

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007 年度～2009 年度

課題番号：19790739

研究課題名（和文） 自閉性障害の病態に関与する遺伝子不活化異常の解析

研究課題名（英文）

Expression, inactivation and mutation analysis of the candidate genes for Autism

研究代表者 中島 尚美 (NAKASHIMA NAOMI)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20337330

研究成果の概要（和文）：

自閉性障害の病因、病態解明を目的として、自閉性障害（ASD）患者において、*DLX5*、*DLX6*、*BDNF*、*SGK1*、*FXYD1*、*IGF2*、*IGFBP3* の変異と発現変化の有無を解析した。

*DLX6* において、ASD 患者 2 名で遺伝子変異を検出した。遺伝子発現解析では、*DLX5* では一部の患者で遺伝子発現量が増加しており、また *SGK1* においては、正常対照群よりも有意にその発現量が増加していた。

*DLX5*、*DLX6*、*SGK1* は ASD との関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the pathogenesis of autistic spectrum disorder (ASD), we analyzed the expression level and mutation of *DLX5*, *DLX6*, *BDNF*, *SGK1*, *FXYD1*, *IGF2* and *IGFBP3*.

In *DLX6*, we detected a base change in 2 ASD patients. The expression level of *DLX5* was not different between ASD and controls but was higher in four ASD patients compared to controls. In *SGK1*, the expression level of the ASD group was higher than the control group significantly.

*DLX5*, *DLX6* and *SGK1* is considered to relate with autism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

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：自閉性障害、エピジェネティクス機構、遺伝的刷り込み現象、遺伝子不活化、MECP2

### 1. 研究開始当初の背景

自閉性障害 (ASD) とは、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、世界的に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されている。連鎖解析では、7q、2q、15qなどを中心に、多くの染色体部位で連鎖が報告されており、ごく少数にNeurologinなどの遺伝子変異が報告されているが、ほとんどの患者での病因は不明である。病因となる遺伝子が多数あることと、いくつかの遺伝的因子と環境因子の相互作用により発症する多因子遺伝であることも考えられている。しかし、またエピジェネティクス機構がASDの発症に大きく関与していることも考えられる。エピジェネティクス機構とは、遺伝的刷り込み現象や遺伝子不活化など、遺伝子変化を伴わずに遺伝子の発現を調節するなどの遺伝子機能のことであり、様々な生命現象に関与していることが明らかにされつつある。ASDとエピジェネティクス機構との関連性が示唆される根拠として、(1) 自閉症状を伴うRett症候群の病因遺伝子は、メチル化部位結合蛋白遺伝子の一つであるMECP2であり、その機能低下により、種々の遺伝子の発現レベルが変化して神経症状を発症している。(2) Angelmann症候群やPrader-Willi症候群では遺伝子不活化の異常が明らかにされており、それらの病因遺伝子が局在する15q領域とASDの連鎖が報告されている。さらに、その部位の母由来の染色体過剰によるテトラソミーで自閉症状を示している。(3) また、我々の研究において、MECP2により発現調節さ

れている遺伝子の一つであるDLX5が、ASD患者リンパ球で発現が変化している結果を得ており、ASD発症機序に、遺伝子不活化の異常が関与している可能性が示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、ASDの発症と、エピジェネティクス機構の異常の関連性の解析により、ASDの病因、病態を解明することを目的とする。

MECP2により発現が調節されている遺伝子および、その他の領域の遺伝的刷り込み現象を受けている遺伝子は、ASDの候補遺伝子と考えられる。それらの遺伝子の発現レベルを解析することにより、ASDで不活化の異常が起きていないかどうかを検出するとともに、それらの遺伝子自体に変異がないかどうか、ASD患者リンパ芽球を用いて解析する。

対象遺伝子は、MECP2により発現調節されている遺伝子で、中でも神経発生と機能に関する遺伝子の発現および変異を解析する。

### 3. 研究の方法

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、FXR1、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。

#### (1) 遺伝子不活化の異常の解明

各対象遺伝子について、正常対照あるいは Rett 症候群と比較した mRNA の発現量を解析し、ASD での不活化の異常の有無を判定した。また、各遺伝子について、発現量が増加している患者をプロファイリングし、臨床症候等から、特定の特徴による分類可能かどうか検討した。

#### (2) 遺伝子変異の解析

対象遺伝子に関し、プロモーター領域も含め、塩基置換、欠失や重複がないか解析した。

#### 4. 研究成果

ASD 患者の *DLX5* の平均発現レベルは、正常対照群と有意差はなく、*DLX5* が自閉症に関連しているという結果は得られなかった。しかし、ASD 患者 4 名では、正常対照よりも高い発現レベルにあった。これらの結果には、培養リンパ球を用いたためのバラつきである可能性は否定できないが、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* のシグナル伝達系の下流に異常があり、*DLX5* の発現が増加している可能性も考えられる。

*DLX5* の発現が高い患者の臨床症状は、いずれも社会性の障害がみられた以外の点では多様であり、*DLX5* が特定の症状を反映している可能性は低い。ASD の発症には、多くの遺伝的および環境的要因の関与が考えられ、*DLX5* の機能に関連する因子もその一つである可能性が推測される。

*DLX6* の変異解析の結果、中等度の知的障害と典型的自閉症の男児同胞例で、遺伝子変異を検出した。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であることなどから、ASD の発症に関連する変異の可能性が示唆された。

これまでは、*DLX5* および *DLX6* で ASD の病因と考えられる変異は報告されていない

が、中等度の知的障害を有する ASD 患者の一部において、*DLX6* の遺伝子変異が ASD の発症と関与している可能性を検討するため、この変異により *DLX6* の発現が増加しているかどうかを確認する目的で、この変異を持つ 2 名の ASD 患者の *DLX6* 発現の変化を解析した。1 名のリンパ芽球における *DLX6* の発現レベルは正常対照群より高値であったが、もう 1 名は対照と同様の発現レベルを示しており、変異により遺伝子発現が増加している可能性は確認できなかった。リンパ球において、*DLX6* の発現レベルは低値なので、この変異による発現の変化を検出するのは困難と考えられる。

さらに、*MECP2* により調節されていると考えられる *BDNF*、*SGK1*、*FXYD1*、*IGF2*、*IGFBP3* について、遺伝子変異と発現の変化を解析した。*SGK1* では、ASD 患者群の平均遺伝子発現レベルは、正常対照群と比較し、統計的に有意ではあったが、明らかに高値を示したのは 4 名であり、他の 6 名は対照とほぼ同等の発現レベルであった。これらの患者で、*SGK1* 変異は検出されておらず、発現量の変化は、遺伝子変異によるものではなく、*SGK1* の発現を調節する何らかの機序が存在する可能性が考えられた。*SGK1* は、glucocorticoid により発現誘導される蛋白で、海馬細胞や扁桃体での発現も確認され、カリウムチャネルを調節するという報告があるが、神経細胞における機能は不明である。今後、*SGK1* の神経での作用と ASD の関連の解析が必要である。

他の遺伝子に関しては、ASD と正常対照者間で有意な発現変化はなく、ASD との関連を示唆する所見はなかった。

以上のことから、ASD 患者で遺伝子変異を検出した *DLX6* においては、ASD の病因としての *DLX6* の関与について、症例の蓄積を含め、さらに解析を進める必要がある。また、*DLX5*、

SGK1では、ASDの病因と考えられる遺伝子変異は検出されなかったが、遺伝子発現解析では、DLX5、SGK1の一部の患者で遺伝子発現レベルが増加していたことから、これらにおいては、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と関連する分子機構である可能性も推察され、さらに解析が必要である。

#### 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1件)

- ① Naomi Nakashima, Takanori Yamagata, Mariko Y. Momoi, 他3名(3番目～5番目). Expression analysis and mutation detection of *DLX5* and *DLX6* in Autism. *Brain & Development* 2010;32:98-104. 査読有り

[学会発表] (計2件)

- ① Naomi Nakashima : Gene relating to synaptogenesis located on 7q31 as Candidate gene for Autism. 第58回アメリカ人類遺伝学会, 2008年11月12日, 米国(フィラデルフィア)
- ② Naomi Nakashima : Genes regulated by MECP2 as candidate genes for autism. 第57回アメリカ人類遺伝学会, 2007年10月26日, 米国(サンディエゴ)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中島 尚美 (NAKASHIMA NAOMI)  
自治医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 20337330

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし