

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791199

研究課題名(和文)全エクソンシーケンスによる自閉症スペクトラム障害多発家系の遺伝研究

研究課題名(英文)Analysis of genetic inheritance in autism spectrum disorders by exome sequencing

研究代表者

桑原 斉 (Kuwabara, Hitoshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50456117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトラム障害多発家系(発端者、双子の弟、父親、長姉、弟が罹患者)において、家系構成員8名のDNAサンプルを対象に全エクソンシーケンスを行った。Agilent Sure SelectによりDNAを濃縮し、Illumina HiSeq2000によるシーケンスに用いた。発端者では、116,607個の変異が見出された。病因となる候補変異をアミノ酸の非同義置換を伴うものに限定し、さらに候補変異をデータベースに掲載されていない多型/変異に限った。これらの変異のうち、非罹患者3名が持つ変異を除き、5名の罹患者全てで見出された変異に限定したところ最終的に7個の変異が残った。

研究成果の概要(英文)：We selected a multiplex family with autism spectrum disorder, for exome analysis. The family includes a proband, monozygotic twin, father, sister and a brother with Autism spectrum disorder. Exome sequencing were performed on all eight family members. Genomic DNA was captured on an Agilent sure select human all exon kit following the manufacturer's protocols. Captured libraries were sequenced on the Illumina HiSeq 2000. There were 116,607 single nucleotide variants (cSNVs) called in the proband with Autism spectrum disorder. After filtering for nonsynonymous substitutions, database SNPs (db137), and the cSNVs which were called in non affected subjects, and limiting the cSNVs which were shown on five ASD family members, seven cSNVs remained.

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：児童思春期精神医学 自閉症スペクトラム障害

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (Autism spectrum disorders; ASD) は、社会的相互交渉の質的な障害、コミュニケーションの質的な障害、興味・行動の限定された様式を3つの行動特徴とする症候群である。疫学研究 (Bailey ら、1995; Folstein ら、1977) から強い遺伝的要因の関与が知られており、その同定が病態解明、ひいては新規治療法の開発にとって不可欠である。

多くの精神疾患同様、ASD の遺伝様式は Common variant common disease (CVCD) 仮説で説明が出来ると考えられていた。1000 サンプル前後の多数例を用いた関連解析では EN2 (Benayed ら、2005、2009)、MET oncogene (Campbell ら、2006; Jackson ら、2009)、CNTNAP2 (Alarcon ら、2008; Ariking ら、2008) が再現性のある結果として報告されていた。また、2000 年代後半から、全ゲノム関連解析 (Genome wide association study; GWAS) 研究が行われている。3つの独立した GWAS 研究で、それぞれ Cadherin 9 と Cadherin 10 (Wang ら、2009)、Semaphorin 5A (Weiss ら、2009)、MACROD2 (Anney ら 2010) が自閉症関連遺伝子として示唆された。しかし、それぞれの GWAS 研究は他の GWAS 研究の結果を再現することは出来ず、また関連解析で候補遺伝子とされた領域も GWAS では再現されることがなく、CVCD 仮説で少なくとも全ての病態を説明するには至っていない。

CVCD 仮説で ASD の病態を説明しきれない理由の一つとして、浸透率は高いが頻度が稀な遺伝的要因が多数存在し、それらが臨床では近縁の表現系を呈していることが想定される (Rare variant common disease 仮説; RVCD 仮説)。稀な変異が ASD の病態に関わる遺伝子として、NLGN4 (Jamin ら、2003)、SHANK3 (Durand ら、2007; Moessner ら 2007)、NRXN1 (Kim ら、2008; Szatmari ら、2007)、SHANK2 (Berkel ら、2010) などの遺伝子が報告されている。また、関連解析で候補遺伝子とされている CNTNAP2 は家系研究でも変異が見出されている (Bakkaloglu ら、2008)。これら一つ一つを同定し、その共通点から病態を探る手法が有効である可能性があり、実際に NLGN4、SHANK3、SHANK2、NRXN1 遺伝子はシナプスにおいて相互に関与するタンパク質をコードしていることがわかってきた。

臨床では、複数の家系構成員が同一疾患に罹患する明らかに濃厚な遺伝負因を有する多発家系がみられることがあるが、そのような家系では、浸透率の高い原因遺伝子が存在する可能性があり、有力なものとして機能的エクソン変異が候補として考えられる。この仮説をもとに、本研究では、ASD 多発家系を対象として、近年急速に進歩してきたゲノムワイドな解析手法、全エクソンシーケンス

を用いることにより原因遺伝子の同定を行い、疾患病態解明の一助としたいと考えた。

2. 研究の目的

過去、数十年間にわたり様々な研究が行われてきたが未だに ASD を単一の原因で説明できた報告はなく、現在では ASD は heterogeneous な疾患であることが想定されている (Happé ら、2006)。従って、多数例対多数例での比較研究では ASD の原因遺伝子の中で稀な遺伝子を見出すことは困難である可能性が高い。O'Roak ら (2011) は、対象サンプルに固有の稀な変異を探索するために、ASD 孤発例及びその健常両親を対象に全エクソンシーケンスを行い、de novo の稀な変異を見出すことに成功している。しかしながら ASD は家族集積性が知られており (Piven ら、1997) de novo 変異を持つ孤発例だけで ASD の全体像を捉えることができるかどうかは疑問が残る。

本研究は、個別の ASD 多発家系において家系内で ASD の原因となり得る共通の変異を網羅的に探索する新たな手法である。多数例対多数例の比較では見出し得なかった稀な原因遺伝子・変異を見いだせる可能性があることが特色である。本研究で見出される遺伝子の変異は稀なものであることが想定されており、その多発家系に固有の変異である可能性もあるが、同様の解析を多くの多発家系で繰り返すことで、それぞれの原因遺伝子・変異が家系に固有であっても、共通の機能的なカスケードを見いだせる可能性があると考えている。また孤発例で得られた知見との異同についても検討が可能になるものと考えられる。

3. 研究の方法

本研究のために、自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder; ASD) 多発家系 (発端者、一卵性双生児の弟、父親、長姉、弟が罹患者、母、次姉、兄が非罹患者) において、健常者も含めた家系構成員 8 名から、末梢血を採取した (表 1)。家系構成員の ASD 診断は、DSM-TR を用いて行った。採取した白血球よりゲノム DNA を抽出し、クオリティーの確認を行った。遺伝形式として優性遺伝を想定し、多発家系構成員全 8 名の DNA サンプルを対象に全エクソンシーケンスを行った。構成員 8 名中 5 名が ASD である多発家系では浸透率の高い遺伝的要因が含まれている可能性が高い。

全エクソンシーケンスに用いる DNA は、アコースティックソルビライザーを用いて断片化し、断片化した DNA の両末端を平滑化・3'-dA 突出末端処理をした後に、アダプターを両末端に連結した。アダプターが連結した DNA を、SPRI 磁性ビーズを用いて精製した。精製した DNA を鋳型として PCR 法による増幅を行い、得られた PCR 産物をゲノムライブラリーとする。作成したゲノムライブラリー

ーを Sure Select Oligo Capture ライブラリーとハイブリダイゼーションさせた。マグネットビーズ(ストレプトアビジン)により capture ライブラリーとハイブリダイゼーションした DNA を濃縮した。濃縮したライブラリー-DNA を PCR 法による増幅を行い、SPRI 磁性ビーズによる精製を行った。精製した DNA 濃縮ライブラリーを、Illumina HiSeq 2000 によるシーケンスに用いた。HiSeq 2000 による解析で鋳型 DNA の両末端 100 塩基の配列を決定した。Hg19 を参照配列として、CLC Genomics Workbench software による解析を行った。得られた 100 塩基の DNA 配列は pair end として mapping した。10 倍以上の coverage で変異解析を行った。

エクソン領域で病因となる多型/変異は、コードするタンパク質の変化を伴うことが想定されるため、病因となる候補変異を挿入/欠失を含む、アミノ酸の非同義置換を伴うものに限定した。さらに、浸透率が高く稀な変異が ASD の病因になっている可能性が高いと考え、候補変異をデータベース SNP(db137)に掲載されていない多型/変異に限った。

表 1 多発家系構成員

	関係	性別	年齢	診断
AZ-3-P-A	発端者	男	7	ASD
AZ-3-P-B	双生児	男	7	ASD
AZ-3-C	姉	女	14	
AZ-3-D	姉	女	11	ASD
AZ-3-E	兄	男	10	
AZ-3-G	弟	男	3	ASD
AZ-3-F	父	男	49	ASD
AZ-3-M	母	女	35	

4. 研究成果(表2)

発端者では、116,607 個の変異が見出された。エクソン領域で病因となる多型/変異は、コードするタンパク質の変化を伴うことが想定されるため、病因となる候補変異をアミノ酸の非同義置換を伴うものに限定した結果、13,187 個の変異が残った。これらの変異のうち、データベース (db137) に掲載されていない多型/変異に限ったところ、626 個の変異が残った。これらの変異から非罹患者 3 名に認められた変異を除いたところ、92 個の変異が残った。

ここまで残った変異に関して、ASD の双生児

弟と共通で持つ変異は、83 個であり、ASD の姉とも共通である変異は、30 個であり、ASD の弟とも共通に持つ変異は、14 個であった。これらの変異のうち父親と共通の変異は、7 個であった。

優性遺伝を想定し、罹患者が全て有し、非罹患者が全て持たないことから、これら 7 個の変異が位置する遺伝子のいずれかが ASD の原因遺伝子である可能性が高いと考えた。今後、見出された遺伝子の機能を検討し ASD の原因遺伝子を同定する必要がある。

表 2 エクソン上で見出された変異の数

	ASD 構成員	変異数
発端者 (AZ3PA)		116,607
非同義置換		13,187
新奇変異		626
非罹患者 3 名 除く		92
	双生児 (AZ3PB) と 共通	83
	姉 (AZ3D) と共通	30
	弟 (AZ3G) と共通	14
	父 (AZ3F) と共通	7

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4件)

桑原 齊, 佐々木 司. 【発達障害】 発達障害の脳科学 自閉症スペクトラム障害の分子遺伝学. 最新医学. 2013;68(9 月増刊):2098-110.

桑原 齊. 【現在の児童精神科臨床における標準的診療指針を目指して】 子どもの自閉症スペクトラム障害(ASD). 児童青年精神医学とその近接領域. 2013;54(2):99-118.

Kuwabara H, Yamasue H, Koike S, Inoue H, Kawakubo Y, Kuroda M, Takano Y, Iwashiro N, Natsubori T, Aoki Y, Kano Y, Kasai K. Altered Metabolites in the Plasma of Autism Spectrum Disorder: A Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectroscopy Study. PloS one. 2013;8(9):e73814. Epub 2013/09/24.

桑原 斉, 江里口陽介, 音羽健司, 佐々木司.
発達障害を知る 自閉症スペクトラム障害
とゲノムとのかかわり. Journal of Clinical
Rehabilitation. 2012;21(12):1210-7.

〔学会発表〕(計2件)

桑原 斉, 川久保友紀, 金生由紀子. 児童から成人へのキャリアオーバーを見据えた精神医学の構築 精神医学の臨床研究における小児期から成人期への連続性と非連続性. 精神神経学雑誌. 2013(2013 特別):S-265.

桑原 斉, 川久保友紀, 金生由紀子. 発達障害キャリアオーバーへの支援 精神医学の臨床研究における発達の側面. 日本児童青年精神医学会総会抄録集 54 回 Page95(2013.10)

6. 研究組織

研究代表者

桑原 斉 (Kuwabara Hitoshi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 50456117

