

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月23日現在

機関番号：18001
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590362
 研究課題名（和文） 自閉症スペクトラム感受性全遺伝子のハイスループット解析法の確立と臨床応用
 研究課題名（英文） High-throughput screening system for genes associated with autism spectrum disorder
 研究代表者
 柳 久美子（YANAGI KUMIKO）
 琉球大学・大学院医学研究科・助教
 研究者番号：90294701

研究成果の概要（和文）：自閉症スペクトラム感受性遺伝子の遺伝子変異（疾患特異的な変異）/多型（疾患非特異的な変異）の有無を迅速かつ安価、正確に検出する解析系を確立した。PCR-高精度融解曲線解（PCR-HRM）分析法を改善し、自閉症感受性遺伝子 *AUTSX1*、*AUTSX2*、*AUTS1*、*AUTS9* の至適解析条件を決定し、320 以上の検体での検索を行い、日本人患者特有の新規の遺伝子変異を多数同定した（コード領域の1塩基置換を13個、そのうちアミノ酸の変化を伴う変異は6個）。

研究成果の概要（英文）：We constructed a high-throughput screening system using PCR-high resolution melting (PCR-HRM) analysis which easily allow us to detect mutations or variations of genes associated with autism spectrum disorder (ASD). We searched the optimal condition for all exons of *AUTSX1*, *AUTSX2* and *AUTS9*, and scanned the entire coding regions of the genes in genomic DNA obtained from 62 ASD patients, 200 healthy controls and 60 EBV transformed B cells. Nineteen novel mutations were identified in Japanese ASD patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学、PCR-高精度融解曲線分析法、遺伝子診断、自閉症スペクトラム

1. 研究開始当初の背景

(1) 社会的背景

自閉症スペクトラムとは自閉症やアスペルガー症候群、ADHD（注意欠陥多動性障害）などの疾患に共通に認められる思考や想像力、コミュニケーションの領域における障害をいう。それぞれの疾患には明らかな境界が

なく、また合併する障害を予測することも困難である。潜在的患者数は少なくなく（児童人口の5%程度ないしはそれ以上）社会的に関心が高いこと、発達期における治療・療育によって患者のQOLが大きく左右されることなどから、本質的な病因解明が急務である。

(2) 学術的背景

自閉症スペクトラムを伴う患者は、家系内での発症が多く認められることから病因に遺伝的背景が強く示唆されており、これまで自閉症スペクトラムに感受性のある複数の染色体領域および遺伝子が報告されてきた。しかしながら、これらの報告は各々の研究者がそれぞれ個別的、散発的に解析しているものがほとんどである。つまり研究対象となった遺伝子に変異/多型が見いだせなかった場合、それ以外の遺伝子について検討されることはあまりない。従って、多数の感受性遺伝子が報告されているにもかかわらず、臨床症状および感受性遺伝子変異相互の関連については不明な点が多く、遺伝子情報としては不十分といわざるをえない。

(3) 研究代表者らのこれまでの取り組み

研究代表者も、これまで自閉症スペクトラムを伴う奇形疾患の原因遺伝子について、多数の患者で遺伝子解析を行ってきたが、病因・病態解明のためには多くの検体で感受性遺伝子を網羅的に解析することが急務である、との結論に至った。遺伝子解析を網羅的に行う上で克服しなければならない大きな問題は解析にかかる費用と時間である。そこで、これまでにハイスループットで安価、簡便かつ正確な遺伝子診断をめざした PCR-高精度融解曲線分析法 (PCR-HRM 分析法) の改善に取り組んできた。PCR-高精度融解曲線分析法 (PCR-HRM 分析法) とは PCR の後、2 本鎖 DNA の融解パターンを詳細に解析することで遺伝子変異の有無を検出する方法である。これまでは PCR-HRM 分析法に適した PCR 産物の長さは 200bp 前後と報告されてきたが、私達は Taq ポリメラーゼおよび 2 本鎖 DNA にインターカレートする蛍光色素等の解析条件を詳細に検討することにより、比較的長いエクソンをカバーする長さの PCR 産物 (400~600bp) でも、再現性、精度に優れた安価な融解曲線分析に成功している。本解析には 96-well plate または 384-well plate を用いる。また、1 解析に要する時間は約 2 時間と迅速かつハイスループットな解析が期待される。操作は簡便で通常の遺伝子増幅操作で十分であり、解析条件を決めれば施設相互間で同質の遺伝子情報を共有することが可能となり、臨床応用の面においても発展性が見込まれると考え本研究を申請するに至った。

2. 研究の目的

(1) これまで取り組んできた、再現性に優れた、迅速で安価な遺伝子変異解析法を応用し、自閉症スペクトラム感受性遺伝子について、網羅的に遺伝子変異を検出するハイスループットな解析系の確立をめざす。

(2) 遺伝子情報と臨床症状を詳細に比較・検討することにより、自閉症スペクトラムの病態に関する遺伝子変異を明らかにする。同時に、遺伝子変異が細胞機能発現に及ぼす影響を細胞生物学的に解析し病態の一端を解明する。

(3) 研究成果を公開し、多くの施設でも簡便な解析を可能にすることで、臨床応用可能な遺伝子変異/多型スクリーニングシステムの構築に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 解析遺伝子の選択

これまでに報告されている自閉症スペクトラム感受性遺伝子は多数あるが、予測される自閉症スペクトラム発症の関与の程度は報告によりまちまちである。これらの遺伝子について、自閉症スペクトラム患者での遺伝子変異報告の有無、相関研究の結果、モデルマウスでの症状の有無、タンパク機能という観点から文献を見直し、優先して解析する遺伝子を選択する。

(2) PCR-高精度融解曲線 (PCR-HRM) 分析法の条件設定

PCR-HRM 分析法とは PCR の後、PCR 産物を再アニーリング、引き続いて正確に温度を一定速度で上昇させることで DNA の融解パターンを詳細に分析する方法である (図 1)。反応系に至適濃度で予め添加された DNA インターカレート蛍光色素は、2 本鎖 DNA の融解が進行するに従って、蛍光強度を消失する。遺伝子変異の有無はこの融解パターンの違いとして表される (図 2)。

図 1

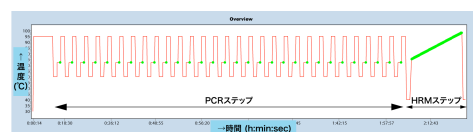
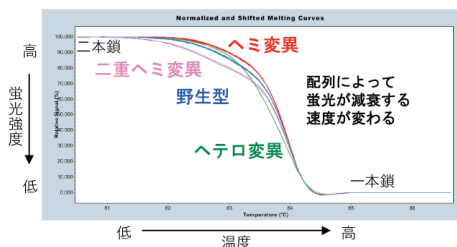


図 2



選択した自閉症スペクトラム関連遺伝子のすべてのエクソンを解析するためのプラ

イマーをエクソン-イントロン境界領域に設定し、各エクソンに対してPCR-HRM分析法の最適条件を検討する。解析途中で新たな遺伝子が報告された場合には必要に応じて解析を加える。なお、解析プラットフォームには96-well plate または 384-well plate での解析が可能な LightCycler 480 System (Roche)を用いる。

(3) 自閉症スペクトラム患者検体の PCR-HRM 分析

研究代表者は同意が得られた自閉症スペクトラム患者 genomic DNA をすでに 62 検体保管している。至適化した PCR-HRM 分析条件のもと、自閉症スペクトラム患者 62 検体で、自閉症スペクトラム関連遺伝子全エクソンにおける遺伝子変異/多型スクリーニングを行う。PCR-HRM 分析法にて遺伝子変異/多型が有ると判定された検体についてはシーケンス解析まで行い塩基配列を決定する。

PCR-HRM 分析法とシーケンス解析の結果から、至適化した PCR-HRM 分析法の検出効率、正確性、再現性について検討する。

(4) 検出された遺伝子変異についてのスクリーニング

自閉症スペクトラム患者検体で、同定された変異/多型の塩基配列が、SNP データベースに報告されているかどうか検索する。すでに登録されている多型については、この時点で解析から除外する。なお、研究代表者はダイレクトシーケンスが PCR-HRM 分析から連続的に行えることを確認している。

データベースに報告されていない遺伝子変異は、研究代表者らが保有している健常者検体（同意が得られた健常者検体 200 検体、EBV トランスフォーム B 細胞株 60 株以上保管している）を用いてスクリーニングを行い、疾患特異的な遺伝子変異なのか、疾患非特異的な遺伝子変異（多型）なのかを確認する。スクリーニングのために新たな条件を設定する必要は無く、ASD 患者検体の解析に用いた PCR-HRM 分析条件をそのまま使用することが可能なため、時間・コストの無駄を省く事ができる。

4. 研究成果

(1) 解析遺伝子の選択

方法に記載した手順を踏まえて、解析対象遺伝子として、*AUTSX1* (*NLGN3*)、*AUTSX2* (*NLGN4X*)、*AUTS1* (*RELN*)、*AUTS9* (*MET*)を選択した。

(2) PCR-HRM 分析法の解析条件の至適化

AUTSX1 (*NLGN3*)、*AUTSX2* (*NLGN4X*)、*AUTS1* (*RELN*)、*AUTS9* (*MET*)について、すべてのエ

クソンを含む領域についてプライマーを設定した（表 1）。次いで、PCR-HRM 分析法による解析条件の至適化を行った。同時にサンガー法によるシーケンス解析を行い、至適条件下における PCR-HRM 分析法の整合性を確認した。

表 1

遺伝子	エクソン数	プライマーセットの数	PCR産物の平均長 (bp)
<i>AUTSX1</i>	7	11	382
<i>AUTSX2</i>	5	9	412
<i>AUTS1</i>	20	23	349
<i>AUTS9</i>	65	67	349

(3) 自閉症スペクトラム患者での遺伝子変異/多型スクリーニング

至適化した PCR-HRM 分析条件のもと、自閉症スペクトラム患者 62 検体で、*AUTSX1*、*AUTSX2*、*AUTS1*、*AUTS9* 全エクソンにおける遺伝子変異/多型スクリーニングを行った。遺伝子変異/多型本解析が有ると判定された検体についてはシーケンス解析まで行い、塩基配列を決定した。表 2 は設定したプライマーセットの領域内において SNP データベースに登録されている塩基置換（遺伝子変異/多型）の数と、PCR-HRM 分析法によって検出された数をまとめたものである。既知のみならず、新たな遺伝子変異/多型についても検出することができた。PCR-HRM 分析法は再現性に優れ、効率よく遺伝子変異を検出することが確認された。

表 2

遺伝子	プライマーセット領域内の塩基置換		新たに検出された塩基置換の数
	登録数	検出数	
<i>AUTSX1</i>	17	5	5
<i>AUTSX2</i>	38	7	3
<i>AUTS1</i>	235	13	5
<i>AUTS9</i>	321	48	17

(4) 検出された遺伝子変異についてのスクリーニング

ASD 患者で検出された塩基置換のうち、SNP データベース登録されていないものに関して、200 検体の健常者血液より抽出した genomic DNA でスクリーニングを行った（*AUTSX1* および *AUTSX2* については 60 検体の健常者 B 細胞株から得られた genomic DNA での解析を加えた）。10 個の ASD 疾患特異的な変異がエクソン内に同定され、このうち 6 個はアミノ酸の変化を伴うミスセンス変異であることが判明している（表 3）。また、これらの変異は蛋白質の機能ドメイン内にあり、細胞機能に影響を与えることが予測された。

表 3

遺伝子	エクソン内の塩基置換	ASD患者特有の変異 (エクソン内)	アミノ酸の変化を伴う変異
AUTSX1	1	1	0
AUTSX2	3	3	0
AUTS1	8	1	1
AUTS9	23	5	5

(5) 国内外における位置づけ

ASD 発症に関与するとされる遺伝子の数は多く、一人の患者に対して全遺伝子を調べるのは時間的にも費用的にも限界があるため、臨床的に遺伝子診断は浸透していない。本研究結果によりPCR-HRM 分析法を応用した遺伝子診断は、迅速性、再現性、操作の簡便性に加え、比較的安価であるという利点を持ち合わせており、ASD 発症早期における臨床診断に貢献すると考えられる。

(6) 今後の展望

①病態解明へのアプローチ

患者に特異的に認められた変異はタンパク質の機能ドメインに存在し、細胞機能発現への影響が予想される。細胞生物学的な検討を加えることにより、多彩多岐にわたるASD病態の一端が解明されると考えられる。

②人種間のSNP 特性解析へのアプローチ

近年、SNP と習慣病などの多因子疾患との関連が明らかにされつつある。しかしながら、現在汎用されているSNP データベースは欧米人をもとにしており、表2 から分かるように、日本人でのSNP と比較すると偏りがあることが分かる。本分析法はSNP 頻度の検出に応用することで、日本人SNP データベースを充実することに貢献したい。

③次世代シーケンサーとの関連

2012 年の時点で、より網羅的で迅速な遺伝子解析法として、次世代シーケンサーが比較的手軽に用いられてくるようになってきた。しかしながら、次世代シーケンサーから得られる膨大な量のデータは、最終的には従来のサンガー法による確認が必須であり、律速段階になっている。本研究で示されたように、PCR-HRM 分析法は遺伝子変異の有無を迅速かつ安価、正確に検出することが可能である。次世代シーケンサーとサンガー法による解析の間にPCR-HRM 分析法を介在させることによって、サンガー法に供すべき検体を選別することができ、より迅速な遺伝子変異解析に寄与する。

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 2 件)

- ① K Yanagi, T Kaname, K Wakui, O Hashimoto, Y Fukushima, K Naritomi, Identification of four novel synonymous substitutions in the X-linked genes neuroligin 3 and neuroligin 4X in Japanese patients with autistic spectrum disorder, *Autism Research and Treatment*, Vol. 2012, <http://www.hindawi.com/journals/aut/>、査読有、2012 年

〔学会発表〕 (計 12 件)

- ① K Yanagi, Mutation screening test of *Faciogenital dysplasia 1* gene in Japanese patients with Aarskog-Scott syndrome, 第34回日本分子生物学会、2011年12月13-16日、パシフィコ横浜(神奈川)
- ② 柳 久美子, Aarskog-Scott症候群患者におけるFGD1 遺伝子変異(続報)、日本人類遺伝学会第56回大会、2011年11月10-12日、幕張メッセ(千葉)
- ③ 要 匡, pitz三角頭蓋症候群原因遺伝子CD96 のPCR-HRM 法による変異スクランニングシステム、第51回日本先天異常学会学術集会、2011年7月22-24日、シェーンパッハ・サボー(東京)
- ④ 要 匡, 微量検体からの迅速・安価な遺伝子変異スクランニングシステムの構築、出生前診断研究会、2010年11月17日、沖縄小児保健センター(沖縄)
- ⑤ K Yanagi, The development of high-throughput gene scanning system for autism spectrum disorders by a PCR coupled high-resolution melting curve analysis, American Society of Human Genetics (ASHG) 60th Annual Meeting, 2 to 6 November 2010, Washington, DC, United States
- ⑥ 成富 研二, Opitz三角頭蓋症候群診断のためのCD96 遺伝子スクランニングシステムの構築、日本人類遺伝学会第55回大会、2010年10月28~30日、大宮ソニックシティ(埼玉)
- ⑦ 柳 久美子, 高精度融解曲線法を用いた自閉症スペクトラム感受性遺伝子のスクランニング、日本人類遺伝学会第55回大会、2010年10月28~30日、大宮ソニックシティ(埼玉)
- ⑧ 要 匡, PCR-高解像度融解曲線分析法による自閉症関連遺伝子多型スクランニングシステムの構築と解析、第17回日本遺伝子診療学会、2010年8月5日~7日、三重県医師会館

- ⑨ T Tanaka、High-throughput variation scanning system of responsible genes for X-linked autistic disorder spectrum, *NLGN3* and *NLGN4*, by a PCR coupled high-resolution melting curve analysis, *59th the American Society of Human Genetics, Annual meeting*, 20-24 October 2009, Hawaii, USA
- ⑩ 柳 久美子、自閉症スペクトラム感受性遺伝子、*NLGN3* および *NLGN4* のハイスループット解析法の確立、日本人類遺伝学会第 54 回大会、2009 年 9 月 24~26 日、品川プリンスホテル (東京)
- ⑪ 要 匡、PCR-高解像度融解曲線分析法による遺伝子スキャニングシステムの構築、第 16 回日本遺伝子診療学会、2009 年 7 月 31 日-8 月 1 日、札幌
- ⑫ T Kaname、A PCR coupled high-resolution melting analysis for reliable gene scanning of the faciogenital dysplasia gene, *FGDI*, *European Human Genetics Conference 2009*, Vienna, Austria May 23-26 2009

[図書] (計 1 件)

- ① T Kaname, K Yanagi, H Maehara, Springer, *Osteosarcoma and midkine*.
'Midkine: From embryogenesis to pathogenesis and medication', 2012 年、印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://web.me.com/knaritomi/> 琉球大学遺伝医学/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 久美子 (YANAGI KUMIKO)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：90294701

(2) 研究分担者

要 匡 (KANAME TADASHI)
琉球大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40264288

成富 研二 (NARITOMI KENJI)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20101446

(3) 連携研究者

()

研究者番号：