

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860917

研究課題名(和文) 自閉症多発罹患家系の全エクソン解析に基づくリスク変異の同定

研究課題名(英文) Exploring rare risk variations of autism spectrum disorders: Whole-exome sequencing of a multiplex family and follow-up study in a Japanese population

研究代表者

江川 純 (Egawa, Jun)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：80648527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自閉スペクトラム症(ASD)の稀なリスク変異を同定するため、4人の罹患者を有する多発罹患家系の全エクソン解析および症例・対照サンプル(243対667)を用いたフォローアップ研究を実施した。多発罹患家系の4人(発端者、罹患同胞、非罹患同胞、保因者と推定される母)について全エクソン解析を行ったところ、2つの稀な短縮型変異(RPS24遺伝子Q191X変異とCD300LF遺伝子P261fsX266変異)を同定した。これらの変異は、フォローアップ研究の910サンプルでは検出されなかった。本研究により、2つの稀な短縮型変異がASDの候補リスク変異であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of rare heterozygous truncating variations, we performed whole-exome sequencing (WES) in a multiplex ASD family with four affected individuals (two siblings and two maternal cousins), and a follow-up case-control study in a Japanese population. WES was performed in four individuals (a proband, his affected and unaffected siblings, and their putative carrier mother) from the multiplex ASD family. Rare heterozygous truncating variations prioritized in WES were genotyped in 243 patients and 667 controls. By WES of the multiplex family, we prioritized two rare heterozygous truncating variations, RPS24 Q191X and CD300LF P261fsX266. However, we did not identify these variations in patients or controls in the follow-up study. Our findings suggest that two rare heterozygous truncating variations (RPS24 Q191X and CD300LF P261fsX266) are risk candidates for ASD.

研究分野：児童青年期精神医学

キーワード：自閉スペクトラム症 全エクソン解析 短縮型変異 多発罹患家系

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder: ASD) は、有病率が 2%前後 (Baron-Cohen et al., 2009; Kim et al., 2011) と比較的頻度が高く、幼児期より症状が明らかになる神経発達障害である。その社会的コミュニケーションの困難さより学校などで早期から社会的不適応につながり、虐待・いじめ・ひきこもりなどの多様な社会問題に影響しているため、その病態解明は急務と言える。ASD の遺伝率は 0.4 - 0.8 と報告によって幅があるものの (Hallmayer et al., 2011; Lichtenstein et al., 2010) 精神疾患の中で最も遺伝的関与の高い疾患の一つと言われている。そのため分子遺伝学的アプローチがその病態解明に有力と考えられているが、日本におけるこの分野の研究は立ち遅れていると言わざるを得ない。ASD のようなありふれた疾患の感受性多型は、家系が異なっても共通しており、頻度は高く相対危険度は低いと考えられている。この common disease-common variant (CD-CV) 仮説に基づいて大規模ゲノムワイド関連解析が実施され、いくつかの疾患感受性多型が同定されてきたが (Weiss et al., 2009; Wang et al., 2009) ASD の遺伝要因のごく一部が明らかにされたに過ぎない。一方、コピー数多様性と ASD との関連が報告され (Stefansson et al., 2008) 頻度は比較的稀だが相対危険度の高い変異がありふれた疾患の発症に寄与するという common disease-rare variant (CD-RV) 仮説が注目されるようになった。個々の候補遺伝子のエクソン解析では ASD の発症に大きな効果をもつ稀なリスク変異を網羅的に探索することができないことから、ゲノム中のすべてのエクソンをリシーケンスする全エクソン解析の実施が必要である。最近では高速シーケンサーの実用化に伴い、全エクソン解析が実施されるようになり、ASD の発症に大きな効果をもつ稀なリスク変異の同定が可能となってきた。ASD の発症者と両親からなる Trio サンプルの全エクソン解析では、ナンセンス、フレームシフト変異など遺伝子機能破壊的な新生 (de novo) 変異が発端者で多く認められたが (Sangers et al., 2012; Iossifov et al., 2012) 多発罹患家系における遺伝性稀少変異が発症リスクに果たす役割については数少なく (Toma et al., 2013) 国内での報告は皆無である。

2. 研究の目的

ASD の発症に大きな効果をもつ稀なリスク変異を同定するために、日本人においても全エクソン解析を行う必要があるが、以下の 3 点を考慮した優れた研究

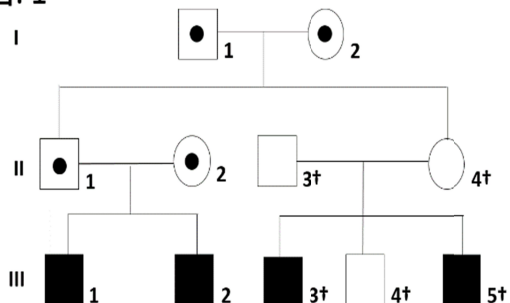
デザインを組むことが重要である。

- A) 複数の罹患者がいる家系には ASD の発症に大きな効果をもつ稀なリスク変異が存在する可能性が高く、このような家系を対象とした全エクソン解析により稀な候補リスク変異を選択する。
- B) 上記 1. で選択された候補リスク変異が存在する遺伝子内の異なる変異も ASD の発症に寄与するアレル異質性の可能性があるため、独立サンプルを用いて当該遺伝子をリシーケンスし、さらなる稀な候補リスク変異を検索する。
- C) 十分な検出力のある症例・対照サンプルの関連解析により、上記 A) や B) で見出された稀な変異が特定の家系のみでなく一般に ASD の発症リスクに大きな効果を有していることを確認する。

3. 研究の方法

ASD 多発罹患家系 (図 1) には 4 人の罹患者がいる。自閉性障害と境界知能をもつ発端者 (-3) 特定不能の広汎性発達障害をもつ同胞 (-5) 特定不能の広汎性発達障害と最重度精神遅滞をもつ母方いとこ (-1) 特定不能の広汎性発達障害、重度精神遅滞、てんかんをもつ母

図 1



枠内黒: 罹患者, 枠内白: 非罹患者, 枠内黒丸: 罹患者状態不明, +: DNA サンプル保有
方いとこ (-2) である。

罹患者の診断は、精神疾患の診断・統計マニュアル第 4 版 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV: DSM-IV) に従って、児童精神科医により患者や家族の非構造化面接などに基づいてなされた。発端者の両親 (-3、-4) は児童精神科医の非構造化面接により非罹患者と確認された。他の家族 (-1、-2、-1、-2) は面接できなかったため罹患者状態を不明とした。フォローアップ研究の対象者は ASD 患者 243 人 (男性 191 人、女性 52 人、平均年齢 18.1 ± 8.6 歳) と対照 667 人 (男性 341 人、女性 326 人、平均年齢 38.3 ± 10.8 歳) からなる。患者群の診断内訳は、自閉性障害 72 人、アスペルガー障害

107人、特定不能の広汎性発達障害 64人である。

多発罹患家系のなかでは、発端者(-3)非罹患同胞(-4)罹患同胞(-5)非罹患両親(-3、-4)のDNAサンプルが得られた。発端者(-3)非罹患同胞(-4)罹患同胞(-5)保因者と推定される母(-4)についてWESを実施した。SureSelect Human All Exon V5 Kit(アジレント社)を用いて全エクソン領域を濃縮し、HiSeq2000(イルミナ社)によりシーケンスを行った。シーケンスリードは、Burrows-Wheeler Aligner(<http://biobwa.sourceforge.net/>)を用いて参照ヒトゲノム(UCSC19)にマッピングされた。PCR産物の重複はPicard(<http://picard.sourceforge.net/>)を用いて取り除かれた。変異はGenome Analysis Toolkit(<http://www.broadinstitute.org/gatk/>)を用いて検出され、Snpeff(<http://snpeff.sourceforge.net/>)により注釈付けされた。

変異を絞り込むため、次のフィルタリング手順を適用した。カバーリード10未満の変異を除外する。発端者(-3)と罹患同胞(-5)が共有する。非罹患同胞(-4)は保有しない。保因者と推定される母(-4)から伝達された可能性のある変異を含める。Snpeffを用いて高影響と予測された変異を含める。

Human Genetic Variation Database(<http://www.genome.med.kyotou.ac.jp/SnpDB/>)またはEnsembl Genome Browser(<http://asia.ensembl.org/index.html>)上の1000人ゲノムプロジェクトの日本人データにおいて変異アレル頻度が0.01未満の変異を選んだ(表1)。

表1.フィルタリング過程

	変異数
検出された変異	201,401
①リード数 ≥ 10	101,832
②罹患同胞が共有	57,629
③非罹患同胞にない	6,362
④親から伝達	4,047
⑤高影響と予測(Snpeff)	22
⑥頻度<0.01	2

以上の手順により絞り込まれた2つの短縮型変異(RPS24遺伝子Q191X変異と

CD300LF遺伝子P261fsX266変異)について、サンガーシーケンスにより存在を確認した。

次に、多発罹患家系のWESで同定された稀な変異とASDとの関連を調べるため、症例・対照サンプル(243対667)を用いたフォローアップ研究を行った。RPS24遺伝子Q191X変異はTaqMan法(アプライドバイオシステムズ社)、CD300LF遺伝子P261fsX266変異はフラグメント解析を用いてタイピングされた。

4. 研究成果

多発罹患家系の4人のWESでは合計で202,401個の変異が検出された。フィルタリング手順を適用し、我々は2つの稀な短縮型変異を同定した。1つはRPS24遺伝子の一塩基変異(chr10:g.79814469C>T)で、本来はグルタミン(Q)を指定する191番目のコドンが終止コドン(X)となる。もう1つは、CD300LF遺伝子の14塩基欠失(chr17:g.72691313_72691326delGTTGCAGTAGGTCG)で、本来はプロリン(P)を指定する261番目のコドンからフレームシフト(fs)を起こし266番目のコドンが終止コドン(X)となる。これらの変異はサンガーシーケンスにより確認された。

次に、我々は患者243人と対照667人についてRPS24遺伝子Q191X変異とCD300LF遺伝子P261fsX266変異をタイピングしたが、910人全員が変異アレルを保有していなかった。

本研究では、ASD多発罹患家系のWESによって2つの稀な短縮型変異(RPS24遺伝子Q191X変異とCD300LF遺伝子P261fsX266変異)が同定されたが、フォローアップ研究の910人ではこれらの変異は検出されなかった。RPS24遺伝子Q191X変異とCD300LF遺伝子P261fsX266変異は多発罹患家系のみで同定されたことから、これらの変異が特定の家系ではASDの発症に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

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3件)

- Inoue E, Watanabe Y, Egawa J (Corresponding author), Sugimoto A, Nunokawa A, Shibuya M, Igeta H, Someya T: Rare heterozygous truncating variations and risk of autism spectrum disorder: Whole-exome sequencing of a multiplex family and follow-up study in a Japanese population. *Psychiatry Clin Neurosci* 69(8): 472-476, 2015.

(査読有)

2. Egawa J, Watanabe Y, Wang C, Inoue E, Sugimoto A, Sugiyama T, Igeta H, Nunokawa A, Shibuya M, Kushima I, Orime N, Hayashi T, Okada T, Uno Y, Ozaki N, Someya T: Novel rare missense variations and risk of autism spectrum disorder: Whole-exome sequencing in two families with affected siblings and a two-stage follow-up study in a Japanese population. PLoS One 10(3): e0119413, 2015. (査読有)
3. Inoue E, Watanabe Y, Xing J, Kushima I, Egawa J(Corresponding author), Okuda S, Hoya S, Okada T, Uno Y, Ishizuka K, Sugimoto A, Igeta H, Nunokawa A, Sugiyama T, Ozaki N, Someya T: Resequencing and association analysis of CLN8 with autism spectrum disorder in a Japanese population. PLoS One 10(12): e0144624, 2015. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. <8th Congress of The Asian Society for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions 2015.8.19-8.22. Kuala Lumpur, Malaysia> Egawa J, Watanabe J, Wang C, Inoue E, Sugimoto A, Sugiyama T, Igeta H, Nunokawa A, Shibuya M, Kushima I, Orime N, Hayashi T, Okada T, Uno Y, Ozaki N, Someya T: Novel rare missense variations and risk of autism spectrum disorder: whole-exome sequencing in two families with affected siblings and a two-stage follow-up study in a Japanese population.
2. <第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会 2015.9.25. タワーホール船堀 (東京都江戸川区) > 江川純, 渡部雄一郎, 王晨堯, 井上絵美子, 杉本篤言, 杉山登志郎, 井桁裕文, 布川綾子, 澁谷雅子, 久島周, 折目直樹, 林剛丞, 岡田俊, 宇野洋太, 尾崎紀夫, 染矢俊幸: 自閉スペクトラム症罹患同胞 2 家系のエクソーム解析および 2 段階フォローアップ解析.

3. <第 55 回日本児童青年精神医学会 2014.10.12. アクトシティ浜松 (静岡県浜松市) > 江川純, 杉本篤言, 遠藤太郎, 染矢俊幸: 自閉症スペクトラム障害におけるオキシトシン受容体遺伝子のエクソンリシーケンスおよび関連解析.

[図書] (計 0 件)

[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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

江川 純 (えがわ じゅん)
新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授
研究者番号 : 80648527