takayanagi N, Yoshida S, Yasuda S, Adachi M, Kaneda-Osato A, Tanaka M, Masuda T, Kuribayashi M, Saito M, Nakamura K. Psychometric properties of the Japanese ADHD-RS in preschool children. *Res Dev Disabil*. 査読有、2016 Aug;55:268-78. doi: 10.1016/j.ridd.2016.05.002.

Shimamoto C, Ohnishi T, Maekawa M, Watanabe A, Ohba H, Arai R, Iwayama Y, Hisano Y, Toyota T, Toyoshima M, Suzuki K, Shirayama Y, Nakamura K, Mori N, Owada Y, Kobayashi T, Yoshikawa T. Functional characterization of FABP3, 5 and 7 gene variants identified in schizophrenia and autism spectrum disorder and mouse behavioral studies. *Hum Mol Genet*. 査読有、2015 Apr 15;24(8):2409. doi: 10.1093/hmg/ddv011.

〔学会発表〕(計 10 件)

Gaze Abnormality Can Distinguish Between Autism Spectrum Disorder and Typically Developing Children through Screening in 5-Year-Old Children By a Double Study in a Japanese Community Based Population. Saito M, Adachi M, Yoshida S, Yasuda S, Kuribayashi M, Sakamoto Y, Nakamura K and Takayanagi N, INTERNATIONAL MEETING FOR AUTISM RESEARCH(IMFAR) 2017.5.10-13

Prevalence and Comorbidities of Autism Spectrum Disorder and Study of the Method of the Developmental Health Checkup in a Japanese Community-Based Population Sample of Five-Year-Old Children. Sakamoto Y, Saito M, Yoshida S, Adachi M, Takayanagi N, Yasuda S, Kuribayashi M, and Nakamura K. INTERNATIONAL MEETING FOR AUTISM RESEARCH(IMFAR) 2017.5.10-13

Epidemiology of Developmental Coordination Disorder, Prevalence and Comorbidities Using DSM-5, and Diagnostic predictability by Developmental Coordination Disorder Questionnaire (DCDQ) at Preschool Age in a Japanese Community. Saito M, Osato-Kaneda A, Tanaka M, Masuda T, Yoshida S, Sakamoto Y, Yoshida K, Matsubara Y, Takayanagi N, Adachi M, Takahashi M, Yasuda S, Kuribayashi M, Nakai A, Nakamura K. The 9th Congress of The Asian Society for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions (ASCAPAP) 2017.8.24-26

The effect of chronic diazepam administration induced upregulation of

Lcn2 expression on cognitive function. Ogata Y, Furukawa T, Nikaido Y, Shimoyama S, Nakamura K, and Ueno S. 第 44 回日本脳科学会 2017.10.14-15

AP-1 complex induces mouse Tspo gene expression by lipopolysaccharide in microglial cell line, BV-2. Shimoyama S, Furukawa T, Ogata Y, Ueno S, Nakamura K. 第 44 回日本脳科学会 2017.10.14-15

The effect of chronic diazepam administration on hippocampal long-term potentiation and spine morphology. Furukawa T, Nikaido Y, Shimoyama S, Ogata Y, Nakamura K, Ueno S. 第 95 回日本生理学会大会 2018.3.28-30

Brain Dopamine D1 Receptor Binding in Young Adults with Autism Spectrum Disorder. Suzuki K, Nakamura K, Ouchi Y, Takebayashi K, Yokokura M, Nakaizumi K, Tsujii M, Sugiyama T and Mori N. 2016 International Meeting for Autism Research (IMFAR) 2016.5.11-14

CNV Analysis and Exome Sequencing in Japanese Autism Spectrum Disorder Subjects. Nakamura K, Thanseem I, Tsujii M and Matsumoto N. International Meeting for Autism Research (IMFAR) 2016.5.11-14

Prevalence of Autism Spectrum Disorder in a Japanese Community-Based Population Sample of Five-Year-Old Children Saito M, Takayanagi N, Adachi M, Osato A, Yasuda S, Masuda T, Tanaka M, Yoshida S, Kuribayashi M and Nakamura K. International Meeting for Autism Research (IMFAR)2016.5.11-14

Gaze Fixation Patterns in Children With Autism Spectrum Disorder and Typical Development Screening From the Japanese Community Based 5-Year-Old Children. Nakamura K, Saito M. The 55th American College of Neuropsychopharmacology (ACNP) 2016.12.4-8

〔図書〕(計 1 件)

中村和彦編著 金子書房 大人の ADHD 臨床 - アセスメントから治療まで -、2016, 196

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 和彦 (NAKAMURA, Kazuhiko)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：80263911

(2)研究分担者

上野 伸哉 (UENO, Shinya)  
弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00312158

斉藤 まなぶ (SAITO, Manabu)  
弘前大学医学部附属病院・講師  
研究者番号：40568846

古川 智範 (FURUKAWA, Tomonori)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60402369

下山 修司 (SHIMOYAMA, Shuji)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60736370