

厚生労働科学研究研究費補助金  
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  
—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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤進昌

平成17年3月

厚生労働科学研究研究費補助金  
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  
—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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 加藤進昌

平成17年3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. 自閉症の関連遺伝子探索に関する研究 ..... 5  
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 ..... 7  
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 ..... 22  
—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及び研究への理解の促進に関する検討  
金生 由紀子 北里大学大学院医療系研究科 ..... 28
5. 自閉症モデル動物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 ..... 30
6. 新生児マスキリーニングのTSHおよびFT4値と広汎性発達障害(その2)  
—横浜市の療育センターでの共同調査—  
原 仁 横浜市中部療育研究センター  
立花 克彦 神奈川県立こども医療センター  
朝倉 由美 神奈川県立こども医療センター ..... 32

### Ⅲ. 協力研究報告

7. 2q染色体領域を中心とした自閉症障害に対する遺伝子解析研究	37
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. 非侵襲脳計測を用いた広汎性発達障害の脳病態研究	45
笠井 清登 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	51
-------------------	----

# I . 総括研究報告

## 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ものである。この場合、複数施設は互いに有機的に連携して、臨床基礎を問わず、検体やデータを共有して目標達成を目指すこととしている。児童精神科の大学施設としては歴史的にみて最右翼といえる東京大学と東海大学のほかに、協力施設として三重県立小児診療センター・あいち小児保健医療総合センターを擁している本研究チームは、自閉症例を集める研究チームとしては、わが国最大の規模をこの3年間で備えるに至ったものと自負している。さらに下記のような公開シンポジウム開催や、研究紹介のパンフレット配布などを通じて、日本自閉症協会その他、家族や当事者の団体との連携にも成功しつつあり、わが国で自閉症の生物学的研究を推進する土台作りに大きな一歩を踏み出したものと考えられる。

具体的には、1)分子遺伝研究では、既知の候補遺伝子やゲノムインプリンティング遺伝子の解析や三塩基リピート数の解析を行ってきた。残念ながら、自閉症特異的な遺伝子の検出には至っていないが、相関が示唆されたいくつかの遺伝子については、さらに数を増やして検索中である。2)脳画像による認知機能の研究では、構造的MRI、近赤外線スペクトロスコピー(NIRS)、事象関連電位(ERP)、脳磁図(MEG)を用いた多角的なマルチモダリティ解析を高機能自閉症を主な対象として解析を行っている。特に、遺伝要因の寄与によるフェノタイプの相違をとらえる為に一卵性双生児での不完全一致例や同胞健常児者との比較などに着目している。まだ症例数を増やしている段階ではあるが、社会性やコミュニケーションにかかわる脳部位のネットワークに障害があるという予備的結果を得ている。3)胎内環境要因の研究では、後向き調査として自閉症児の新生児甲状腺機能と環境ホルモン量の調査を、新生児スクリーニング検査結果の参照と臍の緒からの抽出・測定法開発によって可能とした。予備的ではあるが、新生児TSHとIQが逆相関するとの結果を得ている。さらに乳歯中の水銀・鉛などの重金属測定を行っている。前向き調査として都内と北海道の産科で出生した児の臍帯血中環境ホルモン量とTSH/T4値が精神発達にどのように関連するかを検討を開始した。また動物モデルとして授乳期の低甲状腺状態による多動・学習障害モデルにおける小脳遺伝子発現の遅れを見出した。

### 分担研究者

佐々木 司

東京大学保健管理センター 助教授

難波 栄二

鳥取大学生命機能研究支援センター 教授

松本 英夫

東海大学医学部精神科学部門 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

原 仁

横浜市中部地域療育センター 所長

## A. 研究の実施経過

本年度は研究への理解を求めたパンフレットや、種々の啓蒙活動などの過去2年間の成果をもとに、生物学的研究を進める土壌形成の努力をさらに進めた。その結果1)三重県立小児心療センターについては同胞発症例や、双生児例のほぼ全ての家系についてデータを収集した。2)あいち小児保健医療総合センターでは、家族内多発症例についてまずデータを得た。3)その上で添付パンフレットにあるような公開シンポジウム「自閉症の原因を探る一よりよい治療への手がかりを求めて」を開催した。1000名弱の参加者があり、その約半数は家族または当事者であった。参加者へのアンケート結果の解析により、圧倒的多数が研究の重要性について肯定的な回答をしており、特に遺伝子研究が重要と90%以上の家族が答えているのが印象的であった。また、研究協力を申し出て頂いた家族・当事者も100名を超え、今後生物学的研究を家族・当事者とおもに進めていく大きな足がかりを得たと考えている。

### 1) 自閉症の遺伝子解析の研究:

自閉症家系検体(110家系、リンパ芽球様細胞株213株)を用い、自閉症の発症に関与する遺伝子の検索を行った。これらの検体よりDNAおよびRNAを抽出し、1)自閉症候補遺伝子のSNPs解析、2)既知のゲノムインプリンティング遺伝子などの遺伝子発現量の解析、3)cDNAマイクロアレイ解析、4)FMR1遺伝子におけるCGGリピート数の解析、5)ホメオボックス(HOX)遺伝子群に存在する3塩基リピート数の解析を行った。また、6)正常ヒト脳組織における differentially methylated region (DMR) に着目し、自閉症感受性領域より新規のゲノムインプリンティング遺伝子の検索を試みた。これらの解析の結果、1)13遺伝子を解析したが正常コントロールとの差異は認められなかった。ただし、7q領域の複数の遺伝子では相関が示唆され、さらに詳細を解析中である。2)DLX5においてインプリンティングの消去(LOI)が認められた。3)2家系間で比較したが共通して発現量に差のある遺伝子は同定できなかった。4)FMR1におけるCGGリピートの異常伸長は認められなかった。5)HOXA群やD群において自閉症患者特異

的なリピート延長を観察した。6)また2番、7番染色体上の新規インプリンティング遺伝子の同定には至らなかった。

### 2) 脳画像による自閉症の認知機能の研究:

i) MRI研究では、広汎性発達障害者9名と健常者81名の比較により、前頭前野、紡錘状回、扁桃体、上側頭回で広汎性発達障害者の方が有意に灰白質体積が小さかった。一卵性双生児一致例1組の共通点・相違点を検討すると、前頭前野、紡錘状回、上側頭回の体積減少は共通であったが、扁桃体の体積減少は抑うつ症状を伴った片方のみ存在した。ii) NIRS研究では、語流暢性課題施行時に、広汎性発達障害者10名において、健常者10名に比べて著明な酸素化ヘモグロビン変化量の減少を認めた。iii) ERP研究では、広汎性発達障害者16名において、健常者14名に比して有意な空間性注意に関連する頭頂部の異常な電位活動がみられた。iv) MEG研究では、広汎性発達障害者9名において、健常者19名に比して有意なMMFの減衰を認めた。この減衰は、音刺激として音素刺激(日本語母音)を用いたときの方が、純音刺激を用いたときに比べて顕著であった。以上から広汎性発達障害者においては、社会性やコミュニケーションにかかわる脳部位のネットワーク障害が存在することが明らかとなった。現在さらに症例を増やして検討中である。

### 3) 自閉症発症に及ぼす胎内環境要因の研究:

i) PDDと診断されたため横浜市内の5箇所地域療育センターの知的障害児通園施設に措置されていて神奈川県内の医療機関で出生した児の新生児マススクリーニング検査結果を調査した。IQ(DQ)とTSH値とFT4値との相関を求めたところ、知能段階とTSH値とは弱い逆相関を示した( $r=-0.201, p=0.0420$ )。すなわち、知能が低いほどTSH値は高かった。これは甲状腺機能異常をきたさないレベルでの変化であり、直ちに自閉症の成因に繋がるものではないが、今後より軽症・非定型例やアスペルガー症候群を対象を広げて、検討していく手がかりを得たものと考えられる。ii) 胎内環境を反映する試料として自閉症とその健常兄弟例より臍の緒の提供を受け、PCB濃度を測

定した。測定方法が高価、かつ時間を要する為、まだ自閉症11例、健常児11例にとどまっているが、現在のところ有意差を認めていない。iii) NTT東日本関東病院において、全出生児から臍の緒と臍帯血の提供を受け、PCBや水銀などの環境化学物質濃度を測定する。同時に血中T4、TSHを測定し、児の精神発達をフォローしていくという前向き研究について倫理委員会の承認を受けて開始した。iv) 自閉症動物モデルとして新生児低甲状腺機能ラットについてさらに解析を深めた。その結果、小脳で発達過程に特異的に発現する遺伝子群(FGF,Wnt,DBHなど)の発現が遅れ、セロトニンニューロンの形成も遅れていることが明らかとなった。

## B. 今後の活用・提供

研究に対する偽りのない社会的理解の形成のために、まず当事者・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ことを目指した。当事者・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からである。とりわけわが国においては、研究至上主義に対する批判がややもすると極端に走り、臨床研究を提示することすら躊躇する雰囲気強く、児童精神医学の世界での研究面の遅れは著しいものがあつた。生物学的研究に際しては、倫理的側面を最大限に配慮した上で、研究の意義を正しく伝えることが何よりも重要である。とりわけ遺伝子の研究については何がわかっているか、遺伝とはどういうことかを正確に伝え、根拠のない不安を除去しなければならない。

その意味で、平成16年11月に開催した公開シンポジウム「自閉症の原因を探る—よりよい治療への手がかりを求めて—」は1000名弱の家族・当事者・療育関係者を集めて、特に遺伝子研究の重要性を伝える機会として画期的なものであつた。シンポジウムでは本研究チームの成果を紹介するとともに、D.Pauls教授(ハーバード大学)から自閉症の遺伝子研究の世界における趨勢を紹介して頂いた。会場から自閉症に遺伝子が関与する

ことを初めて聞いたという反応があり、いかにわが国の児童精神医学界がこの問題を避けていたかが如実に示された。同教授には同時期に開催された日本児童精神医学会での特別講演もお願いしたが、同学会で遺伝関係の演題が発表されたのは、近年ではまさに初めてとのことで、このような機会が学会を変えていく端緒に成り得たと考えている。



## II. 分担研究報告

## 自閉症の関連遺伝子探索に関する研究

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:本研究は、自閉症発症の関連遺伝子をヒトの DNA 試料を用いて探索すること、またその基盤作りとして当事者・ご家族・一般国民に自閉症疫学の正しい認識に基づく研究への理解を深めて頂くことを目的とするものである。H16 年度は、地域での講演会とともに一般向け公開講座において、単一遺伝子疾患との違いを含め複雑疾患としての自閉症の特徴と遺伝子研究の役割について詳しい説明を行った。この結果予想外に多くの方々からご支持をいただき、このような活動を通じた研究基盤構築の重要性が示唆された。このような理解を支えに三重・愛知の療育施設の協力を得て、本年度は 50 以上の家族から研究協力が得られた。遺伝子の解析については 7q, 15q などの候補染色体領域の遺伝子、TSC など高頻度合併疾患の遺伝子を中心に解析を続け、本年度は 7q 領域の神経発達遺伝子の一部と自閉症との相関を示唆する結果が得られた。今後さらに、広報活動・ご家族のリクルートとともに、詳細な検討を続ける予定である。

### A. 研究目的

自閉症発病には複数の遺伝子の組み合わせからなる遺伝的要因が極めて強く作用するが、わが国ではこれら遺伝子の解明にはほとんど取り組まれてこなかった。本研究は、わが国では数少ない自閉症の分子遺伝研究機関がチームを組み、地域療養施設と連携して関連遺伝子を解明すること、同時に、自閉症の疫学と遺伝子研究について当事者ご家族に正しい認識を頂き、今後の研究の発展基盤を築くことを目的とした研究である。

### B. 研究方法

疫学と研究への理解を深めて頂く活動は、H15 までの冊子の作成・配布とそれを用いた東大病院等での活動経験をもとに、三重・愛知などの各地域に活動の場を広げた。すなわち地域療育施設と家族会の協力のもと、各地

域で講演会とリクルート活動を進めた。また H16 末には一般向け公開講座にて講演を行った。遺伝子の解析は、7q, 15q などの候補染色体領域の神経発達関連遺伝子と高頻度合併疾患の遺伝子を中心に、各遺伝子で複数の SNP を用いて相関解析 (case-control および TDT) を行った。7q 領域では *RELN*、*NRCAM*、*FOXP2*、*WNT2*、*PTPRZ1*、*LAMB1&4*、*ST7*等を、15q 領域では 15q11-13 の maternal expression domain (*UBE3A*、*ATP10A* を含む)と *GABR-B3*、*-A5*、*-G3*等を、高頻度合併疾患では *TSC1&2*、*FMR1* を解析した。SNP の解析には ABI Prism7900HT を用いた。

### C. 結果と考察

講演会・公開講座には多くの当事者ご家族に参加頂き、予想外に多くの方々から研究を理

解・支持するご意見をいただいた(詳細は金生の報告参照)。当事者・ご家族のリクルートと遺伝子の解析は続行中である。遺伝子の解析では、7q領域の複数の遺伝子で相関を示唆する結果が得られており、現在さらに詳しく解析中である。

D. 発表論文

Marui T 他. Neurosci Res (submitted).

Marui T 他. Am J Med Genet, 2004, 131, 43-47.

Marui T 他. Brain Dev, 2004, 26: 5-7.

湊崇暢、佐々木司. 分子精神医学, 2004, 4, 280-5.

## 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: 我々は東海大学、東京大学と共同で自閉症の遺伝的背景の解析を行っている。自閉症家系検体(110 家系、リンパ芽球様細胞株 213 株)を用い、自閉症の発症に関与する遺伝子の検索を行った。これら検体より DNA および RNA を抽出し、1) 自閉症候補遺伝子の SNPs 解析、2) 既知のゲノムインプリンティング遺伝子などの遺伝子発現量の解析、3) cDNA マイクロアレイ解析、4) *FMRI* 遺伝子における CGG リピート数の解析、5) ホメオボックス(HOX)遺伝子群に存在する 3 塩基リピート数の解析を行った。6) また、正常ヒト脳組織における differentially methylated region (DMR) に着目し、自閉症感受性領域より新規のゲノムインプリンティング遺伝子の検索を試みた。これら解析の結果、1) 13 遺伝子を解析したが正常コントロールとの差異は認められなかった。2) *DLX5* においてインプリンティングの消去(LOI)が認められた。3) 2 家系間で比較したが共通して発現量に差のある遺伝子は同定できなかった。4) *FMRI* における CGG リピートの異常伸長は認められなかった。5) HOXA 群や D 群において自閉症患者特異的なリピート延長を観察した。6) また 2 番、7 番染色体上の新規インプリンティング遺伝子の同定には至らなかった。いずれの実験においても解析検体数を増やし、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

### A. 研究目的

自閉症に関連する遺伝子の同定を目的とし研究を行った。我々は昨年までに、homeo box A1 (*HOXA1*)遺伝子内にヒスチジン繰り返し配列の多型を見出している。これまで自閉症家系特異的であることを疑っていたが、本年度、東京大学の正常コントロールにおいてもリピート数の延長を認めた。トリプレットリピート数がタンパクの局在などにかかわり下流に働く遺伝子群になんらかの影響を与えているのではないかと考え、本年度はさらに他の HOX 遺伝子ファミリーのリピート数解析を行った。

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。昨年度までに我々はアレル間で異なるメチル化状態を示すゲノム領域で、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 differentially methylated region (DMR) に注目

し 41 個所の CpG アイランドの解析を行いインプリンティング様の発現様式を呈する数種の遺伝子の同定に成功した。本年度は、これまでの連鎖解析により自閉症候補領域とされている染色体領域のうちヒト 2 番および 7 番染色体に着目し DMR の検索を行った。

さらに自閉症の遺伝的背景を解明すべく自閉症候補遺伝子群の SNPs 解析を行った。また自閉症は一卵性双生児において症状不一致例が存在するなど、遺伝子の変異のみでは病因の説明が困難な疾患である。よってジェネティックな遺伝子変異のみならずエピジェネティック変異に関しても着目し解析を進めた。既知のゲノムインプリンティング遺伝子の発現様式の解析、*HOXA1* 遺伝子等の発現量および発現状態の解析、さらには cDNA マイクロアレイ解析により遺伝子発現異常の検討を行った。

## B. 研究方法

東海大学において樹立された自閉症の子供をもつ110家系のリンパ芽球様細胞株(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)より樹立した芽球化細胞株を培養し、DNAおよびRNAを抽出した。また、東京大学および鳥取大学で樹立した正常ヒトリンパ芽球様細胞株(368検体)を正常コントロールとして用いた。正常ヒト脳組織は脳腫瘍患者より摘出した非がん部を用いた。

### HOX 遺伝子群リピート解析

まずNCBIデータベースよりHOX遺伝子群のうちトリプレットリピートを有する遺伝子を検索した。一箇所以上リピートが存在した *HOXA1*、*HOXA2*、*HOXA10*、*HOXA11*、*HOXA13*、*HOXD4*、*HOXD8*、*HOXD9*、*HOXD11* および *HOXD13* に存在するヒスチジン、アラニン、グリシンなどのリピート数の解析を行った。(図1)

#### 1) PCR

PCR溶液は、10 $\mu$ 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, 各遺伝子のアニーリング温度 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min)のサイクルを35回繰り返す、最後に72 $^{\circ}$ C 5minで加熱する条件で行った。PCR産物はアガロースゲル(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( $\phi$ 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 $\mu$ lに変性剤8 $\mu$ lを加え、95 $^{\circ}$ Cで5minの熱変性処理をした後氷中で急冷却し、その5 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ lにT-vector 0.5 $\mu$ l、2 $\times$ ligation buffer 4 $\mu$ l、T<sub>4</sub> ligase 1 $\mu$ lを加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。このサンプル2 $\mu$ lに氷中で融解させたCompetent cell 25 $\mu$ lを加え、氷中で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S.O.C 500 $\mu$ lを加えて37 $^{\circ}$ Cで60min保温した後、X-gal 50 $\mu$ l、IPTG 5 $\mu$ l、S.O.C 45 $\mu$ lを塗布したLB-Amp Plateに200 $\mu$ l、300 $\mu$ 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をもつ白のシングルコロニーを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 $\Sigma$ (Kurabo)によりプラスミドを抽出した。このプラスミドに100 $\mu$ lのTE-Rnase (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA Na2, 50 $\mu$ g/ml RNase)を加え、37 $^{\circ}$ C、100rpmで振とうしながら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 $\mu$ lをマルチスクリーンPCRプレート(Millipore)に移し、マルチスクリーンバキュームマニホールド(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  $\mu$ 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  $\mu$ l の TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA Na<sub>2</sub>)を加え、5min シェーカーで攪拌し (100rpm)、溶出した DNA を 4°C で保存した。

#### 5) プラスミドのシークエンシング

シークエンス反応液には、10  $\mu$ l 中に Terminator Ready Mix 4  $\mu$ l、精製プラスミド 1  $\mu$ 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°C 30sec、50°C 15sec、60°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)でそのシークエンスを解析した。

#### 自閉症患者における *FMRI* 遺伝子の CGG リピート数の解析

精神遅滞、注意障害を主徴とする脆弱 X 症候群の原因遺伝子である *FMRI* 遺伝子のエクソン 1 に存在するトリプレットリピートの伸長の有無を検討した。正常では 6 から 50 の繰り返し回数であるが、保因者では 200 まで伸長が認められ、200 以上の伸長により発症に至る。HOX 遺伝子群の解析と同様に PCR によりリピート領域を増幅し、産物を ALFred DNA Sequencer を用い泳動し解析を行った。

#### 脳特異的インプリンティング遺伝子の単離

##### 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) に変化するが、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 NaHSO<sub>3</sub>, 0.6mM HQ (4.04M NaHSO<sub>3</sub>, 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  $\mu$ l となるよう MQ 水を 4.65  $\mu$ l、dNTPs を 1.25  $\mu$ l、10  $\times$  buffer (各 2mM)を 1.0  $\mu$ l、プライマー (10  $\mu$ M)を各 1.0  $\mu$ l、Ampli Taq Gold (Roche)を 0.1  $\mu$ l にゲノム DNA (50ng/ $\mu$ l) 1.0  $\mu$ l を加えた。これを PCR 法 (95°C で 10 分間 denature した後、95°C 30 秒、プライマーに応じたアニーリング温度で 30 秒、72°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°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クエンス解析

PCR 産物の電気泳動は 2%のアガロースゲルで行い、エチジウムブロマイドにより染色を行った。PCR 産物の精製には QIA quick Gel extraction kit (QIAGEN) または Multiscreen-PCR (Millipore)を用いた。シークエンス反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Ver.3.0 (Applied Biosystems)を用いて 96°C 30 秒、50°C 10 秒、60°C 4 分 (25 サイクル)で行い、シークエンス解析は 3100 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems)で行った。

#### SNP 解析

*HOXA3*、*HOXA4*、*HOXA10*、*HOXC10*、*HOXD8*、*HOXE5*、transcription factor 7 like 1 (*TCF7L1*)、solute carrier family (*SCL25A12*)、sodium channel (*SCN2A2*)に存在する SNP を NCBI データベースより選択し、自閉症家系検体 DNA を鋳型とし PCR の後、SSCP、WAVE およびシーケンス解析を行った。確定した条件で自閉症患者と正常ヒトコントロール群を各 30 検体ずつ用いて初期解析を行った後、このうち *SCL25A12* の 2 箇所、*TCF7L1* の各 1 箇所の SNP を用い解析数を増加し genotype frequency と allele frequency、transmission disequilibrium test (TDT)解析を行った。

#### DLX5の発現様式の検索

最近レット症候群の原因遺伝子である MeCP2 の下流に働く遺伝子として、母方特異的発現様式を示すインプリンティング遺伝子 distal-less homeobox (*DLX5*)が明らかとなった。レット症候群患者リンパ芽球細胞株ではインプリンティングの消去 (LOI) が生じており GABA の過剰産生が想定される。我々は自閉症リンパ芽球細胞株における *DLX5* 遺伝子の RT-PCR による発現解析を行った。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°C 45 秒、58°C 30 秒、72°C 1 分 30 秒を 36 サイクル、最後に 72°C で 5 分とした。

#### DLX2のトリプレットリピート数の解析

DLX ファミリーはクラスターを形成し 2、7、17 番染色体にそれぞれ tail to tail に位置し存在している。これら 3 染色体領域はいずれも自閉症感受性領域との報告がある。従ってこれら DLX ファミリーが自閉症発症になんらかの役割を担うことが想像できる。我々は *DLX2* に存在するグリシンとヒスチジンリピートに着目し自閉症におけるリピート数の解析を行った。HOX 遺伝子群、*FMR1* 遺伝子のトリプレットリピート長解析と同様に PCR 産物を ALFRed で泳動し解析を行った。

#### DLX ファミリーのインプリンティング解析

近年がんセンター白石らが MBD カラムクロマトグラフィーを用い DMR 候補領域を約 140 箇所同定した。その中に *DLX4* の CpG アイランドも含まれていた。よって我々は *DLX5* のみならずファミリーでゲノムインプリンティングを受ける可能性を考え、ヒトリンパ芽球細胞株、正常能組織およびヒト染色体を保持するマウス A9 雑種細胞株における DNA メチル化状態の解析および発現解析を行った。

#### HOXA1 遺伝子の発現量解析

自閉症との関連が考えられる *HOXA1* 遺伝子の発現量の解析をリアルタイム PCR 法により行った。また、*HOXA1* が片アレル性発現を呈する事を想定した場合、正常コントロールにおいてもリピート延長型が存在しうる。よってリピート数に多型が認められる自閉症家系 11 検体において RT-PCR 後 ALFRed で泳動し発現様式の解析を行った。

#### cDNA マイクロアレイ解析

自閉症家系検体 2 例において患者と父親間および患者と母親間で cDNA マイクロアレイ解析を行った。

(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 日文科科学省・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

#### HOX 遺伝子群リピート解析

自閉症患者における各遺伝子のリピート数の検索を行い 12 領域のうち *HOXA1*、*HOXA2*、*HOXD8*、*HOXD11* および *HOXD13* において主に自閉症患者検体においてリピート数の短縮と延長を認めた。(表 1、2)

#### *FMRI* 遺伝子の CGG リピート数の解析

自閉症家系検体と正常ヒトコントロール群とを比較し顕著な差は認められず、異常に伸長した CGG 繰り返し配列は存在しなかった。ほとんどの検体が 26 から 28 リピートを持ち、やや伸長した 32、33 リピート近辺に第二のピークを認めた。(表 3、図 2)

#### SNP 解析

解析を行った 3 遺伝子の計 4 つの SNP は全て自閉症との関連は認められなかった。(表 4-8、図 3)

#### *DLX5* の発現様式の検索

自閉症患者において *DLX5* の親由来発現解析が可能な検体は 37 検体中 10 検体であった。そのうち 3 検体において遺伝子発現を認め、1 検体においてレット症候群同様に *DLX5* の両アレル性遺伝子発現を呈していた。さらに興味深いことに 2 検体については父親由来アレルの発現を認めた。(図 4)

#### *DLX2* のトリプレットリピート数の解析

ヒスチジンリピートおよびグリシンリピートをそれぞれ自閉症 102、104 検体について検索した

がリピートの増幅は認められずいずれも 7 リピートであった。(図 5、表 9)

#### DLX ファミリーの刷り込み解析

各遺伝子の上流域に存在する CpG アイランドの DNA メチル化状態を検索したがヒト正常繊維芽細胞株および正常ヒト脳組織において全ての遺伝子の CpG アイランドはいずれも低メチル化状態にあった。ヒト染色体を保持するマウス雑種細胞では *DLX4*、*DLX6* においてそれぞれ父方、母方特異的なメチル化を認めた。また、*DLX1*、*DLX2*、*DLX3* および *DLX4* のヒトリンパ芽球および脳組織での発現様式は一部検体において片アレル優位な発現様式を示した。(図 6、表 10)

#### *HOXA1* 遺伝子の発現量解析

リアルタイム PCR 解析の結果自閉症患者と正常コントロール群で顕著な発現量の差は認められなかった。さらにリピート長がヘテロであった検体の RT-PCR と ALFRed 解析を行い、自閉症の親検体(父親 2 検体)において片アレル性発現様式を認めた。

#### cDNA マイクロアレイ解析

患者と父親または母親間で共通して発現量に増減の認められる遺伝子がそれぞれ約 50 認められたが 2 家系間で共通して発現量に差の認められる遺伝子は存在しなかった。(表 11)

#### 2、7 番染色体に存在する脳特異的インプリンティング候補遺伝子の検索

2q24 - q32 領域に存在する T-box brain (*TBR1*)、glutamate decarboxylase (*GAD1*)、*SLC25A12*、methionine aminopeptidase (*MAP1D*)、integrin alpha (*ITGA6*) および *HOXD1* の脳組織における DNA メチル化はいずれも低メチル状態にあった。また、7q22 - q31 領域に位置する component of oligomeric golgi complex (*COG5*)、B-cell receptor-associated protein (*BCAP29*)、



*SLC26A4*, laminin beta (*LAMB1*), intracellular membrane associated calcium-independent phospholipase (*IPLA2*), THAP domain containing (*THAP5*), dedicator of cytokinesis (*DOCK4*), interferon-related developmental regulator (*IFRD1*)および wingless-type MMTV integration site family (*WNT2*)の CpG アイランドについても全て非メチル化状態であった。今回検索した遺伝子に関しては脳組織において DMR 様の結果は得られなかった。(図7)

#### D. 考察

##### HOX 遺伝子群リピート解析

今回 *HOXA1* 以外に新たに *HOXA2*, *HOXD8*, *HOXD11* および *HOXD13* においてリピート数の多型を同定した。これらの多型が自閉症発症に関連することを疑い今後検体数を増やし解析していく予定である。また、コントロール群と比較し有意な差が認められれば各リピート数を持つ遺伝子を細胞に導入し細胞発現実験を行いタンパク質の局在を検討することを考えている。

##### FMRI 遺伝子の CGG リピート数の解析

脆弱 X 症候群の約 20%が小児期には自閉症と診断される。本研究においては自閉症検体、正常検体ともに特にリピートの伸長が存在した検体は認められなかった。脆弱 X 症候群では CGG リピートの伸長することにより生じる DNA メチル化の亢進が遺伝子発現の低下をもたらすと考えられているが、今後リピート伸長を認めなかった検体において DNA メチル化状態の検索を行う必要がある。*FMRI* 遺伝子は他の多くの遺伝子を制御していると考えられるため、今後、自閉症との関連が疑われる遺伝子と *FMRI* 遺伝子のリピート数との関連などに着目し研究することが重要である。

##### SNP 解析

フルゲノムでの解析は莫大な時間、労力と費

用がかかるため、候補遺伝子に着目した解析が有効であると考えられる。環境要因によるエピジェネティックな遺伝子発現異常の解析と同時に今後も遺伝的解析も継続して行っていくことが求められる。

##### DLX5の発現様式の検索

自閉症1検体において *DLX5* の LOI が認められた。片アレル性発現を維持していた検体についても通常は母方発現であるのにもかかわらず父方発現を呈していた。これらが自閉症特異的な現象であるのか否か解析検体数を増やし検索する必要がある。MeCP2 は DNA のメチル化領域特異的に結合する機能を有することが知られてきたがレット症候群で報告されたようにクロマチンのループ構造の維持にも重要な役割を果たす。*DLX5* は MeCP2 によりアレル性の発現様式を維持していることから今後 MeCP2 遺伝子の異常にも着目し自閉症検体での変異解析を行う。また、これまでの研究により明らかになっている他の MeCP2 結合領域周辺の遺伝子についても発現量の検討を行う。

##### DLX2のトリプレットリピート数の解析

ヒスチジン、グリシンともに自閉症検体ではリピート数の増減を認めなかったため、自閉症と関連する可能性は低いものと考えられる。

##### DLX ファミリーの刷り込み解析

脳組織においては片アレル特異的なインプリンティング様の発現様式を呈した検体が存在した。これらは個体差か脳組織サンプルの抽出部位の違いによるものかどうか定かではない。また少なくとも脳組織においてはその制御に DNA のメチル化が介在する可能性は低い。今後リンパ芽球において認められた片アレル性の発現様式が個体差であるのか遺伝子の検出方法によるものであるのかを明らかにしていくと同時にリンパ球での DNA メチル化解析が必要である。

#### HOXA1 遺伝子の発現様式と発現量の解析

ほとんどの患者とその父母では両アレル性発現を呈していたが興味深いことに自閉症の父親検体の 2 例において片アレル性の発現を観察した。よって胎生初期における HOXA1 のアレル性発現が正常な脳形成に重要である可能性が考えられる。今後正常検体での遺伝子発現様式の解析が必要である。遺伝子の発現量は正常コントロールとほぼ同等であったが HOXA1 遺伝子のリンパ芽球における発現は非常に低く検出限界であるのかの検討が必要である。

#### cDNA マイクロアレイ解析

患者、親間での比較には各個体の年齢や性別などが異なる場合には限界がある。今後一卵性双生児の症状不一致例におけるマイクロアレイ解析が有効な指標となるものと考えられる。また家系数を増やし解析し、数家系において共通し発現量の増減を認める遺伝子の同定を試みる予定である。さらに近年リンパ球の芽球化による細胞培養により DNA のメチル化を異常にさせるとの報告もあるため、今後研究資料としての検体の選択も含めた検討が必要であろう。

#### 2、7 番染色体に存在する脳特異的インプリンティング候補遺伝子の検索

現在さらに解析する遺伝子領域数を増やし順次 CpG アイランドのメチル化の解析を行っている。また今回 DNA メチル化解析を行いプロモーター領域には DMR は存在しないとの結果を得た遺伝子の中にはメチル化によりインプリンティング制御を受けない遺伝子も含まれる可能性が考えられる。

#### E. 結論

1. HOXA1, HOXA2, HOXD8, HOXD11 および HOXD13 においてリピート数の多型を認め、自閉症と関連する可能性を見出した。
2. FMRI における CGG リピートの異常伸長は認められなかった。
3. SNP 解析を 3 遺伝子の 4 箇所 SNP に関して行ったが自閉症との関連は認められなかった。
4. DLX5 においてインプリンティングの消去 (LOI) を認めた。
5. 自閉症における DLX2 のヒスチジン、グリシンリピートの異常伸長は認められなかった。
6. DLX ファミリーはインプリンティング様の発現様式を呈する可能性が考えられた。
7. HOXA1 はインプリンティングを受けられる可能性が考えられる。またその発現量は対照群と比べて顕著な差は認められなかった。
8. cDNA マイクロアレイ解析では 2 家系間で比較したが共通して発現量に差のある遺伝子は同定できなかった。
9. 2 番、7 番染色体上の新規インプリンティング遺伝子の同定には至らなかった。

#### F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Maegawa S, Itaba N, Otsuka S, Kamitani H, Watanabe T, Tahimic CG, Nanba E, Oshimura M. Coordinate downregulation of a novel imprinted transcript ITUP1 with PEG3 in glioma cell lines. *DNA Res* 11:37-49, 2004

Hirota T, Ieiri I, Takane H, Maegawa S, Hosokawa M, Kobayashi K, Chiba K, Nanba E, Oshimura M, Sato T, Higuchi S, Otsubo K. Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status. *Hum Mol Genet* 13, 2959-2969, 2004.

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* 131B, 43-47, 2004.

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(4):397

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* 26, 5-7, 2004.

### 2. 学会発表

大塚晋、前川真治、紙谷秀規、渡辺高志、白

石昌彦、難波栄二、押村光雄 ヒト19番染色体上に存在するゲノムインプリンティング遺伝子のグリオーマ患者脳組織における発現解析 第27回日本分子生物学会年会(神戸) 2004年12月8日-11日

パラギソン ルビギルダ、難波栄二 自閉症の関連する可能性のあるHOX遺伝子変異の発現解析 第46回日本小児神経学会 2004年7月15日-17日 新高輪プリンスホテル国際館パミール(東京)

Eiji Nanba

Molecular genetics of autism: basic and clinical perspectives. *Biology of autism: Current research and future perspectives of the research in Japan (symposium)*. 16<sup>th</sup> World Congress of the International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions (IACAPAP) 22-26 August 2004, Berlin Germany

延正紅、坂本裕美子、難波栄二、山本兼司、松本英夫、佐々木司、加藤進昌 日本人自閉症におけるFMR1およびHOXA1遺伝子の解析 第12回日本精神・行動遺伝医学学会 2004年10月16日 帝京大学(東京)

坂本裕美子、延正紅、難波栄二、山本兼司、松本英夫、佐々木司、加藤進昌 日本人自閉症におけるHOXA1およびFMR1遺伝子の解析 第28回日本小児遺伝学会 2004年10月16日 東京女子医科大学

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

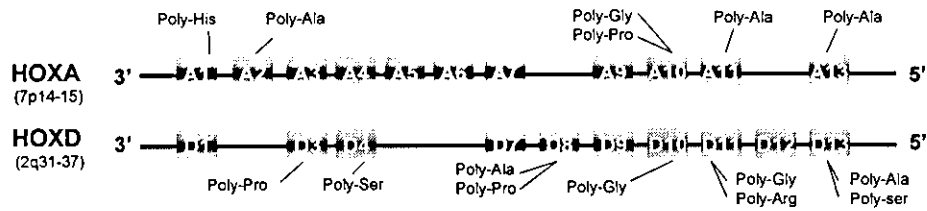


図1 トリプレットリピート配列を持つHOX遺伝子群

表1 HOXファミリーにおけるリピート数の解析

遺伝子	リピート	多型 (解析数)
HOXA1	-HHHHHHHHHH-	+ (110)
HOXA2	-AAAAAATAAA-	+ (32)
HOXA10	-GGGGGGAGGGGGG-	- (30)
	-PPPPQQQPPPPQPPQAP-	- (32)
HOXA11	-AAAAAA...GGGG...AAAA...RRRR...SSSS-	- (32)
HOXA13	-AAAAAAAAAAAAAAAA-	- (31)
HOXD4	-SSSSSSSSSCSSS-	- (27)
HOXD8	-AAAAAAAA-	+ (24)
	-AAAAA...PPPPHPPPPPPPP-	- (31)
HOXD9	-GGGGGGGGG-	- (27)
HOXD11	-GGGPGGGGGAGG...AAAAAAAAAAAA-	+ (28)
HOXD13	-AAAAAAAAAAAAAAAA...SSSSSSS-	+ (27)

図1 B  
HOXA1遺伝子発現

