

発達障害多発家系における原因遺伝子検索の試み

垣内千尋 1)、桑原斉 2)

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻精神医学 1)
東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻統合脳講座こころの発達医学分野 2)

<要 旨>

自閉症スペクトラム障害は、疫学研究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、ひいては新規治療薬の開発にとって不可欠である。しかし、多数例による大規模研究が行われつつあるが、現在のところ確定的なものはなく、示されてもオッズ比が低いなど、病態を説明するには至っていない。本研究では浸透率の高い原因遺伝子が存在する可能性がある多発家系に注目し、まずは研究のためのサンプル収集を行い、4 世代にわたる多発家系を見出した。本家系にアプローチし、非患者も含めた家系構成員に対して診断面接を行い、末梢血を採取しゲノム DNA を得た。引き続き同家系についての解析を遺伝形式として優性遺伝を想定し、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスにより原因遺伝子の同定を試みている。本家系の解析から病態の解明につながるような結果が得られることを期待している。

<キーワード>

発達障害、多発家系、ゲノム、エクソーム

【はじめに】

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、ひいては新規治療薬の開発にとって不可欠である。

多くの精神疾患同様、自閉症スペクトラム障害の遺伝様式は 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; Arikang 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仮説で病態を説明しきれない理由の一つとして、浸透率が高いが頻度が稀な遺伝的要因が多数存在し、それらが臨床上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、何世代にもわたり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、有力なものとしてコピー数変異、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、発達障害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、すなわち、SNP アレイを用いた SNPs 及びコピー数多型の解析や全エクソンシーケンスなどを組み合わせ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。そこで本研究では、その前提として、診断精度の高い多発家系の収集を行い、ゲノムの採取、サンプル精製を行うことを主目的とし開始した。

【方法および結果】

本研究の主目的である発達障害多発家系の収集については、まずは4世代にわたる多発家系を見出した。本家系にアプローチし、健常者も含めた家系構成員に対して診断面接を行い、末梢血を採取した。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。

本家系における発端者、及びその両親、祖父母、曾祖父母に対する診断面接の結果、発端者及び母親がアスペルガー障害、祖父及び曾祖父が特定不能の発達障害と診断された。本家系には浸透率の高い遺伝的要因が含まれている可能性があると考えられる (図1)。

なお本研究におけるヒト遺伝子解析研究は、東京大学医学部倫理委員会およびヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会においてすでに承認を経ている。

また本研究の主目的はサンプルの収集であるが、引き続き同家系についての解析を遺伝形式として優性遺伝を想定し、次世代シーケンサーを用いた全エクソンシーケンスにより原因遺伝子の同定を試みている。

まずは発端者、非罹患父親、非罹患祖母に対し全エクソンシーケンスを行った。

全エクソンシーケンスに用いた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た。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（6 サイクル）を行い、得られた PCR 産物をゲノムライブラリーとした。作成したゲノムライブラリーを 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（12 サイクル）を行

った後、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 genome analyzer II (GA II) によるシーケンスに用いた。GA II による解析で鋳型 DNA の両末端 75 塩基の配列を決定した。Hg18 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 75 塩基の DNA 配列は pair end、distance 30-280 とし参照配列に mapping した。発端者においては 10 倍以上の coverage、非罹患父親、非罹患祖母においては 4 倍以上の coverage で変異解析を行った。

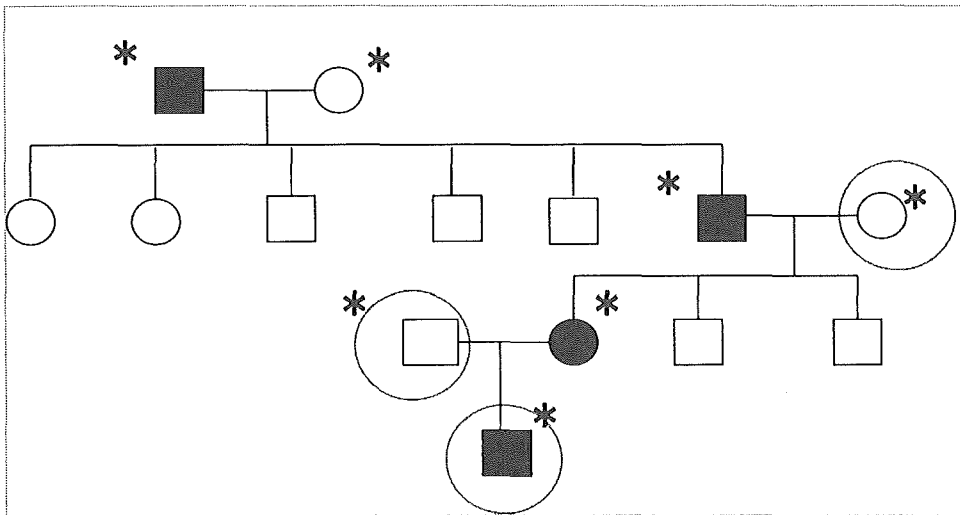


図1 自閉症スペクトラム障害家系 罹患者：黒 DNA サンプルを入手できた対象者：* エクソンシーケンスを行ったサンプル：青丸

シーケンスにより得られた配列のリード数は発端者が 61,133,572、非罹患父親が 62,302,184、非罹患祖母が 62,862,356 であった。参照配列に mapping されたリードの中で、発端者では 59.7%、非罹患父親では 58%、非罹患祖母では 62.8% が参照配列のエクソン領域に mapping された。配列ごとの平均 coverage は発端者で 57 倍、非罹患父親で 48.2 倍、非罹患祖母で 54.3 倍であった。エクソン配列の中で

少なくとも 10 倍以上の coverage で mapping された領域は、発端者で 88.1%、非罹患父親で 83.6%、非罹患祖母で 85.1%であった (表 1)。

多型/変異は発端者で 11082 個、非罹患父親で 31878 個、非罹患祖母で 31499 個見出された。

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と、挿入/欠失を伴うものに限定した。その結果、発端者において病因

となり得る多型/変異は非同義置換を伴う変異が 5462 個、挿入/欠失が 98 個であった。

さらに、浸透率が高く稀な変異が本家系における自閉症スペクトラム障害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 (db130) に掲載されていない多型/変異に限った。その結果、多型/変異は 751 個、挿入/欠失は 17 個が候補変異として残った。

4 代続く本家系における表現型の伝播様式からは自閉症スペクトラム障害の遺伝様式は優性遺伝であることが疑わしい。従って家系の中で伝播している多型/変異の中で、非罹患父親あるいは非罹患祖母から伝播している多型/変異は自閉症スペクトラム障害の病因となる

変異である可能性は低い。エクソンシークエンスの結果得られた非罹患父親、非罹患祖母で見出された変異を除くと、多型/変異は 143 個、挿入/欠失は 17 個が残った。

家系内での伝播を確認するために SNP を用いた連鎖解析を行い、ロッド値が 0 を超える領域に絞り込んだ結果 89 個の多型/変異、4 個の挿入/欠失が残った。連鎖解析は発端者、罹患母親、非罹患父親、罹患祖母、非罹患祖母の 5 名を対象に行った。SNP の Genotyping には Affymetrix Genome-wide Human SNP Array 6.0 を用い、連鎖解析のための SNP 選択は SNP HitLink で行い、連鎖解析は Merlin を用いて multipoint analysis で行った。

	発端者(ASD)	父	祖母
Mean per-base coverage (×)	57	48.2	54.3
Bases mapped to exome, %	59.7	58	62.8
Bases covered at least 10× %	88.1	83.6	85.1
cSNP 多型/変異	11082(10×)	31878(4×)	31499(4×)
非同義置換	5462	-	-
挿入/欠失	98	-	-
dbSNPに含まれない多型/変異			
多型/変異	751	-	-
挿入/欠失	61	-	-
非罹患者に含まれない多型/変異			
多型/変異	143	-	-
挿入/欠失	17	-	-
連鎖解析			
多型/変異	89	—	-
挿入/欠失	4	—	-

表1 エクソンシークエンスの結果

最終的に患者のみにみられる新規ミスセンス変異或いは挿入/欠失を合計 93 個抽出した。

この中で、非罹患父親あるいは非罹患祖母のエクソンシークエンスの結果に conflict がある

ものはエクソンシーケンスの結果がミスリードである可能性が高いと考え除外した。また、発端者で見出された多型/変異が homogeneous であるものは、本家系における病因遺伝子である可能性は低いと考え除外した。結果 41 個の多型/変異と 2 個の挿入/欠失が候補変異である可能性が高いと考えられた。

合計 43 個の多型/変異について、全家系構成員 7 名に対しサンガー法によるシーケンスを行い、現在までに、疾患と完全に共分離しているもの、すなわち病因遺伝子候補としてナンセンス変異を持つ遺伝子 1 個を含む 12 個の遺伝子を見出している (表 2)。

染色体	Consensus position	変異	参照配列	変異	Counts	Coverage	アミノ酸変化
chr2	23596700	SNP	C	T/C	9/5	14	Ala6Val,Val
chr2	19992191	SNP	C	C/T	11/7	18	Trp104Stp
chr4	9765642	SNP	C	C/T	36/22	58	Asp1331Asn
chr5	2600142	SNP	A	A/C	8/7	15	Gln898His
chr5	29744211	SNP	G	A/G	14/13	27	Arg964Cys
chr7	14464814	SNP	C	C/T	5/5	10	Gly138Arg,Arg,Arg
chr7	24943511	SNP	G	A/G	19/15	34	Ala170Thr
chr8	2530419	SNP	G	A/G	16/15	31	Arg409His
chr8	13295291	SNP	G	A/G	8/5	13	Val180Met,Met,Met,Met
chr8	27217615	SNP	C	C/G	6/6	12	Leu708Val
chr8	8404343	DIP	TGG	TGG/—	9/7	16	no frameshift
chr16	16866123	SNP	T	T/C	10/13	23	Asn57Ser; Asn85Ser

表 2 候補変異

【考察】

本手法により発達障害の原因遺伝子あるいは浸透率の高い遺伝子が同定されるのかはまだ不明である。しかし、従来の大規模サンプルを用いた CVCD 仮説に基づいたリスク遺伝子探索に加え、RVCD 仮説に基づく個々の患者における原因探索から、結果として共通のカスケードを見出していく、という視点は重要と考えられる。引き続き、浸透率の高い遺伝子を含むと考えられる多発家系あるいは双生児不一致例などの解析を進めていく必要があると考えられた。

【引用文献】

Alarcon, M., Abrahams, B.S., Stone, J.L., Duvall, J.A., Perederiy, J.V., Bomar, J.M.,

Sebat, J., Wigler, M., Martin, C.L., Ledbetter, D.H., et al. (2008). Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism susceptibility gene. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 150–159.

Anney, R., Klei, L., Pinto, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T.R., Correia, C., Abrahams, B.S., Sykes, N., Pagnamenta, A.T., et al. (2010). A genomewide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4072–4082.

Arking, D.E., Cutler, D.J., Brune, C.W., Teslovich, T.M., West, K., Ikeda, M., Rea, A., Guy, M., Lin, S., Cook, E.H., and Chakravarti, A. (2008). A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am. J. Hum. Genet.* 82,

- 160–164.
- Bakkaloglu, B., O’Roak, B.J., Louvi, A., Gupta, A.R., Abelson, J.F., Morgan, T.M., Chawarska, K., Klin, A., Ercan-Sencicek, A.G., Stillman, A.A., et al. (2008). Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 165–173.
- Benayed, R., Gharani, N., Rossman, I., Mancuso, V., Lazar, G., Kamdar, S., Bruse, S.E., Tischfield, S., Smith, B.J., Zimmerman, R.A., et al. (2005). Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 851–868.
- Benayed, R., Choi, J., Matteson, P.G., Gharani, N., Kamdar, S., Brzustowicz, L.M., and Millonig, J.H. (2009). Autism-associated haplotype affects the regulation of the homeobox gene, ENGRAILED 2. *Biol. Psychiatry* 66, 911–917.
- Berkel, S., Marshall, C.R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., Endris, V., Roberts, W., Szatmari, P., Pinto, D., et al. (2010). Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat. Genet.* 42, 489–491.
- Campbell, D.B., Sutcliffe, J.S., Ebert, P.J., Militeri, R., Bravaccio, C., Trillo, S., Elia, M., Schneider, C., Melmed, R., Sacco, R., et al. (2006). A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16834–16839.
- Durand, C.M., Betancur, C., Boeckers, T.M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I.C., Anckarsäter, H., et al. (2007). Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* 39, 25–27.
- Jackson, P.B., Boccuto, L., Skinner, C., Collins, J.S., Neri, G., Gurrieri, F., and Schwartz, C.E. (2009). Further evidence that the rs1858830 C variant in the promoter region of the MET gene is associated with autistic disorder. *Autism Res.* 2, 232–236.
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Rastam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., and Bourgeron, T.; Paris Autism Research International Sibpair Study. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat. Genet.* 34, 27–29.
- Kim, H.G., Kishikawa, S., Higgins, A.W., Seong, I.S., Donovan, D.J., Shen, Y., Lally, E., Weiss, L.A., Najm, J., Kutsche, K., et al. (2008). Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 199–207.
- Moessner, R., Marshall, C.R., Sutcliffe, J.S., Skaug, J., Pinto, D., Vincent, J., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B., Roberts, W., Szatmari, P., and Scherer, S.W. (2007). Contribution of SHANK3

- mutations to autism spectrum disorder.
Am. J. Hum. Genet. 81, 1289–1297.
- Szatmari, P., Paterson, A.D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X.Q., Vincent, J.B., Skaug, J.L., Thompson, A.P., Senman, L., et al; Autism Genome Project Consortium. (2007). Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.* 39, 319–328.
- Wang, K., Zhang, H., Ma, D., Bucan, M., Glessner, J.T., Abrahams, B.S., Salyakina, D., Imielinski, M., Bradfield, J.P., Sleiman, P.M., et al. (2009). Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature* 459, 528–533.
- Weiss, L.A., Arking, D.E., Daly, M.J., and Chakravarti, A.; Gene Discovery Project of Johns Hopkins & the Autism Consortium. (2009). A genome-wide linkage and association scan reveals novel loci for autism. *Nature* 461, 802–808.