

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

自閉症の原因解明と予防、治療法の開発
一分子遺伝・環境・機能画像からのアプローチに関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤 進昌

平成16年4月

目 次

I 総括研究報告

- 自閉症の原因解明と予防、治療法の開発1
—分子遺伝・環境・機能画像からのアプローチ—
主任研究者 加藤 進昌 東京大学大学院医学系研究科精神医学分野

II 分担研究報告

- 1 自閉症の原因解明と予防、治療法の開発に関する研究4
佐々木 司 東京大学保健管理センター
- 2 自閉症の原因解明と予防、治療法の開発 分子遺伝学的解析6
難波 栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター
- 3 自閉症の原因解明と予防、治療法の開発16
—分子遺伝・環境・機能画像のからのアプローチ—
松本 英夫 東海大学医学部精神科学部門
- 4 自閉症圏障害の診断と評価に関する研究18
金生 由紀子 北里大学大学院医療系研究科
- 5 自閉症モデル動物の発生および発達における甲状腺ホルモンの関与に関する研究
定松 美幸 滋賀医科大学医学部精神医学講座20
- 6 胎児期から新生児期にかけての甲状腺機能と精神発達との関連に関する研究
先天性甲状腺機能低下症マスキング陽性児の情緒と行動の問題評価
立花 克彦 神奈川県立こども医療センター22
朝倉 由美 神奈川県立こども医療センター

Ⅲ 協力研究報告

- 7 自閉性障害に対する遺伝子解析研究31
山本 賢司 東海大学医学部専門診療学系精神科学
松本 英夫 東海大学医学部精神科学部門
- 8 新生児マススクリーニングTSH値およびFT4値と広汎性発達障害38
—横浜市中部地域療育センターでの予備調査—
原 仁 横浜市中部地域療育センター
立花 克彦 神奈川県立こども医療センター
加藤 進昌 東京大学大学院医学系研究科精神医学分野
- Ⅳ 研究成果の刊行に関する一覧表42
- Ⅴ 研究成果の刊行物・別刷り44

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

自閉症の原因解明と予防、治療法の開発
—分子遺伝・環境・機能画像からのアプローチ—

主任研究者 加藤進昌 東京大学大学院医学系研究科精神医学分野 教授

研究要旨

本研究は自閉症の原因解明と予防・治療法開発を目的に、分子遺伝・機能画像・環境要因の各分野から複数施設共同でアプローチする。分子遺伝研究では、罹患同胞対法による連鎖解析と、case-control および患者 両親での TDT による関連研究を併用して疾患関連遺伝子群の同定を目指し、NF 1、HOX A などの遺伝子について興味深い知見を深めた。連鎖研究については、日本人では固有の遺伝子座が存在する可能性も高いため、独自の連鎖解析を進めている。さらに難波ら鳥取大グループが確立した技術により、parent of-origin 効果等と関連する imprinting gene の検索を開始した。なお研究成功の鍵である十分な規模の対象を得るため、東海大精神科・東大精神科・鳥取大学のほか対象リクルートの場所として、三重県立小児心療センター、あいち小児保健医療総合センターの協力を得ることに成功した。解析実施は東大・東海大精神科、鳥取大遺伝子研究施設のほか東大病院 SNPs センターの協力を得る。自閉症では、特に近年自閉症発病率の著しい増加が報告されており、環境因変化による影響可能性の検討が重要である。この点で注目すべき知見の1つは、新生児における TSH の微妙な上昇である。重金属や抗甲状腺物質などの環境物質による母胎内の環境変化が影響している可能性もある。横浜市内の施設で予備的に自閉症児の新生児期 TSH 値を検索したところ、2/22 例に異常を認めた。今後症例を拡大して検討する予定である。また東大精神科に通院中の自閉症者で同意を得て、乳歯・臍帯などの試料を用いて環境物質の測定を開始した。動物実験では、新生仔期に低甲状腺状態においたラットでは、成長後に多動と学習障害を示すか、このモデルでは胎児期特異的に発現する遺伝子群の小脳での発現が遅れることを発見した。さらに、甲状腺ホルモン受容体欠損マウスを入手し、行動解析を行った結果多動を認めた。アスペルガー症例群 (AS) で錯視が生じるかどうかを比較検討したところ、その能力は健常者と同等であったが、AS では大脳全般の活動が極めて高いという特徴を認めた。脳画像では、コンピューター自動解析による全脳の形態的变化の検討を開始した。

分担研究者名

佐々木司

東京大学保健管理センター 助教授

難波栄二

鳥取大学遺伝子研究施設 教授

松本 英夫

東海大学医学部内科学系精神科 助教授

金生由紀子

北里大学大学院医療系研究科 助教授

定松美幸

滋賀医科大学医学部精神医学講座 講師

立花克彦

神奈川県立こども医療センター 部長

研究の実施経過

本年度は研究について患者及び家族への理解を促すためのパンフレットを活用して、試料収集の対象をさらに増加させる努力を行った。それによって新たに、三重県立小児心療センター、あいち小児保健医療総合センターと協力関係を築くことに成功した。すべての研究参加施設での研究は倫理委員会の承認を得ることができた。次年度より本格的にデータ収集を行うとともに、社会的な理解の形成に向けての努力も公開シンポジウム開催や、メディアへの働きかけを通じて継続していく。既に神奈川新聞では特集記事として掲載された(2004年3月8日)

- (1) ①中枢神経系の形成早期に重要な役割を果たす遺伝子、②co-morbidityを示す疾患からのアプローチ、③狭義の自閉症に見られる認知・行動特徴や高セロトニン血症との関連、といった複数の観点から、自閉症関連遺伝子解明のためのアプローチを進めた。①では、胎生初期の脳形成に重要な役割を果たすhomeo box (HOX) A1遺伝子で、exon1内のhistidine repeatにおける変異を見出した。健常対照者では、こ

のrepeatは通常10回繰り返しのみで、先行研究でも本研究でも変異は確認されていない。自閉症でみられた変異のうち、7回繰り返しalleleでは正常な遺伝子と比較して核外への移行に明らかな障害が認められた。これまでの研究で示唆されている7番染色体長腕(7q31)に位置し、小脳顆粒細胞における軸索伸長の制御に関わるneuronal cell adhesion molecule (NrCAM) 遺伝子の一部のSNPsにおいて、患者-対照間で有意差($p < 0.01$)を見出した。②では、neurofibromatosis-1 (NF1) 遺伝子のintron-27bの2つのmarker(CA-repeat)で有意な結果を見出した。結節性硬化症のTSC1、TSC2遺伝子では有意な結果は得られなかった。③ではセロトニン、トパミン関連遺伝子について検索したか、有意な結果は得られなかった。

- (2) 高機能広汎性発達障害5名と、健常者10名を対象に、錯視のタスクを用いてfMRIによる視覚認知に関する研究を行った。その結果、錯視の正解率では両群間に差を認めなかったが、脳の活性化を示す相関係数では自閉症群で $p < 0.0001$ で有意に高い結果となった。自閉症群ではかなりのエネルギーと、視覚連合野と前頭前野を含むより広範な領域を使って、健常群と同等の正解率を獲得したと考えられる。今後はPPI (prepulse inhibition) とfMRIを用いて高機能広汎性発達障害、統合失調症、健常者を対象に測定し、自閉症のsensorimotor gating (知覚運動関門)に関する障害を特定したい。
- (3) 脳の構造的画像解析としてvoxel based

morphometryによる全脳体積の自動的解析を開始した。これによってこれまで確定するに至らなかった脳内の形態変化の解明が期待される。機能画像については、患者の利便性を考慮して携帯型近赤外線スペクトロスコピーによる簡便な認知機能検査をより多数の症例で行うこととして計測を開始した。

- (4) 自閉症モデル動物として、1) プロピルチオウラシル(PTU)を出生後から19日間母ラットに飲ませて低甲状腺ホルモン状態においた仔ラットと、2) 甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウス(TRKO)を用意した。脳胞分化にかかわり領域特異性のオーガナイザーとして特定された遺伝子であるFGF8, Pax6とセロトニンニューロンの分化にかかわるWnt1に注目し、これら遺伝子の発現が対照群に比較して明らかに遅れて出現していることを確認した。また小脳の層構造の構築が遅延することも明らかになった。TRKOについては、明らかな多動が認められた。
- (5) 横浜市内の1施設で自閉症と診断されている小児の新生児スクリーニング時のデータを解析(後ろ向き検討)したところ22人中2人にTSH高値が認められた。次年度は横浜市内の全施設に拡大して検討する。新生児マススクリーニングで先天性甲状腺機能低下症について要精密診査となり神奈川県立こども医療センターを受診した小児の保護者に、「子どもの行動チェックリスト」の調査用紙を送付した追跡調査では、健常小児と差は認められなかった。今後は、甲状腺異常を有した母体から出産した児についても追跡調査する予定である。

今後の活用・提供

本研究で最も重要なことは、研究に対する偽りのない社会的理解の形成である。これには、まず患者・家族を始めとする自閉症関係者に、説明会やパンフレット発行などを通して、本研究の目的や進行状況をはじめ自閉症の生物学的研究の内容と意義を伝える。本研究対象のリクルートの促進のみでなく、患者・家族との協力関係のもとに児童思春期の心の問題の生物学的研究を進める土壌の形成を目指すべきであると考える。

このためのステップとして、まず患者家族会のメンバーとの話し合いをもち、そのニーズを吸収して自閉症の診断、治療、生物学的研究の理解を促すためのパンフレットを完成した。次年度には6月に自閉症児の薬物療法について多くの報告を行っているアメリカの研究者を招聘して講演会を開く。さらに11月には自閉症の遺伝子研究で著名なDr Pauls教授(ハーバート大学)を招聘して東京大学安田講堂にて公開シンポジウムを開催する予定である。

II. 分担研究報告

自閉症の原因解明と予防、治療法の開発に関する研究

分担研究者 佐々木 司 東京大学保健管理センター 助教授

研究要旨 自閉症の疾患感受性遺伝子の検索を相関研究のスタイルで進めている。対象は自閉症患者約 170 例と健常対象者、また患者の半数ではその両親についても DNA 試料を得て行った。対象となる遺伝子は、1) 自閉症と合併率の高い疾患の関連遺伝子(NF1, TSC1, TSC2, FMR1)、2) これまでの連鎖研究での hot spot である 7 番染色体長腕領域(7q21 q31)に位置し、かつ脳の早期発達に深く関連するものから選択したいくつかの遺伝子(FOXP2, NrCAM, RELN, PTPRZ1)についての検討を行った。その結果、NF1、NrCAM, RELN の多型の一部で、自閉症との相関が示唆された。これらの遺伝子につき、さらに多数の多型（主に SNP s）について解析を進めているほか、7q 領域については他の遺伝子についても解析を行っている。

A 研究目的 自閉症は、対人接触の障害、認知・言語の障害、興味の偏りと固着的繰り返しを特徴的症狀として示し、3 歳前後に明らかとなってから一生にわたり障害の続く発達障害である。双生児研究・家族研究から、遺伝的要因が強く発病に関与し、かつ複数の疾患感受性遺伝子が存在することが示唆されている。本研究では相関研究のスタイルで、自閉症の疾患感受性遺伝子を明らかにすることを目的とする。

B 研究方法 DSM IV の基準を満たす自閉症患者約 170 例を対象に case control デザインで、1) 自閉症と合併率の高い疾患の関連遺伝子(NF1, TSC1, TSC2, FMR1)、2) これまでの連鎖研究での hot spot である 7 番染色体長腕領域(7q21 q34)に位置し、かつ脳の早期発達に深く関連するものから選択したいくつかの遺伝子(FOXP2, NrCAM,

RELN, PTPRZ1)について SNPs および microsatellite 多型の分布を検討した。なお、170 例中 100 例では、伝達不平衡テスト (TDT) での検討も進めているが、その結果については後日報告する。

C 結果と考察 Neurofibromatosis1(NF1) の intron 27b の 2 つの microsatellite、および NrCAM, RELN のいくつかの SNPs で、自閉症との相関を示唆する結果が得られた。ただし、多重比較について補正すると結果は十分とは言えず、現段階では、十分な結論は得られていない。このためこれらの遺伝子につき、さらに多数の多型（主に SNP s）について解析を進め、haplotype 解析を進める予定である。また、7q 領域の他の候補遺伝子、および 15q、2q など他の染色体 hot spots の中枢神経初期形成関連遺伝子について解析を進めている。また、

統計学的検出力を高めるため、東大病院精神科のほか、三重県、愛知県の施設と共同で対象のリクルートを進めている。

D 論文

Marui T et al Brain Dev 26 5 7, 2004

Marui T et al Am J Med Genet (in press)

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

自閉症の原因解明と予防、治療法の開発
分子遺伝学的解析

分担研究者 難波 栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター 教授

研究要旨 昨年までに自閉症患者において HOXA1 遺伝子の特異的な変異を明らかにしてきた。本年度は新たに東海大学からの検体（自閉症 110 家系、213 検体のリンパ芽球）を加え解析を進めた。正常ではヒスチジンは 10 の繰り返しであるが、自閉症患者検体において、昨年報告した繰り返し数か 7 のアレルをもつ患者が 2 人見つかったとともに、繰り返し数か 11 の新たな変異アレルが 3 人に検出された。これらは父親または母親に確認してきた。しかし、患者の変異がないにも関わらず、父または母のみにこれらの変異がある場合もあり、今後の検討が必要と考えられた。また、昨年から自閉症の原因遺伝子解明の鍵を握ると考えられる脳に特異的なインプリンティング遺伝子を単離するための研究では、本年度は differentially methylated region (DMR) に注目して研究を進めた。142 箇所の DMR 候補領域から 41 箇所について脳の DNA で検討した結果 46%にあたる 19 箇所において DMR が確認された。それらの中で 22 番染色体の DMR 領域からインプリンティング候補遺伝子 2 つが単離された。

A 研究目的

自閉症に関連する遺伝子を単離することを目的に研究を行っている。昨年までに、HOXA1 遺伝子内に正常では見られないヒスチジン繰り返し配列の変異を自閉症患者で見出している。本年度は、新たに東海大学からの検体（自閉症 110 家系、213 検体のリンパ芽球）を解析に加えることにより、さらに興味深い変異が明らかになってきた。

また、自閉症とインプリンティング遺伝子の関連が注目されていることから、我々は脳に関連するインプリンティング遺伝子を網羅的に単離し、その中から自閉症の候補を探る研究戦略を立てている。昨年度はヒト染色体を一本のみもつ神経細胞株の確立を目指した。ヒト 15 番染色体に存在する

神経細胞特異的にインプリンティングを示す UBA3A 遺伝子を指標に研究を進めた。しかしながら、我々の作製した神経細胞株では UBA3A 遺伝子の発現はインプリンティングを示さなかった。つまり、この方法では限界があることが明らかになった。そこで、本年度は differentially methylated region (DMR) に注目して研究を開始した。DMR はアレル間で異なるメチル化状態を示すゲノム部分で、インプリンティングの分子機構として中心的な役割を果たすものと考えられている。今回は、すでに国立がんセンター研究所の白石らにより明らかにされている 142 箇所の DMR 候補領域から、自閉症などに関連すると思われる領域を中心に 41 箇所を選んで解析を進めた。これらの

解析から、新たなインプリンティング遺伝子の候補が明らかになってきている。

B 研究方法

自閉症の子供をもつ 110 家系のリンパ芽球 (219 検体 子 93、母 62、父 64、全て日本人) およびリンパ球 (33 検体 子 3、母 14、父 16、全て日本人) を東海大学より持ち帰り、リンパ芽球の作成ならびに培養を行い、それらから DNA を分離した。

HOXA1 遺伝子解析

1) PCR

PCR 溶液は、10 μ l 中に、DNA(100ng, 50ng, 25ng, 12.5ng, 10ng, 2.5ng, 0.625ng, 0.3125ng, 0.15625ng)、1 \times PCR buffer、0.25mM dNTPs、5pmol 4F プライマー、Cy5-4F プライマー(3pmol, 2pmol, 1pmol)、10pmol 1R プライマー、0.5U Ampli Taq Gold が含まれるように調整した。PCR は iCycler(BIO RAD)を用いて、95 $^{\circ}$ C で 5min 加熱した後、(95 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min)、または(95 $^{\circ}$ C 30sec, 55 $^{\circ}$ C 30sec, 72 $^{\circ}$ C 30sec)のサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C 5min で加熱する 2つの条件で行った。PCR 産物はアカロースゲル(1% Agarose S, 1% Nusieve)電気泳動でそのサイズを確認した。分子量マーカーには Marker4(ϕ X174/HaeIII)を用いた。PCR 産物は 12 $^{\circ}$ C で保存した。

2) フラグメントサイズの解析

ゲルは 50ml 中に 6% HydroLink LongRanger、6M Urea、1.2 \times TBE(1M Tris HCl, 0.83M Boric Acid, 10mM EDTA Na₂)が含まれるように調整し、厚さ 0.35mm のものを作成した。PCR 産物 2 μ l に変性剤 8 μ l を加え、95 $^{\circ}$ C で 5min の熱変

性処理をした後水中で急冷却し、その 5 μ l を電気泳動のサンプルとした。ALFred DNA Sequencer(Pharmacia)を用いて、0.6 \times TBE で 1200V、26mA、45W、47 $^{\circ}$ C、480min の条件で電気泳動を行った。泳動後はソフトウェア AlleleLinks を用いて PCR 産物の長さの解析を行った。

3) PCR 産物のサブクローニング

PCR 溶液には、10 μ l 中に 10–30ng DNA、1 \times PCR buffer、0.25mM dNTPs、10pmol 4F プライマー、10pmol 1R プライマー、0.1U Ampli Taq Gold が含まれるように調整した。PCR は iCycler(BIO RAD)を用いて、95 $^{\circ}$ C で 5min 加熱した後、95 $^{\circ}$ C 1min、55 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min、のサイクルを 35 回繰り返す、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5min で加熱する条件で行った。この PCR 産物 5 μ l に T vector 0.5 μ l、2 \times ligation buffer 4 μ l、T₄ ligase 1 μ l を加え、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。このサンプル 2 μ l に水中で融解させた Competent cell 25 μ l を加え、水中で 20min 放置した後、42 $^{\circ}$ C で 26sec の熱処理を行い、すぐに氷中に戻して 1min おいた。これに SOC 500 μ l を加えて 37 $^{\circ}$ C で 60min 保温した後、X gal 50 μ l、IPTG 5 μ l、SOC 45 μ l を塗布した LB Amp Plate に 200 μ l、300 μ l ずつ塗布して、37 $^{\circ}$ C で一晩保温した。

4) プラスミドの単離と精製

T vector をもつ白のシンクルコロニーを LB Amp 培地 2ml に植え、37 $^{\circ}$ C で一晩振とう培養した。その後、アルカリ SDS 法の原理による自動プラスミド抽出機 PI 100 Σ (Kurabo)によりプラスミドを抽出した。このプラスミドに 100 μ l の TE RNase(10mM Tris HCl pH8.0, 1mM EDTA Na₂, 50 μ g/ml RNase)を加え、37 $^{\circ}$ C、

100rpm で振とうしなから 30-60min インキュベートした後、1.5ml チューブに移した。このサンプルを 12000rpm、5min、室温で遠心し、上清 50 μ l をマルチスクリーン PCR プレート (Millipore) に移し、マルチスクリーンハキュームマニホールト (Millipore) を用いて 20-25inch Hg で 5min 上清がなくなるまで吸引した。その後、100 μ l の TE を加えて上清がなくなるまで吸引し、この操作を 2 回繰り返した。最後に 50 μ l の TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA Na2) を加え、5min シェーカーで攪拌し (100rpm)、溶出した DNA を 4 $^{\circ}$ C で保存した。

5) プラスミドのシーケンシング

シーケンス反応液には、10 μ l 中に Terminator Ready Mix 4 μ l、精製プラスミド 1 μ l、SP6 プライマーまたは T7 プライマーが 4pmol 含まれるように調整した。反応は iCycler (BIO RAD) を用いて、96 $^{\circ}$ C 30sec、50 $^{\circ}$ C 15sec、60 $^{\circ}$ C 4min のサイクルを 25 回繰り返す条件で行った。

Multiscreen Dye Terminator Removal

Kit (Millipore) を用いて反応液中の余分な蛍光物質を除去し、ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) でそのシーケンスを解析した。

変異 HOXA1 遺伝子の発現実験

1) HOXA1 EGFP 発現ベクターの作成

7 リピート配列の変異をもつ患者および正常対象から RNA と DNA を分離した。これらを用いて、次のプライマーを用いて HOXA1 cDNA を構築した。5'-TA GAG CTC ATG AAC TCC TTC CTG GAA TAC CCC 3' 5' AT GGATC CGT AAA GTC TGC GCT GGA GAA GAT GTC 3', 5'-TA

GAG CTC ACC ATG GAC AAT GCA AGA ATG AAC TCC 3' and 5' AT GG ATC CGT GTG GGA GGT AGT CAG AGT GTC TGA 3' PCR は Expand Long Template PCR System (Roche) を用いた。PCR 産物は発現ベクター pEGFP N1 (Clontech) に組み込み、ABI3100 Genetic Analyzer (ABI) で塩基配列を確認した。

2) 細胞への遺伝子導入、免疫染色、蛍光画像解析

HOXA1 EGFP 発現ベクターは Lipofectin (Invitrogen) を用いて COS 7 細胞に導入し発現実験を行った。発現した細胞は 4% paraformaldehyde で固定し、0.1% Triton X 100 で処理後、1% BSA を含む PBS でブロッキングを行った後に goat anti HoxA1 antiserum (Santa Cruz) で反応させた。FITC conjugated anti goat IgG (Amersham) をさらに反応させ、propidium iodide で核を染色した後に、共焦点レーザー顕微鏡 (MRC1024 Bio Rad) で観察した。

脳特異的インプリンティング遺伝子単離

1) Bisulfite 処理を用いた塩基配列の決定

ヒト脳より抽出したゲノム DNA を用い、bisulfite 処理後に塩基配列を決定することによりメチル化の有無を検討した。これは、非メチル化のシトシン (C) は bisulfite 処理によりウラシル (U) (塩基配列解析ではチミン (T) として検出) に変化するか、メチル化を受けているシトシン (C) は変化しないという原理を用いている。

a) ゲノム DNA の bisulfite 処理

bisulfite 処理には CpGenome Modification kit (Serologicals Corporation) を用いた方法と、3.6M NaHSO₃

0.6mM HQ (4.04M NaHSO₃, 10mM HQ, 6M NaOH pH 5.0) とゲノム DNA を反応させ、Wizard DNA Clean-Up System column (Promega) を用いて精製し、エタノール沈殿によって DNA を回収する方法を併用した。

b) DMR 候補領域の物理的地図および PCR プライマーの作成

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の BLAST を用い、DMR 候補領域の存在するゲノム領域を検索し各染色体上の位置を明らかにした。Bisulfite 処理によりメチル化を受ける CpG ジヌクレオチドのシトシン以外は全てチミンに変換されることを想定し BLAST データベースの情報に基づきプライマーを作成した。

c) PCR 法

PCR 反応容量が 10 μ l となるよう MQ 水を 4.65 μ l、dNTPs を 1.25 μ l、10 \times buffer (各 2mM) を 1.0 μ l、プライマー (10 μ M) を各 1.0 μ l、Ampli Taq Gold (Roche) を 0.1 μ l にゲノム DNA (50ng/ μ l) 1.0 μ l を加えた。これを PCR 法 (95 $^{\circ}$ C で 10 分間 denature した後、95 $^{\circ}$ C 30 秒、プライマーに応じたアニーリング温度で 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒をそれぞれのプライマーに応じたサイクル、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分) によって増幅反応を行った。

d) 電気泳動および PCR 産物のダイレクトシーケンス解析

PCR 産物の電気泳動は 2% のアガロースゲルで行い、エチシウムブロマイドにより染色を行った。PCR 産物の精製には QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN) または Multiscreen-PCR (Millipore) を用いた。シーケンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Ver 3.0 (Applied Biosystems) を用いて 96 $^{\circ}$ C 30

秒、50 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 4 分 (25 サイクル) で行い、シーケンス解析は 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で行った。

2) 22 番染色体における DMR 候補領域の遺伝子解析

a) ヒト 22 番染色体を含むマウス A9 雑種細胞の選択

ヒト染色体を一本のみ保持するマウス A9 雑種細胞ライブラリー 700 株の中からヒト 22 番染色体上に存在する STS マーカー (D2S420、D2S1144、D2S272、D2S1170) を用いて細胞株を選択した。さらにこれらの STS マーカーは ALFred automatic sequencer を用いて解析した。

b) RT-PCR による発現解析

各遺伝子の塩基配列情報は National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) データベースより得て、既知の多型を含むように PCR プライマーを設計した。各細胞株からの total RNA 抽出には RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用い、DNase I (Takara) 処理を行った後、オリゴ dT プライマー、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。cDNA 合成の確認のため、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) を用いて PCR を行った。PCR 条件は 95 $^{\circ}$ C 45 秒、58 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒を 36 サイクル、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分とした。

(倫理面での配慮)

本研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に従い、東京大学医学部、東海大学医学部、鳥取大学医学部の倫理委員会の承

認を得て行った。

C 研究結果

HOXA1 遺伝子解析

今回、自閉症の患者および家族、計 321 検体の解析を行った。その結果、9 塩基の欠失のアレルが 8 サンプル (子 2、母 2、父 2)、3 塩基の延長のアレルが 9 サンプル (子 3、母 4、父 2)、6 塩基の延長のアレルが 1 サンプル (父) で認められた。これらの結果を表 1 にまとめた。また、変異が見つかったサンプルを pGEM T vector にサブクローニングし、精製したプラスミドを用いてシーケンスを解析したところ、これらの欠失・延長は全てヒスチシンリピート中に存在することかわかった。プラスミドのシーケンスは、少なくとも 1 サンプルあたり 2 個以上のクローンで同じ変異を確認した。9 塩基の欠失によりリピート数は 10 回から 7 回に減少しており、3 塩基の延長で 10 回から 11 回、6 塩基の延長で 10 回から 12 回へとリピート数が増えていることかわかった。この結果を家系ごとにまとめると表 4 になる。自閉症児では、7 リピートのアレルをもつ児が二人、11 リピートのアレルを持つ児が三人であった。7 リピートのアレルを一人は父親からもう一人は母親から受け継いでいた。また、11 リピートのアレルはともに母親から受け継いでいた。さらに興味深いことに、自閉症児には変異がなくても、父親のみに変異が認められた家系が 5 つ (7 リピート 1、11 リピート 3、12 リピート 1)、母親のみに変異が認められた家系が 1 つ存在した (7 リピート)。また、自閉症児だけに異常が認められた家系は存在しなかった。

変異 HOXA1 遺伝子の発現実験

C 端に GFP を融合させた 7 回繰り返しのヒスチニンをもつ変異蛋白は、正常とは異なる細胞内の局在をとる (図 1)。正常では、核から細胞質内への蛋白の移行が見られるが、変異蛋白は核内に蛋白が留まり細胞質への移行が障害されていた。

脳特異的インプリンティング遺伝子単離

全候補領域のうち、45 箇所の検索を行い、ヒト脳組織においてもメチル化状態に差異が認められる CpG アイランドを 19 箇所同定した (図 2)。脳組織においてヒト染色体 1、2、3、5、6、7、14、16、17、18、20、22 番上の 19 箇所がヘミメチル化状態で、インプリンティング領域の可能性を示した。それ以外の箇所においてはほぼ全ての CpG がそれぞれメチル化状態または非メチル化状態であった。

22 番染色体上のインプリンティング候補遺伝子の解析

22 番染色体の解析では、マウス A9 雑種細胞は全 700 株のうちヒト 22 番染色体を保持する 8 細胞株が得られた。さらに、これらの親由来を同定するために 22p13 および 22q12.1 領域にある STS マーカー、D22S420 と D22S1144 を用いて多型解析を行ったが親起源の同定に有用な多型は見つからなかった。正確には 22 番染色体を保持するマウス A9 細胞株 13 株の親由来は同定できなかったか、D22S1144 の解析では父、母、子全ての検体において 190bp と 194bp のピークが認められるヘテロであったため、少なくとも父、母いずれかの染色体を保持する細胞株の選別が可能であった。そのうち一つの遺伝子 X の上流に存在する DMR 候補領域

CpG22-02 にアレルを識別可能な SNP (A/G) が認められた。この部分を解析してみると G アレルは一部非メチル化であるのに対し、A アレルは高度にメチル化されていることが明らかになった。9 つのインプリンティング候補遺伝子の発現を解析したところ、遺伝子 X では 4 家系のうち 1 家系で父方優位な発現を、遺伝子 Y では 5 家系のうち 1 家系で母方発現を示した (図 3)。その他の遺伝子はすべて両アレル性発現を示した。

D 考察

HOXA1 遺伝子解析

今回、自閉症の子供をもつ日本人 110 家系で子、母、父の計 321 サンプルについて、この遺伝子解析を行ったが、HOXA1 のエクソン 1 内のヒスチジンリピートに 3 つの変異が見つかった。今回は培養細胞を用いて解析を行ったのだが、培養細胞における DNA の繰り返し配列は不安定性を示すものもある。ハンチントン舞踏病や脆弱 X 症候群などに代表されるトリプレット病での研究では、CAG や CGG などのトリプレットリピートの不安定が報告されている。細胞分裂数や継代数とは関係ないが、臓器特異性を示すといわれていて、リンパ芽球では比較的安定であるという報告もある。今回の解析は培養リンパ芽球を用いて行ったので、このことがリピート数に影響している可能性も考えられた。しかし、本教室で過去に行われた 100 人以上の正常日本人のリンパ芽球での解析では、まったく変異は確認されていない (データは未発表)。また、自閉症児のみの特異的な変異もなく、すべて親から遺伝していることから、培養中において変異をきたした可能性は極めて低いと考えられる。

HOXA1 変異遺伝子をもつ自閉症児 5 人のうち、母親由来か 4 人、父親由来が 1 人であった。さらに、驚くべきことに、親のみが変異している家系が複数見つかった。この場合には父親のみに変異をもつ場合が多く、母親のみの変異は 1 例のみであった。これは、Rodier らによって報告されている HOXA1 の一塩基置換 A218G 変異 (ヒスチジンリピートの中断かおこる) の傾向と一致する。自閉症の症状のない親にのみ変異がある家系があることは、正常日本人では変異がないことから考えると、特異的であり、HOXA1 遺伝子は自閉症の発症に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。親にのみ変異がある場合について、Rodier らは他の遺伝子が自閉症遺伝子を抑制しているのではないかと考察しているが、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

HOXA1 変異マウスの研究によると、この遺伝子は神経管形成期の後脳の細区画化に先立って発現し、菱脳節への分節やパターン化に関わっている。この変異マウスは予定第 4 脳菱節の部分的な分化異常や耳の奇形が起こり、自閉的表現形質をもつことが報告されている。HOX 遺伝子群は胚発生の過程において神経管、脊索、肢芽、消化管などで発現しており、体節形成を制御する核内タンパクをコードする遺伝子である。ヒトでは 4 つのクラスター (A、B、C、D) からなる 39 個の HOX 遺伝子が同定されている。HOX 遺伝子の変異によるヒトの疾患については、HOXA13 の変異による Hand foot genital syndrome、HOXD13 の変異による四肢の奇形が報告されている。興味深いことにこれらの遺伝子変異はアランリピート中にあり、このリピートの延長によって起こる (HOXA13 では 6 リピー

ト、HOXD13では7から14リピート)。また、このリピート数は、他のトリプレットリピート病とは異なり、次の世代に安定に伝わる。リピートの延長した変異タンパクは、ホメオボックスドメインとDNAとの結合が障害され、転写因子としての機能を失うと考えられている。今回の報告ではリピートが短縮するHOXA1変異蛋白で、機能異常を示すことを見出しており、延長とともに短縮も病気のメカニズムに関連する可能性が示された。さらにX連鎖性精神遅滞やてんかんをもついくつかの家系では、終脳などで特異的に発現するホメオボックス遺伝子、ARX遺伝子の変異が報告されているが、この変異もHOXA13やHOXD13と同じくアラニンリピートの延長である。変異ARXタンパクはリピートの延長による構造変化で凝集し、機能異常が起きる。ARX変異遺伝子をもつ患者では、はっきりとした脳の形成異常は認められず、中には自閉症や自閉的傾向をもつ人もいることから、この遺伝子が神経の分化、特に認知能力の発達に関係しているのではないかとされている。これらの遺伝子とHOXA1を比べると、ホメオボックス遺伝子であること、トリヌクレオチドのリピート変化によって発症すること、神経の発生・発達に重要な遺伝子であること、などの共通点があり、今回我々が発見したHOXA1の変異は自閉症の発症機構として注目される。

脳特異的インプリンティング遺伝子単離

今回は国立がんセンターの白石らのヒト正常肺組織を用いた解析から得られたDMRの候補領域を解析した。脳組織においても41箇所のうち46%にあたる19箇所においてDMRが確認されたために、脳に特異的なイ

ンプリンティング遺伝子単離にも利用可能と考えられた。しかしながら、近年脳のみの特異的なインプリンティングを示す遺伝子も発見されてきており、ヒト脳組織からの直接的な研究が必要と考えられる。今回見つかった候補領域からはさらにインプリンティング遺伝子を単離する努力を続ける。

22番染色体上のインプリンティング候補遺伝子の解析

DMR候補領域の中で自閉症などの精神疾患に関連する領域のうちの一つである22番の解析を行ったところ、9のうち2つの遺伝子がインプリンティング遺伝子である可能性が高まった。脆弱X症候群患者では精神遅滞以外に自閉的な症状を呈することも多く、自閉症との関連が注目されている。脆弱X症候群の原因であるFMR1遺伝子は他の多くの遺伝子を制御していると考えられている。そのために、今回明らかになった遺伝子とFMR1遺伝子の関連を研究することか重要である。さらに、自閉症などの検体を用いて解析を進めることにより、自閉症などの研究にも貢献する予定である。

E 結論

- 1 7繰り返しの短いHOXA1遺伝子変異のみならず、11繰り返しの長いHOXA1遺伝子変異を自閉症患者で見出した。
- 2 父または母のみにHOXA1遺伝子変異をもつ自閉症患者家族が明らかになり、今後の検討が必要と考えられた。
- 3 142箇所の differentially methylated region (DMR) の候補から41箇所を解析し、脳に関連するインプリンティング遺伝子が存在する可能性のある領域を19箇所同定した。

4 22 番染色体上では脳に関連するインプリンティング遺伝子 2 個を同定した。

F 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1 論文発表

Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Kohda K, Kato N, Sasaki T An association between the neurofibromatosis-1 (NF1) locus and autism in the Japanese population *Am J Med Genet* (in press)

Maegawa S, Itaba N, Otsuka S, Kamitani H, Watanabe T, Tahimic C G T, Nanba E, Oshimura M Coordinate Downregulation of a Novel Imprinted Transcript *ITUP1* with *PEG3* in Glioma Cell Lines *DNA Research* 11, 2004 ,1-13

Feng JH, Yamamoto T, Nanba E, Ninomiya H, Oka A, Ohno K Novel TSC2 mutations and decreased expression of tuberlin in cultured tumor cells with an insertion mutation *Hum Mutat* 2004 ,23 397

Ueta E, Maekawa M, Morimoto I, Nanba E, Naruse I Sonic hedgehog expression in *Gli3* depressed mouse embryo, *Pdn/Pdn* Congenit Anom Kyoto 2004 ,44 27-32

Marui T, Hashimoto O, Nanba E, Kato C, Tochigi M, Umekage T, Kato N, Sasaki T Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) locus in Japanese subjects with autism *Brain Dev* 2004 ,26 5-7

2 学会発表

大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 ヒト 19 番染色体上の新規インプリンティングトメインの同定とグリオーマ細胞株における DNA メチル化状態の解析 日本分子生物学会 第 3 回春季シンポジウム(米子) 2003 年 5 月 12 日-13 日(火)

大塚晋、前川真治、鷺野伸恵、板場則子、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 DMR を指標としたヒト新規インプリンティングトメインの検索 日本人類遺伝学会第 48 回大会(長崎) 2003 年 10 月 21 日-24 日

鷺野伸恵、板場則子、大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 アレル特異的メチル化を指標としたヒト新規インプリンティングトメインの検索 22 番染色体の解析 第 26 回日本分子生物学会年会(神戸) 2003 年 12 月 10 日-13 日

板場則子、鷺野伸恵、大塚晋、前川真治、白石昌彦、難波栄二、押村光雄 アレル特異的メチル化を指標としたヒト新規インプリンティングトメインの検索 2 番および 5 番染色体の解析 第 26 回日本分子生物学会年会(神戸) 2003 年 12 月 10 日-13 日

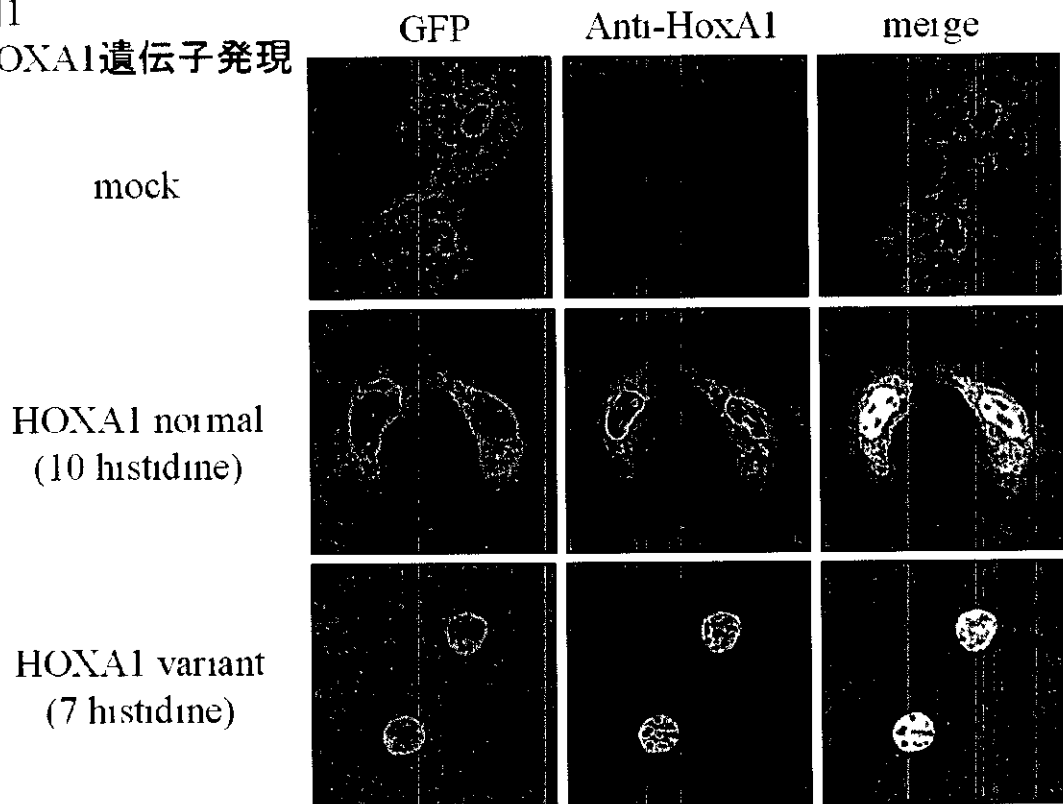
H 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 1 HOXA1遺伝子解析の結果

遺伝子型	ヒスチジンリピート	検体数			計
		子	母	父	
319bp/328bp	7/10	2	2	2	6
328bp/328bp	10/10	105	99	101	305
328bp/331bp	10/11	3	4	2	9
328bp/334bp	10/12	0	0	1	1

図1
HOXA1遺伝子発現



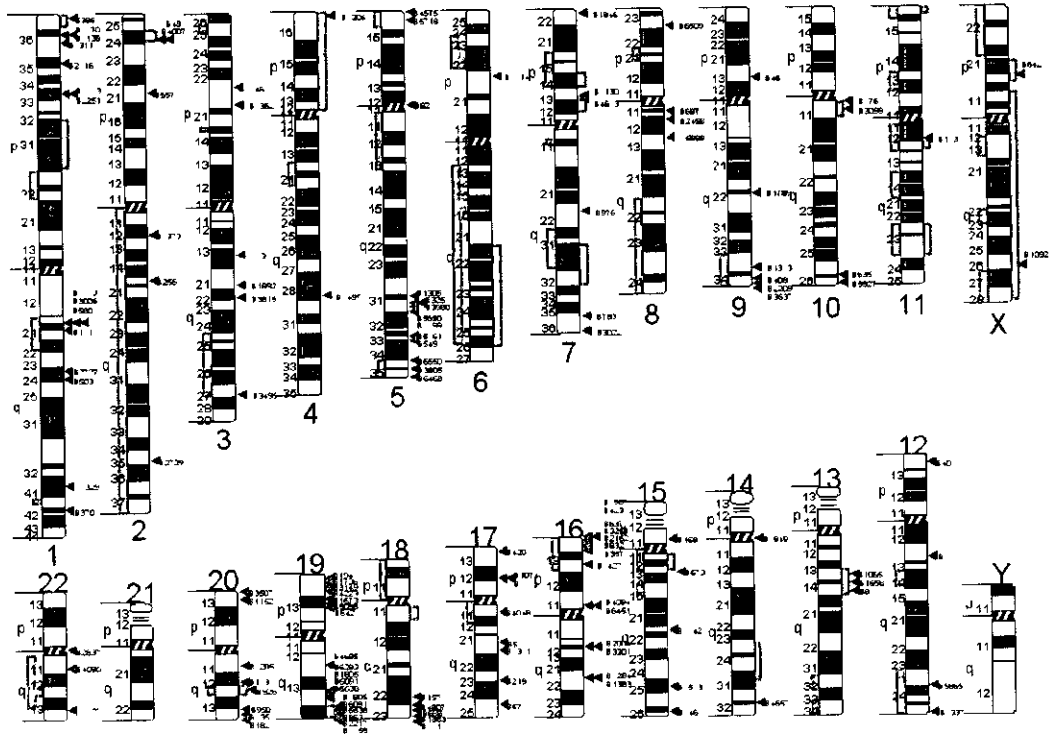


図 2 ヒト染色体上のDMR候補数の位置

◀ はDMR候補領域の位置、 ≡ は既知のインプリンティングドメイン
 ≡ は自閉症感受性領域、 ≡ は統合失調症感受性領域を示す。

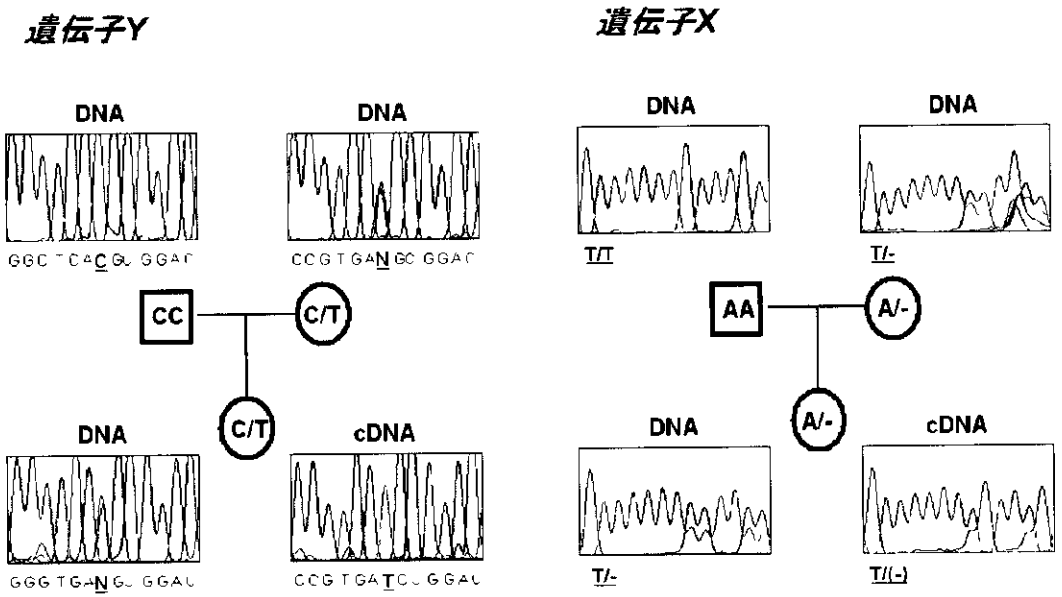


図 3 インプリンティング候補遺伝子のヒトリンパ芽球での発現解析