

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号： 13802
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011 ～ 2012
 課題番号： 23791323
 研究課題名（和文） ゲノムワイド関連解析およびコピー数多型解析による日本人自閉症者
 遺伝子解析
 研究課題名（英文） Genome-wide association and copy number variation analyses in
 Japanese individuals with autism.
 研究代表者
 イスマール サンシーム (ISMAIL THANSEEM)
 浜松医科大学・医学部・特任研究員
 研究者番号： 60569846

研究成果の概要（和文）： 本研究では、日本人自閉症者とその両親の DNA サンプル（トリオサンプル）を用いて自閉症と関連する新たなコピー数多型（CNVs）を同定し、新規の自閉症感受性遺伝子を見出すことを目的とした。まず、DSM-IV-TR の診断基準に従い ADI-R を用いて診断された日本人自閉症トリオサンプル 250 組を収集した。ゲノム DNA を Affymetrix Genome-Wide Human SNP 6.0 アレイにより解析し、平成 24 年度末までに、150 トリオサンプルの解析を終了した。その結果、12 個の新規 CNV を見いだした。これら 12 個の領域から、これまでに報告のない新規の自閉症感受性遺伝子候補を複数同定した。これらの遺伝子は全て両親にはみられない de novo CNV であった。以上から、孤発例の多い自閉症の病態形成メカニズムに de novo CNV が関与していることが示唆される。

研究成果の概要（英文）： Aim of the current study was first to examine the DNA copy number variations (CNVs) that could be associated with autism in Japanese population. We analyzed samples from subjects with autism and their parents (trio) with Affymetrix Genome Wide SNP 6.0 array. A total of 150 trio samples were analyzed. Only the samples which passed the required quality control (contrast QC >0.4) were used in subsequent analyzes. Averages of 39.37 autosomal CNVs are detected per patient samples, after all the QC corrections. There is no significant difference in the total number/average size of CNVs per sample between patients and their parents. However, the percentage of deletions in the total length of CNVs is 42.5% in case of patients, while it is only 34% and 28.4% in father and mother samples respectively. Above 90% of the CNVs in children are found to be inherited; almost equally from both the parents. Among the CNVs which are spanning genes, 74.5% are deletions in the case of de novo events; it's only 53% in inherited cases. To identify the most important de novo events, the CNVs are further screened based on the mean LRR values of all the probes within a CNV. Finally, 142 highly confident de novo CNVs were identified; among them 124 are spanning exons, and hence supposed to have some functional significance. Among these 124 CNVs, 18 are found be rare de novo events. These 18 rare de novo events were validated with qPCR using SyBr Green. 12 of them were found to be true positive calls while remaining were false calls. A few potential candidate genes with a possible role in neurodevelopment were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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： 臨床精神分子遺伝学、児童・思春期精神医学、自閉症、コピー数多型

1. 研究開始当初の背景

自閉症は「相手の気持ちや考えがわからない」（「こころの理論」の障害）、「電車や化学物質などの無機質に異常な関心を持つ」（強迫症状）等の症状を示す発達障害である。自閉症の一卵性双生児の発症一致率は 60～90%と、あらゆる精神疾患の中で最も高く、遺伝寄与率はほぼ 100% と推計されている。しかし、一つ一つの遺伝子の変異・多型は、広く一般の自閉症者で共通に寄与しているとは考えにくい。個々のゲノム変化を検出するには、コピー数多型（CNVs）の領域内の探索が有用とされる。

本研究開始当初、いくつかの CNVs が自閉症のリスクに関与していることを示す研究結果が複数報告されていたが、いずれも欧米の報告であり、日本人を対象とする調査はなされていなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、日本人自閉症者の DNA サンプルのゲノムワイドな CNV 解析を行い、もって自閉症の病態解明に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血清と日本人トリオサンプルの収集

自閉症当事者とその家族からなる当事者団体、「NPO 法人アスペ・エルデの会」の協力を得て、日本人自閉症トリオ（自閉症当事者とその両親からなる）サンプルを収集した。また、同数の対照群から血清とトリオサンプルを収集した。サンプルを採取した自閉症者の診断は DSM-IV-TR に準じ ADI-R を用いて確定した。

(2) 日本人トリオサンプルのゲノム解析

パーソナルなゲノム変化が検出しやすい CNV 多型の領域内にその遺伝子が座する症例を探索した。特に、両親には存在せず、自閉症者で新規に生じた（de novo）CNV や、de novo でなくとも、複数の症例で共通に見られる CNV は、関連遺伝子を含む可能性が高くなるため、そのような CNV の領域内の自閉症関連候補遺伝子を網羅的に選択した。それらの遺伝子に、自閉症者で有意に出現頻度が高い SNP 等の多型があれば、それらが求める新規自閉症関連遺伝子であるからである。

CNV 解析には、Affymetrix 社 Genome-Wide Human SNP Array 6.0 を用いて、次のように行った。

① 染色体検査：各発症者から末梢血を得て、G バンディング検査を行った。

The Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 array, which features 1.8 million genetic markers, was used.



② チップ解析：Affymetrix 社のキットと自動サンプル処理装置およびデータ解析ソフトウェアを用いて、DNA のビオチン標識、チップ上のプローブへのハイブリダイゼーション、蛍光標識アビジン結合、各プローブが示す蛍光量の測定、および、CNV を示す領域の決定を行った。

4. 研究成果

(1) 血清と日本人トリオサンプルの収集

最終的に、日本人自閉症トリオサンプル 250 組を収集に成功した。このうち、平成 24 年度末までに 150 トリオサンプルの解析を終了した。その結果を以下に示す。

(2) 日本人トリオサンプルのゲノム解析

サンプルのうち、LRR [$\log R \text{ Ratio} (\log_2 \text{ Copy Number} - 1)$] が 0.35 を超えるものは解析から除外した。少なくとも 20 のプローブが含まれる CNV 領域を対象とし、疑陽性を排するよう配慮した。品質管理 (quality control, QC) を経たあとの自閉症者サンプルの常染色体中に検出された CNV 数は自閉症者一人あたり平均 39.37 個であった。CNV の総数や平均サイズにおいて、自閉症者とその両親との間に有意な差は認められなかった。しかし、CNV はコピー数の減少 (deletion、欠失) が増加 (duplication、重複) として現れる。この点に着目し、CNV 全体における欠失の頻度を比較すると、自閉症者では 42 %で、父親 (34 %)、母親 (28.6 %) のいずれよりも高頻度だった (表 1)。

表 1. Percentage of deletions in the total length of CNVs

Father	Mother	Affected Children	
		Inherited	De Novo
		33.6%	69%
33.9%	28.6%	42%	

自閉症者の CNVs の約 90%は両親のいずれかから継代されたもので、残る約 10%が de novo (新規) だった。継代 CNVs については、父由来と母由来との比率は同様であり、両親から継代されている CNV も約 20%見られた (表 2)。

表2. CNVs in Affected Children				
Inherited From			Inherited	De Novo
Father	Mother	Both		
1331	1242	748	3321	437
(35.4%)	(33%)	(19.9%)	(88.4%)	(11.6%)

CNVsのうち、遺伝子領域を含むものに限ると、新規 CNV の 74.5% が欠失であったのに対し、継代された CNV のうち欠失は 53% であった (表 3)。

表3. CNVs in Children Spanning Genes			
	Total	Deletion	Duplication
Inherited	1678	879 (52.4%)	799 (47.6%)
Avg size (kb)	181.2	116.5	253.8
De Novo	231	172 (74.5%)	59 (25.5%)
Avg size (kb)	208.3	193.9	250.3

より重要な新規 CNV の同定を目的に、各 CNV 中の全プローブの LRR 値によって、さらに絞り込みを行った。最終的に、極めて高い確からしさをもつ CNVs が 142 個同定され、そのうち 124 個は遺伝子領域を含んでおり、機能的に有意なものであると考えられた。124 個中、新規かつ稀な CNVs は 18 個だった (表 4)。

表4. De Novo CNVs in Affected Children	
Total After Quality Control	437
After Removing centromere/telomere CNVs	410
Spanning genes	231
Highly Confident (Based on mean LRR_SD)	140
Spanning Exons	124
Rare de novo CNVs	18

これら 18 個の遺伝子領域について SyBr Green による定量的 PCR を行ったところ、18 個中 12 個が真の新規 CNV であることが確認された。この 12 個は ABR, PIPNA, YWHAЕ, TRAPPC9, CSMD3, BRD1, MAPK8IP2, PANX2 などであり、いずれも神経系の発達に関与するものであった (表 5)。

以上の検討から、これまでに報告のないあらたな 8 個の自閉症感受性遺伝子候補が示唆された。今後、解析をすすめ、全 250 トリオサンプルの CNV 解析を終了させたいと考えているが、そのためにはさらなる費用が必要になると見込まれる。

表 5. 新規 CNV 中の機能が明らかになっている遺伝子

遺伝子	機能
ABR	Nerve growth factor receptor signaling pathway
PIPNA	Axon guidance
YWHAЕ	Abnormal neuronal migration, deletion in cognitive impairment. Possible role in schizophrenia.
TRAPPC9	Associated with autosomal-recessive mental retardation. May function in neuronal cells differentiation.
CSMD3	Chromosomal abnormality in CSMD3 region in autism patients reported previously.
AP1S1	Mutation that leads to a premature stop codon was found in four families with a unique syndrome characterized by mental retardation, peripheral neuropathy etc
ALG12	Involvement of genes related to glycobiology was previously reported with autism
ARSA	Metachromatic leucodystrophy (MLD), that displays early, late and adult forms, all with neurological and neuropsychiatric symptoms.
BRD1	Possible role in neurodevelopment. Genetic association with Schizophrenia and BP is reported
FAM19A5	Brain-specific chemokines or neurokines, that act as regulators of immune and nervous cells
MAPK8IP2	Knockout mouse shows motor and cognitive deficits suggesting an autism phenotype
MLC1	Association is reported with Schizophrenia and BP
PANX2	Structural components of synaptic gap junctions. Abundantly expressed in central nervous system (CNS)
PLXNB2	Transmembrane receptors that participate in axon guidance
SHANK3	Well-known autism candidate gene

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Anitha A, Nakamura K, Thanseem I, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Matsuzaki H, Miyachi T, Yamada S, Tsujii M, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Iwata Y, Suzuki K, Ichikawa H, Sugiyama T, Yoshikawa T, Mori N. Brain-region specific altered expression, and association of mitochondria-related genes in autism. *Mol Autism*. 3(1): 12, 2012.
2. Tsuchiya KJ, Tsutsumi H, Matsumoto K, Takei N, Narumiya M, Honda M, Thanseem I, Anitha A, Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata Y, Nakamura K, Mori N; H. B. C. Study Team. Seasonal variations of neuromotor development by 14 months of age: Hamamatsu Birth Cohort for mothers and children (HBC Study). *PLoS One*. 7(12): e52057, 2012.
3. Iwata K, Izumo N, Matsuzaki H, Manabe T, Ishibashi Y, Ichitani Y, Yamada Y, Thanseem I, Anitha A, Vasu MM, Shimmura C, Wakuda T, Kameno Y, Takahashi T, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Mori N. Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats. *Mol Autism*. 3(1): 11, 2012.

4. Anitha A, Thanseem I (equal contribution), Nakamura K, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Iwata Y, Suzuki K, Sugiyama T, Tsujii M, Yoshikawa T, Mori N. Protocadherin α (PCDHA) as a novel susceptibility gene for autism. *J Psychiatry Neurosci.* 37(6):120058, 2012.
5. Thanseem I, Anitha A, Nakamura K, Suda S, Iwata K, Matsuzaki H, Ohtsubo M, Ueki T, Katayama T, Iwata Y, Suzuki K, Minoshima S, Mori N. Elevated transcription factor Sp1 in autism brains alters the expression of autism candidate genes. *Biol Psychiatry.* 71(5): 410-418, 2012.
6. Thanseem I, Nakamura K, Anitha A, Suda S, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Tsujii M, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata K, Sugiyama T, Yoshikawa T, Mori N. Association of transcription factor gene LMX1B with autism. *PLoS ONE.* 6(8): e23738, 2011.
7. Suda S, Iwata K, Shimmura C, Kamenno Y, Anitha A, Thanseem I, Nakamura K, Matsuzaki H, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Iwata Y, Suzuki K, Koizumi K, Higashida H, Takei N, Mori N. Decreased expression of axon-guidance receptors in the anterior cingulate cortex in autism. *Mol Autism* 2 (1): 14, 2011.

[学会発表] (計 2 件)

1. Oral presentation on “Rare de novo copy number variation in Japanese autism subjects” at the 8th Hamamatsu Medical Science symposium held at Hamamatsu, Japan, November, 2012.
2. Poster “De novo copy number variation in Japanese autism subjects” in the 20th World Congress of Psychiatric Genetics held in Hamburg, Germany, October 2012.

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

イスマール サンシーム (ISMAIL THANSEEM)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：60569846