

201122048A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業(神経・筋疾患分野)

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成24(2012)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究	-----	1
松本直通		
(資料) 研究全体の流れと進行状況		

II. 分担研究報告

1. マイクロアレイ解析で微細異常が判明した自閉症の臨床的検討	11
岡本伸彦	
2. 広汎性発達障害関連遺伝子による病態解明研究	17
橋本亮太	
3. 年齢依存性てんかん性脳症の遺伝型と臨床型の関連性の解明	25
加藤光広	
4. 本邦におけるクレアチン欠損症のスクリーニング法確立に向けて	27
小坂仁	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
---------------------	-------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	33
-----------------	-------	----

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

Copy Number Variation (CNV)の発見によりヒト脳神経疾患ゲノム解析は新たな局面を迎えている。ほぼ同一の CNV が精神遅滞症候群やてんかんあるいは自閉症などの発達障害を含む多様なヒトの疾患を惹起していることが明らかになり、これら多様な疾患群の共通項が CNV (のみ) であるという新たな「genotype-first」の時代を迎えた。本研究は、先端技術を用いてこれらの発達期の様々な障害を対象に網羅的な解析を行い CNV の視点からこれらの疾患群を再定義し、CNV を利用した新たな効率的診断法と責任分子単離を行うことを目的とする。平成 23 年度の成果として、精神遅滞と眼球発生異常ならびに四肢の異常を呈する Microphthalmia with limb anomaly (MLA)症候群の責任遺伝子を世界で初めて明らかにした (**Am J Hum Genet, 2011**)。この症候群は、劣性遺伝性疾患の小家計例 3 家系を対象に SNP アレータイピングを行い候補遺伝子座を特定し責任遺伝子 *SMOCl* を同定した。本症例では病的 CNV を症例に認めなかったため、アレー解析で可能なタイピングを行い遺伝子特定に至った。病的 CNV は疾患遺伝子単離の端緒として極めて重要であるが、CNV を認めない場合には他の解析手段が必須となる。そこで本研究では次世代シーケンサーを用いた全遺伝子エクソン領域 (エクソーム) 解析法の開発研究を並行して進め、解析系の確立に成功した (*J Med Genet, 2011*)。さらに遺伝子変異解析としての正確性を確認した (*Hum Genet, 2011*)。本手法を用いてびまん性大脳白質形成不全症の責任遺伝子 *POLR3A* と *POLR3B* の単離に至った (**Am J Hum Genet, 2011**)。また Coffin-Siris 症候群の責任遺伝子を同定し現在投稿中である。

分担研究者

岡本伸彦・大阪府立母子保健総合医療センター・遺伝診療科・科長

橋本亮太・大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学連合小児発達学研究所附属子どものこころの分子統御機構研究センター/大阪大学大学院医学系研究科・精神医学・特任准教授

加藤光広・山形大学医学部発達生体防御学講座・小児医科学分野・講師

小坂仁・神奈川県立こども医療センター神経内科・科長/神奈川県立がんセンター臨床研究所

A. 研究目的

Copy Number Variation (CNV)の発見によりヒト脳神経疾患ゲノム解析は新たな局面を迎えている。ほぼ同一の CNV が精神遅滞症候群やてんかんあるいは自閉症などの発達障害を含む多様なヒトの疾患を惹起していることが明らかになり、これら多様な疾患群の共通項が CNV (のみ) であるという新たな「genotype-first」の時代を迎えた。本研究は、先端技術を用いてこれらの発達期の様々な障害を対象に網羅的な解析を行

いCNVの視点からこれらの疾患群を再定義し、CNVを利用した新たな効率的診断法と責任分子単離を行うことを目的とする。研究代表・松本は、全ての高解像度プラットフォームに対応したアレー解析機器を完備し（Affymetrix社・Agilent社に加えて本年度はIllumina社のアレー解析機器を新たに導入）、世界最高レベルの解析環境を有す。この研究環境・実績を応用し、ヒト発達障害の中でも重要な自閉症、精神遅滞症候群、てんかん関連疾患に対して世界最高解像度のCNV解析と塩基レベルでの解析を行い発達障害に関与する遺伝的効果の高い遺伝子を同定する。本邦ではCNVを解析対象としたまとまった研究は皆無でその実体解明は急務である。平成23年度も自閉症、精神遅滞症例、てんかん関連疾患を対象に260例程度の解析を既に行い、超細密レベルでの染色体異常カタログと候補遺伝子探索を継続している。一方、明らかに病的なCNVを有さない症例においてCNVを端緒にしたアプローチは無力である。この欠点を克服するため次世代シーケンサーを用いた全エクソン領域（エクソーム）シーケンスの開発を進め、解析系を確立した。平成23年度はCNVを有さない疾患に2疾患においても責任遺伝子の同定に至ることができた。精神遅滞と眼球低形成ならびに四肢異常を伴う症候群（SNPマッピングと候補領域内の遺伝子探索）と先天性大脳白質形成不全症である（エクソームシーケンス）。

B. 研究方法

①症例の集積

各研究分担者および遺伝医学に関する独自

のネットワーク・蔵王セミナー等で形成された小児神経臨床研究ネットワークを中心に、てんかん関連疾患・精神遅滞関連症候群ならび自閉症を広く集積する。末梢血の得られた検体は基本的にリンパ芽球株化を行いゲノムDNAと共に染色体が可能なプラットフォームを形成する。

②高密度アレーの比較検討

Affymetrix 社 Cytogenetics Array 2.7M (全ゲノムにわたって270万マーカーを搭載)あるいは Cytoscan HD (遺伝子を中心に最適化された260万マーカーを搭載)、Agilent 社 1M/400K (全ゲノムにわたってそれぞれ100万/40万マーカー搭載)、NimbleGen 社 2.1M/700K アレー (それぞれ210万/70万マーカー搭載)を用いてCNV検出の感度や精度等を比較検討する。まず Affymetrix 社の Cytogenetics array 2.7M か Cytoscan HD を全例に行い、適宜他のアレープラットフォームを追加する。

③疾患責任遺伝子の単離

精神遅滞を伴う四肢異常眼球低形成症候群家系を用いて遺伝的マッピングから責任遺伝子を単離する。精神発達遅滞と大脳白質髄鞘化低形成を示すHCAHCの責任遺伝子を次世代シーケンサーを用いた全エクソン領域の解析により特定する。

C. 研究結果

①症例の集積

症例集積は順調に進行し既に自閉症は170例・精神遅滞関連症候群500例・てんかん関連症候群340例を超えた。本年度に責任遺伝子が明らかになったKabuki症候群も既に70

例を超える集積状況である。

②高密度アレーの比較検討とCNV検出

Affymetrix社のCytogenetics array 2.7MあるいはCytoscan HDをprimary platformとして、疾患ゲノム解析を進めた。既に200例を超える症例の1次解析は終了した。高解像度であるため通常1例に於いて数十カ所のCNVおよび染色体微細構造異常候補領域を検出するため、それぞれを個別にCNVの真偽を検証していくことは物理的・費用的にも相当困難である。検証系の効率化・簡素化の目的で他のプラットフォームの高密度アレーを用いていわゆるdouble arraysによる解析を進めた。この過程で各種商業プラットフォームの特性と解析上の注意点が明らかになった。Affymetrix社のcytogenetics array 2.7Mでは、プローブ密度は現存アレーで最高レベルであるが、専用ソフトウェア(ChAS)のversion up後に測定値が不安定なプローブがかなり削除されているため実質2.1 M程度に解像度が減っていた。一方、cytogenetics arrayのさらなる改良版であるcytoscan HDアレーは260万プローブのCNV解析に加えて多型情報を加味したAllele peakの情報が極めて有用で高い信頼度でCNV検出が可能であった。また他のプラットフォーム特性を考慮しながら適宜double array解析を追加し必要に応じて個別にFISHや定量PCRによる検証も追加し異常CNV、染色体微細構造異常領域のカatalog作成が進行中で興味深いCNV異常が多数検出されている。例えば難治性てんかん性脳症の症例に対してSTXBPIやCDKL5に関連したCNV異常の同定に成功した(Clin Genet in press; Brain

Dev in press)。

③疾患責任遺伝子の単離

I. 四肢異常を伴う小眼球症候群(Microphthalmia with limb anomalies, MLA)

MLAは視神経の形成不全と小(無)眼球症に四肢(手足の合指症や乏指症など)の異常を伴う常染色体劣性疾患である。通常精神発達遅滞を伴う。日本人家系1例、レバノン家系1例、トルコ家系1例を対象に、マイクロアレイによる全ゲノムSNPタイピングおよびマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を行い、3家系4症例に共通する原因遺伝子候補領域を第14番染色体上に見出した。そして同領域に位置するSMOC1遺伝子のホモ接合性変異を、4人の患者さん全てに同定した(図2)。マウスに於いてSmoc1は形態形成期の眼や手足で発現していた。さらに、Smoc1変異マウスでは、MLA患者で特徴的な視神経の形成不全と小眼球症、および合指症や腓骨の低形成などの四肢形成異常が認められた。さらに、発生上重要であるBMPシグナルの減少が、趾間部での細胞死の減少をもたらし、合指症を惹起することが強く示唆された(Am J Hum Genet, 2011)。

II.HCAHC

小脳萎縮と脳梁低形成を伴うび慢性大脳白質形成不全症(Diffuse cerebral hypomyelination with cerebellar atrophy and hypoplasia of the corpus callosum : HCAHC)は、2009年に国立精神・神経医療研究センター・佐々木征行部長らが初めて報告した新しい白質形成不全症である。全エキソン

シーケンスを 3 名の患者で行い、1 名において *POLR3A* 遺伝子の、2 名において *POLR3B* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を同定した。*POLR3A* および *POLR3B* 遺伝子は RNA polymerase III (PolIII) 複合体のコアになるサブユニット (RPC1 および RPC2) をコードし、同定された変異は PolIII 活性を低下させると予想された。PolIII は tRNA と 5SrRNA を含む大多数の低分子 RNA をコードする遺伝子を転写しており、これらの低分子 RNA 量が不足することにより髄鞘化不全が起きると考えられた (Am J Hum Genet, 2011)。

III. Coffin-Siris 症候群

Coffin-Siris 症候群(以下 CSS と称す)は、軽度～中等度の精神遅滞・中等度以上の低緊張・てんかん・粗な顔貌と手足第 5 指の低形成などの奇形兆候を特徴と多発奇形・精神遅滞症候群の一つである。稀な疾患でその頻度や遺伝要因の解明は進んでいない。CSS を対象に高密度マイクロアレー及びヒト全遺伝子のエクソン領域 (全エクソーム) の解析を行いその遺伝的原因を明らかにした。2 例において責任遺伝子である *CSS1* に関する CNV が同定された (論文投稿中)。

D. 考察

てんかん関連疾患において CNV 異常・染色体構造異常を端緒に複数の遺伝子異常が原因であることを明らかにしつつある。CNV 異常で同定できない点変異の同定のために次世代シーケンサーを用いた解析系を確立し、発達障害に至る大脳白質形成不全症の責任遺伝子を新たに同定した。CNV

解析異常は発達障害関連疾患の遺伝的原因解明にきわめて有効であった。CNV 異常によらない症例については次世代シーケンサー解析の併用も必要であった。

E. 結論

ヒト発達障害の遺伝的原因解明に CNV 解析は極めて有効であり種々の責任遺伝子に関連する CNV がてんかん等の発達障害の原因であることは明らかになりつつある。一方 CNV 異常の観点だけでは疾患ゲノム解析は完全ではなく点変異についてはマッピングや次世代シーケンサー等の他の補完的技術の併用が不可欠である。

F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Okada I[#], Hamanoue H[#], ([#] denotes equal contribution) Terada K, Tohma T, Megarbane A, Chouery E, Abou-Ghoch J, Jalkh N, Cogulu O, Ozkinay F, Horie K, Takeda J, Furuichi T, Ikegawa S, Kiyomi Nishiyama K, Miyatake S, Nishimura A, Mizuguchi T, Niikawa N, Hirahara F, Kaname T, Yoshiura K-i, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Furukawa T, *Matsumoto N, *Saito H. *SMO1* is essential for ocular and limb development in humans and mice. Am J Hum Genet 88(1): 30-41, 2011

- *Tohyama J, Kato M, N, Kawasaki S, Kawara H, Matsui T, Akasaka N, Ohashi T, Kobayashi Y, Matsumoto N. Dandy-Walker malformation associated with heterozygous *ZIC1* and *ZIC4* deletion: Report of a new patient. *Am J Med Genet* 155(1): 130-131, 2011
- Furuichi T, Dai J, Cho T-J, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Baynam G, Nagai T, Miyake N, Matsumoto N, Ohashi H, Unger S, Superti-Furga A, Kim O-H, Nishimura G, *Ikegawa S. *CANT1* is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant. *J Med Genet* 48(1): 32-37, 2011
- *Saitsu H, Hoshino H, Kato M, Nishiyama N, Okada I, Yoneda Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kubota M, Hayasaka K, Matsumoto N. Paternal mosaicism of a *STXBPI* mutation in Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 80 (5):484-488, 2011.
- *Yano S, Bagheri A, Watanabe Y, Moseley K, Nishimura A, Matsumoto N, Baskin B, Ray PN. Familial Simpson-Golabi-Behmel syndrome: Studies of X-chromosome inactivation and clinical phenotypes in two female individuals with *GPC3* mutations. *Clin Genet* 80 (5): 466-471, 2011.
- Nishimura-Tadaki A, Wada T, Bano G, Gough K, Warner J, Kosho T, Ando N, Hamanoue H, Sakakibara H, Nishimura G, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Wakui K, Saitsu H, Fukushima Y, Hirahara F, *Matsumoto N. Breakpoint determination of X;autosome balanced translocations in four patients with premature ovarian failure. *J Hum Genet* 56(2) 156–160, 2011
- Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, *Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet* 152(2): 409-414, 2011
- *Tonoki H, Harada N, Shimokawa O, Yosozumi A, Monzaki K, Satoh K, Mika Kosaki R, Sato A, Matsumoto N, Iizuka S. Axenfeld-Rieger anomaly and Axenfeld-Rieger syndrome: clinical, molecular-cytogenetic, and DNA array analyses on three patients with chromosomal defects at 6p25. *Am J Med Genet Part A* 155 (12): 2925-2932
- Tadaki H, Saitsu H, Nishimura-Tadaki A, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Miyake N, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, *Matsumoto N. *De novo* 19q13.42 duplications involving *NLRP* gene cluster in a patient with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis. *J Hum Genet* 56 (5): 343-347, 2011.
- *Miyake N, Yamashita S, Kurosawa K,

- Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Matsumoto N. A novel homozygous mutation of *DARS2* may cause a severe LBSL variant. *Clin Genet* 80(3): 293-296, 2011.
- Tadaki H, Saitsu H, Kanegane H, Miyake N, Imagawa T, Kikuchi M, Hara R, Kaneko U, Kishi T, Miyamae T, Nishimura A, Doi H, Tsurusaki Y, Sakai H, Yokota S, *Matsumoto N. Exonic deletion of *CASP10* in a patient presenting with systemic juvenile idiopathic arthritis, but not with autoimmune lymphoproliferative syndrome type IIa. *Int J Immunogenet* 38 (4): 287-293, 2011
- Tsurusaki Y, Osaka H, Hamanoue H, Shimbo H, Tsuji M, Doi H, Saitsu H, *Matsumoto N, *Miyake N. Rapid detection of a mutation causing X-linked leukodystrophy by exome sequencing. *J Med Genet* 48 (9): 606-609, 2011.
- *Narumi Y, Shiihara T, Yoshihasi H, Sakazume S, van der Knaape MS, Nishimura-Tadaki A, Matsumoto N, Fukushima Y. Hypomyelination with atrophy of the basal ganglia and cerebellum (H-ABC) in an infant with Down syndrome. *Clin Dysmorphol* 20 (3): 166-167, 2011
- Dai J, Kim O-K, Cho T-J, Miyake N, Song H-R, Karasugi T, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Nagai T, Matsumoto N, Ohashi H, Kamatani N, Nishimura G, Furuichi T, Takahashi A, *Ikegawa S. A founder mutation of *CANT1* common in Korean and Japanese Desbuquois dysplasia. *J Hum Genet* 56(5): 398-400, 2011.
- *Saitsu H, Matsumoto N. Genetic commentary: *De novo* mutations in epilepsy. *Dev Med Child Neurol* 53 (9):806-807, 2011.
- Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, *Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet* 155(8): 1949-1958, 2011
- *Saitsu H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama N, Nishimura A, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N. Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (*SRGAP2*). *Am J Med Genet* 158A (1):199-205, 2011
- Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. *Clin Genet* 80 (2): 161-166, 2011
- Hannibal MC#, Buckingham KJ#, Ng SB#, (# denotes equal contribution) Ming JE, Beck

- AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura KI, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, Liang D, Sudo A, Morris CA, Banka S, Black GC, Clayton-Smith J, Nickerson DA, Zackai EH, Shaikh TH, Donnai D, Niikawa N, Shendure J, *Bamshad MJ. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 155 (7): 1511-1516, 2011.
- *Kosho T, Miyake N, Mizumoto S, Hatamochi A, Fukushima Y, Sugahara K, Matsumoto N. A response to: Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 (D4ST1/*CHST14*) function represents the first dermatan sulfate biosynthesis defect, “Dermatan sulfate-deficient adducted thumb–clubfoot syndrome”. Which name is appropriate, “Adducted thumb–clubfoot syndrome” or “Ehlers–Danlos syndrome”? *Hum Mut* 32(12):1507-1509, 2011
- Doi H, Yoshida K, T Yasuda, Fukuda M, Fukuda Y, Morita H, Ikeda S-i, Kato R, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Sakai H, Miyatake S, Shiina M, Nukina N, Koyano S, Tsuji S, Kuroiwa Y, *Matsumoto N. Exome sequencing reveals a homozygous *SYT14* mutation in adult-onset autosomal recessive spinocerebellar ataxia with psychomotor retardation. *Am J Hum Genet* 89(2):320-327, 2011.
- Yoneda Y, Haginoya K, Arai H, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Osaka H, Kato M, Matsumoto N, *Saitsu H. *De novo* and inherited mutations in the gene encoding a type IV collagen $\alpha 2$ chain (*COL4A2*) cause porencephaly. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012
- *Saitsu H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, *Matsumoto N. Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet* 90 (1):86-90, 2012.
2. 学会発表
- 講演会「次世代シーケンサーを用いた最先端研究」・松本直通「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」(徳島・徳島大学医学部臨床第一講堂 8月26日)
- 第一回サイトジェノミクスセミナー・松本直通(特別講演)「次世代シーケンス法による疾患研究の最前線」(三菱化学メディアエンス志村事業所・東京9月17日)
- 第46回産婦人科研究会(順天堂大学) 松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(順天堂大学医学部・東京9月20日)
- 第18回遺伝性疾患に関する出生前診断研

研究会・松本直通(特別講演)「次世代シーケンサーを用いた疾患ゲノム解析の現状」(佐賀大学医学部・佐賀 10 月 1 日)

特願 2011-247457 才津浩智／松本直通・孔脳症および周産期脳出血の検出方法・平成 23 年 11 月 11 日

日本人類遺伝学会第 56 回大会・松本直通「ヒト遺伝性疾患の原因解明を目指して」学会賞受賞講演(於・幕張メッセ 11 月 11 日)

特願 2011-226488・才津浩智／松本直通・慢性大脳白質形成不全症の検出方法・平成 23 年 10 月 14 日

日本人類遺伝学会第 56 回大会「次世代シーケンサーを用いたヒト疾患ゲノム解析法」松本直通(シンポジスト)シンポジウム 11(超高速シーケンサーによる疾患ゲノム解析)(於・幕張メッセ 11 月 12 日)

特願 2011-136277・松本直通／土井宏・常染色体劣性遺伝性脊髄小脳変性症の検出方法・横浜市立大学・平成 23 年 6 月 20 日

国立精神・神経医療研究センターTMC 棟／クラスター研究棟開棟記念講演会「遺伝性神経疾患のエクソーム解析」松本直通(招待講演)(国立精神・神経医療研究センター11 月 22 日)

The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan・Next generation sequencing technology enables a large scale medical genomic research (symposium)
「Disease genome analysis using next generation sequencer」Naomichi Matsumoto (Invited speaker)(Dec 14, 2011 at Yokohama, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特願 2012-136 松本直通／鶴崎美德／三宅紀子・コフィンーシリス症候群の検出方法・平成 24 年 1 月 4 日

研究全体の流れと進行状況

岡本・大阪府立母子
保健総合医療センター

橋本・大阪大学
精神医学

加藤・山形大学
小児科

小坂・神奈川県立
こども医療センター

横浜市立大学医学部ゲノム研究倫理委員会の承認

横浜市立大学医学研究科環境分子医科学・松本

平成
22
年

A. 解析症例の集積: 自閉症・精神遅滞症候群・てんかん関連疾患などの発達障害



B. **アフィメトリクス 2.7M** **コンブルゲン 2.1M** **アジレント 1M**
世界最高レベルのアレー解析ファシリティーを用いた染色体微細構造異常解析



平成
23
年

C. **染色体FISH解析** **リアルタイム定量PCR** **超細密カスタムアレー**
複数の手法で検出された染色体微細構造異常解析を確認しさらに細密化する



平成
24
年

D. PCRとシーケンスによる染色体微細構造異常の塩基レベルでの構造決定

E. **染色体微細構造異常症候群の確立** **疾患責任・関連遺伝子の特定**



F. **画期的診断法の確立** **知的財産権の確保** **新規バイオマーカーの確立**

現時点

症例集積と詳細な臨床情報収集

厚生科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究

分担研究課題：マイクロアレイ解析で微細異常が判明した自閉症の臨床的検討

分担研究者 岡本伸彦 大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科

研究要旨：自閉症児において染色体異常を認める例は、数%から 10%程度である。染色体異常例では、知的障害やてんかん、内臓疾患を伴う率がやや高くなる。外表奇形や特徴的顔貌を認める例では、G 分染法が正常でも、マイクロアレイを用いた解析で異常が見つかる可能性がある。一方、欠失を認めてもほとんど症状を有しない例もあり、多様性が顕著である。マイクロアレイ解析で診断された代表的な変異 CNV 症例の検討を行った。

共同研究者

大阪府立母子保健総合医療センター遺伝診療科
池川敦子、大町和美、三島祐子、山本悠斗

とが注目されている。再現性を自閉症例に対してマイクロアレイ解析を実施し、異常が判明した症例を提示する。

A. 研究目的

自閉症(MIM 209850)は生後 3 年までに症状があきらかとなる発達障害である。国際疾病分類では広汎性発達障害 (PDD : pervasive developmental disorder) に大きく分類され、アスペルガー症候群も PDD に分類される。最近では自閉症スペクトラムという表現がよく用いられる。自閉症の 3 大症状は、①対人的相互関係の問題、②コミュニケーション能力の問題、③行動範囲や興味の限定である。自閉症は出生 1000 人中 6 人の罹患率で、アスペルガー症候群も含めると全出生の 1% をしめる。

自閉症は染色体異常症や先天異常症候群に伴う場合がある。他に単一遺伝子異常による非症候群性の自閉症が注目を集めている。*Neurexin*、*CNTNAP2*、*Neurologin*、*SHANK 3*、*SHANK2* などのシナプスを構成する分子群の異常が、自閉症に関与する。また、自閉症では、マイクロアレイ法で染色体の微細な欠失や重複 (CNV) が多数みつかるこ

B. 研究方法

大阪府立母子保健総合医療センター受診の自閉症症例においてマイクロアレイ解析などを実施し、ゲノム異常を調べた。異常の同定された代表例に臨床的検討を行った。

解析にあたっては検査前後に遺伝カウンセリングを実施した。書面によるインフォームド・コンセントの手続きを経た。

C. 研究結果

【症例 1】染色体 15q11-13 重複症候群
精神運動発達遅滞、自閉症、VSD

4 歳男児。

現病歴：在胎 40 週 6 日、3168g (0SD)、仮死なく出生。身長 50.0cm (0SD)、頭囲 34.0cm (0.1SD)。生後すぐ心雑音を聴取し、心エコーで VSD の診断を受けた。現在まだ手術は行われていない。乳児期より発達遅滞あり。頸定 4 カ月、寝返り 5-6 カ月、座位 12 カ月、現在未歩行で立位不可。現在 4 歳で

有意語なし。聴力は異常なし。

食事の順番が決まっている、おもちゃにこだわり、ひとり遊びが多い、味覚や聴覚の過敏性あり、こわがること多い、初めて行くところになじみにくい、クレーン現象、回るもの好きである、などの症状あり。記憶力よく、視覚認知がすぐれている。遊びに集中すると、母の姿が見えなくなっても気にならない。

有意語はないが、簡単な言いつけ理解可。絵本を飽きずに見る。絵本を見て、知っている物の名前を言ったり指さしたりはしない。

4歳5カ月で実施した津守式発達テストでは、発達年齢0歳9カ月で発達指数17と重度遅滞であった。自閉症と知的障害を合併していると診断した。外表奇形はなかったが、全身に色素沈着を認めた。一般血液検査、脳波検査、頭部MRIに異常を認めなかった。染色体FISH法およびマイクロアレイ法にて15q11-13重複が判明した。

【症例2】16p11.2欠失症候群

自閉症、知的障害、肥満の10歳女児。在胎39週、2770g(-0.6SD)、身長47cm(-1.3SD)、頭囲33cm(-0.3SD)、アプガースコア10/10で出生。5か月時にけいれんあり、一時期デパケンで治療を受けた。

2歳1カ月で有意語なし、視線合わせない、ひとり遊びが主で、缶を積み上げる遊びを好む、呼びかけに応答しない、人見知りなし、同じ所でぐるぐる回る行動あり、などの状況から自閉症を疑い、精査目的で紹介となる。一般血液検査、脳波、頭部MRIなど異常なし。G-bandによる染色体検査は46,XXで正常核型であった。

2歳9カ月時の新版K式検査ではDQ59であった。遅れに対して療育を実施、小学校から特別支援学校に通学。

学童期より高カロリーのを好む偏食、食欲亢進、運動不足傾向あり。体重増加、肥満出現。大量にお菓子を食べる、学校の給食をおかわりす

る、家で冷蔵庫のものを盗食するなどあり。10歳で身長137cm、52kgであった。

マイクロアレイ解析で16p11.2微細欠失判明。母親も16p11.2微細欠失あり。自閉症状はないが、肥満あり。

【症例3】16p11.2-12.2欠失症候群

精神運動発達遅滞の2歳男児。家族歴に特記すべき事項なし。37週1770gで出生。生後、哺乳障害あり。VSDの手術を受けた。頸定10ヶ月、寝返り1歳、座位2歳と運動発達遅滞。未歩行で有意語なし。G-bandでは46,XYでその他各種検査で異常なし。精査目的で紹介受診。眼間開離、内眼角贅皮、眼瞼裂斜下、耳介低位、扁平な鼻先、小下顎など小奇形あり。2歳で身長82.6cm(-0.9SD)、体重9.3kg(-1.9SD)、頭囲46.5cm(-1.1SD)と体格は小柄であった。中度精神運動発達遅滞。けいれんはない。有意語はないが、対人関係はよく、自閉傾向は現時点では顕著でない。

マイクロアレイ解析で16p11.2-12.2欠失症候群と判明した。約7.7Mbの欠失であった。

【症例4】16p11.2-12.2重複症候群

精神運動発達遅滞の8歳女児。家族歴に特記事項なし。38週3200gで出生。歩行開始は1歳5ヶ月と遅延。言語発達遅滞、衝動性、多動性あり。社会性、会話能力が低く、4歳で他院で自閉症の診断を受けた。小学校は特別支援教育を受けた。発音は不明瞭で不器用さ目立つ。

記憶力はよく、記号や道順へのこだわりなど、自閉症の基準を満たす。

G-band異常なし。脳波で棘波あるが、てんかん発作なし。頭部MRI異常なし。

身体所見では多毛を認めた。身長112cm(-2.2SD)、体重21.5kg(-0.7SD)とこがらであったが、頭囲は53cm(0.9SD)と相対的大頭であった。4

精査目的で行ったマイクロアレイ解析で16p11.2-12.2重複症候群と判明した。約6.7Mbの

重複であった。

【症例5】自閉症、視力障害の3歳男児。家族歴に特記事項なし。満期産 AFD にて出生。早期の運動発達に問題はなかった。眼振を認め、両側性先天性網膜嚢（第1次硝子体過形成遺残）の診断を受けた。高度両側視覚障害あり。

4歳で身長 96cm、体重 13kg と身体発育は正常範囲。頭囲 47.5cm で正常範囲。

軽い言語面の遅れに加えて、クレーン現象、対人関係の遅れ、集団になじみにくい、こだわりの強さ、多動、過敏性を認めた。

DQ は 86 で正常下限であったので、高機能広汎性発達障害と診断した。

一般血液・尿検査に特記すべき異常なし

頭部 MRI：大脳白質髄鞘化遅延を認めた。眼球内に異常索状物質を認めた。

脳波：後頭部に棘波多発を認めた。

G-band：4番染色体腕内逆位を認めた。

46, XY, inv(4) (p14;q21)

マイクロアレイ：逆位のあった4番染色体に異常なかったが、染色体 7q31 に約 8Mb の欠失を認めた。両親は欠失を認めず。突然変異であった。欠失領域は自閉症関連遺伝子 *CADPS2* を含んだ。

D. 考察

自閉症児において染色体異常を認める例は、数%から 10%程度である。染色体異常例では、知的障害やてんかん、内臓疾患を伴う率がやや高くなる。外表奇形や特徴的顔貌を認める例では、G 分染法が正常でも、FISH やマイクロアレイを用いた解析で異常がみつかる可能性がある。

今回提示した症例はいずれも精神運動発達遅滞に自閉症状を伴った。症例 1 は全身色素沈着、症例 2 は肥満、症例 3 は眼科異常を合併した。

症例 1 は自閉症における染色体異常としては頻度が高いといわれる 15q11-q13 の領域の重複であった。15q11-13 重複症候群[MIM#608636]とし

て、自閉症との関連が注目されている。この領域は、プラダー・ウィリ症候群ないしアンジェルマン症候群で欠失する領域である。自閉症の 1～3%で、母親由来の同領域が重複するか、過剰なマーカー染色体として存在する場合がある。非相同染色体組み換えが原因と考えられている。自閉症以外に精神運動発達遅滞、失調、てんかんを伴う。色素沈着は重複領域に存在する P 遺伝子の遺伝子量効果と考えられる。欠失するプラダー・ウィリ様やアンジェルマン症候群が低色素となること対極をなしている。

症例 2 にみられた、16p11.2 欠失症候群[MIM#611913]は、精神運動発達遅滞、認知機能障害、自閉症、注意欠陥多動症、てんかん、肥満などと関連することが知られている。特徴的顔貌、頭囲大を示す場合もある。脊椎や肋骨奇形、先天性横隔膜ヘルニアなどの先天奇形もしばしば認められる。

通常の染色体検査では異常は同定できず、マイクロアレイ解析で 593kb のほぼ共通した領域の欠失が認められる。多数例の集団における解析で、自閉症の 1%程度で出現する CNV である。表現型は非常に多彩で、親にも児と同じ欠失を同定することがあり、親は軽い発達遅滞ないし全く正常のこともある。症例 2 は肥満を合併したが、同じ欠失を持つ母親は自閉症状はなかった。このような例では結果の解釈に慎重な配慮を要する。

症例 3 は新規症候群である 16p11.2-12.2 欠失症候群[MIM#613604]であった。16p11.2 欠失症候群よりもややテロメア側の欠失であり、Ballif ら(2007)が報告した。16p11.2-12.2 欠失症候群は平坦な顔面、前頭部突出、眼瞼裂斜下、内眼角贅皮、耳介低位、眼の位置が奥まっている、などの特徴的顔貌に加え、哺乳・摂食障害、乳児期の筋緊張低下、低身長、特に言語発達を中心とする精神運動発達遅滞を認める。感染症、特に中耳炎を繰り返すことが多く、滲出性中耳炎になりやすい。一部の症例は先天性心疾患や胃食道逆流症を伴う。

症例4は16p11.2-12.2欠失症候群とほぼ同じ領域の重複であった。この重複はまだ疾患単位としては確立していないが、頭囲大などの特徴を有し、今後同様の報告がみられる可能性がある。16番染色体短腕のこの領域には多くの分節的重複領域が存在し、構造異常が生じやすいようである。

症例5は*CADPS2*のハプロ不全であった。*CADPS2*遺伝子を欠損したマウスの報告では、神経栄養因子の一つであり神経回路形成や記憶・学習機能を調節する脳由来神経栄養因子(BDNF)の分泌が著しく減少していたという。そのため、*CADPS2*がBDNF分泌において重要と考えられた。このマウスは、自閉症に見られる特徴をもった行動異常を示していた。自閉症患者の*CADPS2*遺伝子の発現パターンを健常者と比較すると、一部の患者では*CADPS2*のmRNAに、異常な「選択的スプライシング」がみられた5)。異常なmRNAから翻訳される欠損型*CADPS2*は、神経軸索へ輸送されない。欠損型*CADPS2*の発現によってBDNFの局所的分泌が障害され、神経ネットワークの形成異常につながる可能性がある。症例3は*CADPS2*のハプロ不全が発達に影響する可能性を世界で初めて示唆する結果であった6)。

E. 結論

マイクロアレイ解析で診断できた微細ゲノム異常例で、自閉症例ないし発達遅滞の代表的な5例を報告した。従来の染色体検査では異常は同定できず、マイクロアレイ解析が重要であると考えられた。自閉症や発達遅滞ではマイクロアレイ解析は威力を発揮する。今後の症例の蓄積が待たれる。

謝辞 マイクロアレイ解析 症例1と5 東京女子医科大学統合医科学研究所 山本俊至先生、症例2 横浜市立大学 松本直通先生、症例3, 4 三菱化学メディエンス 原田直樹先生に深謝いたします。

文献

1) Kumar RA, KaraMohamed S, Sudi J, et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet.* 2008 ;17:628-38.

2) Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *J Med Genet.* 2010;47:195-203.

3) Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature.* 2010;463(7281):671-5.

4) Ballif BC, Hornor SA, Jenkins E, et al. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2- p12.2. *Nat Genet.* 2007;39: 1071-3.

5) Sadakata T, Washida M, Iwayama Y, et al. Autistic-like phenotypes in *Cadps2*-knockout mice and aberrant *CADPS2* splicing in autistic patients. *J Clin Invest.* 2007; 117:931-43.

6) Okamoto N, Hatsukawa Y, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing *CADPS2* and *TSPAN12* in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet A.* 2011; 155:1568-73.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 論文発表

論文発表

Sasaki K, Okamoto N, Kosaki K, Yorifuji T, Shimokawa O, Mishima H, Yoshiura KI, Harada N. Maternal uniparental isodisomy and heterodisomy on chromosome 6 encompassing a CUL7 gene mutation causing 3M syndrome. *Clin Genet.* (in press)

Shimizu K, Okamoto N, Miyake N, Taira K, Sato Y, Matsuda K, Akimaru N, Ohashi H, Wakui K, Fukushima Y, Matsumoto N, Kosho T. Delineation of dermatan 4-O-sulfotransferase 1 deficient Ehlers-Danlos syndrome: Observation of two additional patients and comprehensive review of 20 reported patients. *Am J Med Genet A.* (in press).

Hayashi S, Okamoto N, Chinen Y, Takanashi JI, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. Novel intergenic duplications and mutations of CASK in patients with mental retardation and microcephaly with pontine and cerebellar hypoplasia (MICPCH). *Hum Genet.* (in press)

Kawazu Y, Inamura N, Kayatani F, Okamoto N, Morisaki H. Prenatal complex congenital heart disease with Loeys-Dietz syndrome. *Cardiology in the Young* (in press)

Naiki M, Mizuno S, Yamada K, Yamada Y, Kimura R, Oshiro M, Okamoto N, Makita Y, Seishima M, Wakamatsu N. MBTPS2 mutation causes BRESHECK syndrome. *Am J Med Genet* (in press)

Filges I, Shimojima K, Okamoto N, Röthlisberger B, Weber P, Huber AR, Nishizawa T, Datta AN, Miny P, Yamamoto T. Reduced expression by SETBP1 haploinsufficiency causes developmental and expressive language delay indicating a phenotype distinct from Schinzel-Giedion syndrome. *J Med Genet.* 48:117-122, 2011.

Waga C, Okamoto N, Ondo Y, Fukumura-Kato R, Goto YI, Kohsaka S, Uchino S. Novel variants of the SHANK3 gene in Japanese autistic patients with severe delayed speech development. *Psychiatr Genet.* 21:208-211, 2011.

Hiraki Y, Nishimura A, Hayashidani M, Terada Y, Nishimura G, Okamoto N, Nishina S, Tsurusaki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. A de novo deletion of 20q11.2-q12 in a boy presenting with abnormal hands and feet, retinal dysplasia, and intractable feeding difficulty. *Am J Med Genet A.* 155:409-414, 2011.

Okamoto N, Hatsukawa Y, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion in 7q31 encompassing CADPS2 and TSPAN12 in a child with autism spectrum disorder and PHPV. *Am J Med Genet A.* 155:1568-1573, 2011.

Tsurusaki Y, Okamoto N, Suzuki Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing of two patients in a family with atypical X-linked leukodystrophy. *Clin Genet.* 80:161-166, 2011

Okamoto N, Tamura D, Nishimura G, Shimojima K, Yamamoto T. Submicroscopic deletion of 12q13 including HOXC gene cluster with skeletal anomalies and global developmental delay. *Am J Med Genet A.* 155:2997-3001, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成23年度厚生科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

超細密染色体分析から捉え直すヒト発達障害研究

分担研究課題：広汎性発達障害関連遺伝子による病態解明研究

研究分担者 橋本 亮太

大阪大学大学院大阪大学・金沢大学・浜松医科大学連合小児発達学研究所

附属子どものこころの分子統御機構研究センター 准教授

研究要旨

広汎性発達障害は、自閉性障害やアスペルガー障害などの自閉症スペクトラム障害を指し、環境因子と遺伝因子による多因子疾患と考えられている。広汎性発達障害の一卵性双生児の一致率は60～90%、遺伝率が90%とされており、統合失調症などの他の精神疾患と比較して、遺伝因子の関与が非常に大きい。今までに、いくつかの遺伝子が広汎性発達障害の原因遺伝子として報告されている。本研究では、広汎性発達障害関連遺伝子の発現レベルを35例の広汎性発達障害群と健常者群とその対照として45例の統合失調症群と健常者群の不死化リンパ芽球において測定した。その結果、SHANK3とNLG3の発現レベルが広汎性発達障害のみにおいて低かった。よって疾患特異性があることが想定される。これらの二つの遺伝子のmutationはloss of functionであるため、孤発例の広汎性発達障害においても発現が低下していることは、意義深いと思われる。今後は、この2つの遺伝子領域のゲノムシーケンスなどにより、孤発例におけるrare mutationを見出していきたいと考えている。

A. 研究目的

広汎性発達障害は、自閉性障害やアスペルガー障害などの自閉症スペクトラム障害を指し、環境因子と遺伝因子による多因子疾患と考えられている。広汎性発達障害の一卵性双生児の一致率は60～90%、遺伝率が90%とされており、統合失調症などの他の精神疾患と比較して、遺伝因子の関与が非常に大きい。

広汎性発達障害の家系研究より、いくつかの候補遺伝子が見出されている。neuroligin3/4(NLGN3/4)遺伝子もその一つである。このうちNLGN3(Arg451Cys)遺伝子の変異はNLGN3タンパク質のプロセッシングを障害することが知られている。また、NLGN4遺伝子の1186insT変異はアミノ酸が欠損した未熟なNLGN4遺伝子を作る。Neuroliginは、興奮性シナプスであるグルタミン酸や、抑制性のGABA系シナプスを編成する上で必須の、後シナプスに存在する細胞接着分子とシナプス前 β -neurexin(NRXN)と結合し、軸索と連絡する際の機能的前シナプス構造を形成する契機となる。neurexin1(NRXN1)遺伝子の変異も広汎性発達障害患者から発見された。さらに、新規のコピー数多型解析により広汎性発達障害患者のNRXN1-containing遺伝子の領域に欠失が認められた。NRXN1とNLGNの結合体はシナプスを発達させる。また、NLGN3遺伝子の変異はNRXNとの結合を阻害する。NLGNは、同じく広汎性発

達障害と関連するSHANK3と結合する。SHANKタンパク質は、シナプス形成と樹状突起の成熟に関与する。SHANK3遺伝子を含む遺伝子部位の欠失・転座やSHANK3遺伝子の新規の変異が広汎性発達障害で見出されている。

家族研究ではMorrowらが広汎性発達障害とsodium/hydrogen exchanger 9(NHE9)遺伝子の変異との関連を報告している。NHE9遺伝子は、膜のイオン流入を制御する分子の一つである。一方、広汎性発達障害の一つであるRett症候群は、女性患者の80%において、methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) 遺伝子のde novo変異が認められる。MeCP2はメチル化CpGジヌクレオチドと結合する翻訳抑制体であり、通常はヒストンジアセチラーゼ1やクロマチンの抑制に関与するタンパク質を誘導する。また、AKT1遺伝子の変異が広汎性発達障害の原因になるという報告はないが、(PI3K)/AKT経路の異常が広汎性発達障害に関与するという報告はいくつかある。以上の様に様々な遺伝子が広汎性発達障害と関連することが見出されている。

今回我々は、広汎性発達障害者35例と健常発達者35例のコホートと統合失調症患者45例と健常者45例のコホートの末梢血より樹立した不死化リンパ芽球を用いて、これらの遺伝子のmRNAの発現量を比較検討した。

B. 研究方法

広汎性発達障害患者群 35 例(男:女=27:8, 平均年齢(±S.D.)=12.9(±12.4)才)と、性別をマッチさせた健常者群 35 例(男:女=26:9, 平均年齢(±S.D.)=34.8(±9.7)才)の末梢血より不死化リンパ芽球を樹立した。また、別のコホートとして、統合失調症患者群 45 例(男:女=26:19, 平均年齢(±S.D.)=37.9(±1.6)才)と、年齢・性別をマッチさせた健常者群 45 例(男:女=26:19, 平均年齢(±S.D.)=38.1(±1.7)才)の末梢血より不死化リンパ芽球を樹立した。NLGN3、NLGN4、SHANK3、NHE9、MeCP2、NRXN1 および AKT1 遺伝子において、real-time quantitative-PCR 法を用いて mRNA を定量した。ハウスキーピング遺伝子である β -actin または TBP によって補正された mRNA の発現量を、Mann-Whitney の U 検定を用いて解析し、有意確率 $p < 0.001$ (両側)を有意とした。本研究は、大阪大学倫理審査委員会の承認に基づいて行われた。

(倫理面への配慮)

本研究は、精神疾患患者を対象とした遺伝子解析研究である。試料提供者およびその血縁者の遺伝的素因を研究するため、その取り扱いによっては、さまざまな倫理的、社会的問題を招く可能性がある。したがって、文部科学省、厚生労働省、経済産業省告示第 1 号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守した研究計画書を作成し、研究施設での倫理委員会において承認を受けた上で研究を行った。試料提供者への説明とインフォームド・コンセント、個人情報への厳重な管理(匿名化)などを徹底させた。また、遺伝子解析研究においては、大阪大学倫理審査委員会において承認を受けている。

本研究の説明を行う過程や試料等提供の過程で、強制的な態度や同意の強要をしないことはいままでもない。試料提供の依頼を拒否したからといって、診療行為等に不合理または不公平なことが行われることは全くない。また、同意はいつでも文書によって撤回することができ、その場合、試料等は廃棄される。治療中の患者様に関しては、試料提供を依頼することが主治医によって不適切であると判断された場合は、試料提供の依頼は行わない。強制入院(医療保護入院や措置入院)している患者様は対象から除外する。

C. 研究結果

果と考察

広汎性発達障害では健常者と比較して NLGN3 と SHANK3 遺伝子の mRNA の発現量は有意に減少していた。一方、統合失調症患者では健常者と比較してこれらの遺伝子の mRNA 発現量に有意差は認められなかった。また、NLGN4 と NRXN1 遺伝子の mRNA はリンパ芽球において測定することができなかった。

D. 考察

今回の結果より、候補遺伝子の稀な変異をもつ広汎性発達障害だけでなく、遺伝子の翻訳レベルにおける機能的な変化もまた、広汎性発達障害の病態に関与している可能性が示唆された。NLGN3 遺伝子と SHANK3 遺伝子はシナプス関連遺伝子である。一方で、NHE9 遺伝子や MeCP2 遺伝子といった、他の遺伝子は、シナプスにおいて主要な役割を担っていない。これらの知見は、シナプスの機能障害が広汎性発達障害の病態に関連することを示しているのかもしれない。広汎性発達障害で認められた mRNA 発現量の減少が、統合失調症患者では認められなかったことより、これらは広汎性発達障害の疾患特異的な変化である可能性が示唆された。今回の我々の研究には、いくつかの限界があるものの、今後、さらなる検討により広汎性発達障害の病態解明につながることを期待される。

E. 結論

我々は、ヒト発達障害研究に不可欠な発達障害患者を精神医療現場で診療しつつ、研究への同意を取得し、研究参加していただくシステムの構築に成功している。そして、その血液サンプルより不死化した細胞を用いて広汎性発達障害関連遺伝子の発現異常を孤発性の広汎性発達障害において同定した。これらの結果は、新たな診断・治療法のシーズと考えられる。このように本研究は、医療行政上、大変有意義であり、国民の保健・精神医療において多大なる貢献ができると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Iwase M, Kazui H, Takeda M. Personality traits and schizophrenia: evidence from a case-control study and meta-analysis. *Psychiatry Research* (in

- press)
- 2) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Nemoto K, Ohnishi T, Fukumoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Okada T, Iwase M, Kazui H, Takeda M. Impact of the Genome Wide Supported NRG1 Gene on Anterior Cingulate Morphology in Schizophrenia. PlosONE (in press)
 - 3) Takahashi H, Iwase M, Yasuda Y, Ohi Y, Fukumoto M, Iike N, Yamamori H, Nakahachi T, Ikezawa K, Azechi M, Canuet L, Ishii R, Kazui H, Hashimoto R, Takeda M. Relationship of Prepulse Inhibition to Temperament and Character in Healthy Japanese subjects. Neuroscience Research 72(2), 187-193, 2012.2
 - 4) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Nemoto K, Ohnishi T, Yamamori H, Takahashi H, Iike N, Kamino K, Yoshida T, Azechi M, Ikezawa K, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Iwase M, Kazui H, Takeda M. The AKT1 gene is associated with attention and brain morphology in schizophrenia. World J Biol Psychiatry. 2011.12 e-pub(epub)
 - 5) Ota M, Fujii T, Nemoto K, Tatsumi M, Moriguchi Y, Hashimoto R, Sato N, Iwata N, Kunugi H. A polymorphism of the ABCA1 gene confers susceptibility to schizophrenia and related brain changes. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 35(8):1877-1883, 2011.12
 - 6) Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H, Takeda M. The KCNH2 gene is associated with neurocognition and the risk of schizophrenia. World J Biol Psychiatry. 2011.9 (epub)
 - 7) Ikezawa K, Ishii R, Iwase M, Kurimoto R, Canuet L, Takahashi H, Nakahachi T, Azechi M, Ohi K, Fukumoto M, Yasuda Y, Iike N, Takaya M, Yamamori H, Kazui H, Hashimoto R, Yoshimine T, Takeda M. Decreased alpha event-related synchronization in the left posterior temporal cortex in schizophrenia: A magnetoencephalography-beamformer study. Neurosci Res. 71(3):235-43, 2011.11
 - 8) Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Takahashi H, Iwase M, Okochi T, Kazui H, Saitoh O, Tatsumi M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H and Takeda M. Variants of the RELA gene are associated with schizophrenia and their startle responses. Neuropsychopharmacology, 36(9):1921-1931, 2011.8
 - 9) Yamamori H, Hashimoto R, Verrall L, Yasuda Y, Ohi K, Fukumoto M, Umeda-Yano S, Ito A, Takeda M. Dysbindin-1 and NRG-1 gene expression in immortalized lymphocytes from patients with schizophrenia, J Hum Genet, 56(7):478-83, 2011.7
 - 10) Yasuda Y, Hashimoto R, Yamamori H, Ohi K, Fukumoto M, Umeda-Yano S, Mohri I, Ito A, Taniike M, Takeda M. Gene expression analysis in lymphoblasts derived from patients with autism spectrum disorder. Molecular Autism, 2:9, 2011.5
 - 11) Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H, Numata S, Ikeda M, Ueno S, Ohmori T, Iwata N, Ozaki N, Takeda M. No association between the PCMI gene and schizophrenia: a multi-center case-control study and a meta-analysis. Schizophrenia Res, 129:80-84, 2011.6
 - 12) Yasuda Y, Hashimoto R, Ohi K, Fukumoto M, Umeda-Yano S, Yamamori H, Okochi T, Iwase M, Kazui H, Iwata N, Takeda M, Impact on schizotypal personality trait of a genome-wide supported psychosis variant of the ZNF804A gene, Neurosci Lett, 495:216-220, 2011.5
 - 13) Hashimoto H, Shintani N, Tanida M, Hayata A, Hashimoto R, Baba A. PACAP is Implicated in the Stress Axes, Curr Pharm Des, review, 17(10):985-9, 2011.4
 - 14) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Kamino K, Ikezawa K, Azechi M, Iwase M, Kazui H, Kasai K, Takeda M. The SIGMAR1 gene is associated with a risk of schizophrenia and activation of the

- prefrontal cortex. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 35:1309-1315, 2011. 4
2. 学会発表
- 1) Hashimoto H, Takano-Hayata A, Shintani N, Hashimoto R, Takeda M, Baba A. Psychiatric Implications of Pituitary Adenylate Cyclaseactivating Polypeptide (PACAP)-Dependent Stress Responses. 2nd Congress of AsCNP, Seoul, Korea, 9.23-24(23,24), 2011. poster
 - 2) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Takahashi H, Iwase M, Kazui H, Saitoh O, Tatsumi M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H, Takeda M. Variants of the RELA gene are associated with schizophrenia and their startle responses. 2nd Congress of AsCNP, Seoul, Korea, 9.23-24(23,24), 2011. poster
 - 3) Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H, Takeda M. The KCNH2 gene is associated with neurocognition and the risk of schizophrenia. 2nd Congress of AsCNP, Seoul, Korea, 9.23-24(23,24), 2011. poster
 - 4) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H, Takeda M. The KCNH2 gene is associated with neurocognition and the risk of Schizophrenia. 19th World Congress of Psychiatric Genetics, Washington D.C., U.S.A. 9.10-14(12), 2011. poster
 - 5) Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Takahashi H, Iwase M, Okochi T, Kazui H, Saitoh O, Tatsumi M, Iwata N, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H, Takeda M. Variants of the RELA gene are associated with schizophrenia and their startle responses. 19th World Congress of Psychiatric Genetics, Washington D.C., U.S.A. 9.10-14(12), 2011. Poster
 - 6) Koide T, Alesksic B, Yoshimi A, KUSHIMA I, Nakamura Y, Ikeda M, Ohi K, Yasuda Y, Hashimoto R, Inada T, Hiroshi U, Suzuki M, Takeda M, Iwata N, Ozaki N. Association study and expression analysis between MAGI2 and schizophrenia. 19th World Congress of Psychiatric Genetics, Washington D.C., U.S.A. 9.10-14(11), 2011. poster
 - 7) Takeda M, Yamamori H, Hashimoto R. Risk Genes of Cognitive Impairment of Schizophrenia. 3rd World Congress of Asian Psychiatry, Melbourne, Australia, 7.31-8.4(1), 2011. Oral
 - 8) Yamamori H, Hashimoto R, Verral L, Yasuda Y, Ohi K, Fukumoto M, Ito A, Takeda M, Expression Array of Lymphoblasts from Schizophrenic Patients. 3rd World Congress of Asian Psychiatry, Melbourne, Australia, 7.31-8.4(1), 2011. Oral
 - 9) Hashimoto R, Yasuda Y, Ohi K, Fukumoto M, Yamamori H, Takeda M. Dysbindin: Possible target molecule for antipsychotic development. 10th World Congress of Biological Psychiatry, Prague, Czech Republic, 5.29-6.2(30), 2011. invited speaker
 - 10) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H, Takeda M. The KCNH2 Gene Is Associated with Neurocognition and the Risk of Schizophrenia. 10th World Congress of Biological Psychiatry, Prague, Czech Republic, 5.29-6.2(31), 2011. poster
 - 11) Aleksic B, Hashimoto R, Kushima I, Ikeda M, Ujike H, Suzuki M, Inada T, Takeda M, Kaibuchi K, Iwata N, Ozaki N. Analysis of the VAV3 as new candidate gene for schizophrenia: Evidences from voxel based morphometry and mutation analysis. 10th World Congress of Biological Psychiatry, Prague, Czech Republic, 5.29-6.2(1), 2011. poster
 - 12) Koide T, Aleksic B, Ikeda M, Ujike H, Suzuki M, Inada T, Hashimoto R, Takeda M, Iwata N, Ozaki N. Association study and cognitive function analysis of MAGI2 as a candidate gene for schizophrenia. 10th World Congress