

189. 自閉症の全ゲノムコピー数多型解析による発症機序解明

佐藤 大介

北海道大学病院 小児科

Key words : 自閉症スペクトラム障害, マイクロアレイ, SHANK

緒言

自閉症スペクトラム障害は、「対人関係障害」、「コミュニケーション障害」、「常同的・反復的な行動等」の特徴を持つ発達障害で小児 68 人に 1 人の割合で発症し近年増加傾向である。改善はあっても完治せず、家族への負担が大きく社会的に深刻な問題となっている。双生児・家族研究から遺伝的要因の強い関与が判明しているが発症機構は大部分が不明である。コピー数多型 (CNV) は通常 1 kb から数 Mb の長さの微小染色体構造異常でマイクロアレイで検出可能である。CNV の約 5 割は遺伝子を含み対照ゲノムと比較して相対的にコピー数が多い場合 (重複) と少ない場合 (欠失) があり、特に *de novo* CNV と稀少遺伝性 CNV は自閉症スペクトラム障害との関連が強いことが判明している。CNV が遺伝子や遺伝子発現領域を含む事があり遺伝子発現に影響を及ぼすため CNV が自閉症スペクトラム障害発症に強く関与すると考えられており、全ゲノムマイクロアレイ解析は感受性遺伝子同定に有用である。本研究では、先行研究で明らかにした *SHANK* 遺伝子と *NRXN1* 遺伝子領域の CNV 解析を行った。

方法、結果および考察

高解像度マイクロアレイを用いて、自閉症スペクトラム障害の全ゲノム CNV 網羅解析を行った。遺伝子のエクソン欠失や重複を伴い遺伝子機能に影響を及ぼすような CNV を検出後、qPCR でその存在を確認した。候補 CNV の健常人頻度をデータベースで比較し病的 CNV であると考えられたら、その遺伝子の変異解析を行った。また *SHANK* 遺伝子と *NRXN1* 遺伝子領域の既報告の CNV も含めて meta analysis も行った。

1. *SHANK* 遺伝子領域 (*SHANK1*, *SHANK2*, *SHANK3*)

SHANK ファミリータンパク質は *SHANK1*、2、3 遺伝子よりなり神経シナプスで足場タンパク質を構成しており、これまで *SHANK3*^{1,2)} と *SHANK2*³⁾ と *SHANK1*⁴⁾ のいずれの遺伝子も自閉症スペクトラム障害感受性遺伝子であることを報告した。自閉症スペクトラム障害の *SHANK* 遺伝子領域の更なる CNV 頻度を調べるためにこれらの領域の更なる解析及び meta analysis を行った。

まず 19 番染色体の *SHANK1* 領域の更なる解析を行った。先行研究では自閉症スペクトラム障害 1,158 人のマイクロアレイ CNV 解析で大部分のエクソンを伴う CNV (欠失) を *SHANK1* 遺伝子上に一つ検出した。この患者の家系は、計 4 人の男性自閉症患者がおり *SHANK1* CNV は自閉症表現型と共分離した。同 CNV はコントロール 15,122 人で認めなかった。また、別の自閉症 456 人のアレイ解析で 1 人の患者で *SHANK1* エクソン欠失を伴う *de novo* CNV (欠失) を検出した⁴⁾。今回、新たに 306 人の自閉症スペクトラム障害患者と 454 人のコントロールを用いて *SHANK1* 領域の CNV 解析を行ったが *SHANK1* 遺伝子上に新たな欠失や重複等の CNV は検出しなかった。これまでの報告されたデータと集計すると、計 5,657 人中の自閉症スペクトラム障害患者中、2 つの *SHANK1* 遺伝子のエクソンを伴う欠失が検出された (0.04%)。一方、19、163 人のコントロール群では *SHANK1* 領域に CNV を検出しなかった (P = 0.19, OR = 2.73, 95%, CI = 0.60–12.48)³⁾。先行研究では、自閉症スペクトラム障害 509 人で *SHANK1* 遺伝子変異解析で、患者群特異的に計 21 個の新規アミノ酸置換変異を検出し、特にその中の 2 個の遺伝子変異は *SHANK1* 蛋白の重要なドメイン内にあり発症への関与が強く疑われた⁴⁾。今回、自閉症スペクトラム障害 251 人と 492 人のコントロールで *SHANK1* 遺伝子の更なる遺伝子変異解析を行ったが、残念ながら *de novo* の truncating 変異は検出できな

った。しかしながら、計 760 人の患者と 492 人のコントロール群での比較では、稀な遺伝性病変と予想された変異はコントロール群よりも有意に患者群で頻度が高いことが判明した (3.16 % in ASD, 1.02 % in controls, Fisher's exact test two-sided, $P = 0.012$, $OR = 3.17$, 95 % $CI = 1.18-10.72$)⁵⁾。

同様に 11 番染色体上の *SHANK2* 遺伝子の CNV 解析の集計では、5,657 人の自閉症スペクトラム障害のうち 3 つの *de novo* の *SHANK2* 遺伝子のエクソンを伴う欠失を認めた (0.05 %)。一方、19,163 人のコントロールでは *SHANK2* 領域に CNV を認めなかった ($P = 0.076$, $OR = 3.76$, 95 % $CI = 0.87-16.25$)⁵⁾。

22 番染色体上の *SHANK3* 遺伝子の CNV 解析の集計では、5,657 人の自閉症スペクトラム障害のうち 10 個の欠失を認めた (0.18 %)。一方、19,163 人のコントロールでは *SHANK3* 領域に 2 つの欠失を認めた (0.01 %) ($P = 0.019$, $OR = 4.05$, 95 % $CI = 1.26-13.01$)⁵⁾。

2. *NRXN1* 領域の CNV 解析

シナプス前終末に存在する細胞接着分子であるニューロキシンは自閉症スペクトラム障害の感受性遺伝子であることが判明後、2 番染色体上の *NRXN1* 領域の CNV は自閉症スペクトラム障害や統合失調症、精神発達遅滞、注意欠陥多動性障害等で繰り返し報告されており、今回、様々な精神疾患で *NRXN1* 遺伝子に影響を及ぼし得るエクソン欠失を伴う CNV 解析の meta analysis を行った。集計すると 3,632 人の自閉症スペクトラム障害で 15 個の *NRXN1* 遺伝子のエクソンを伴う欠失を認めた。一方、7,719 人のコントロールではエクソンを伴う欠失は認めなかった ($P=3.7 \times 10^{-8}$)。そして、16,618 人の精神疾患群では 42 個のエクソンを伴う欠失を認め、52,690 人のコントロール群で 9 個のエクソンを伴う欠失を認め有意な結果が得られた ($OR 14.8$, 95 % $CI 7.2-30.5$, $P=2.4 \times 10^{-18}$)。

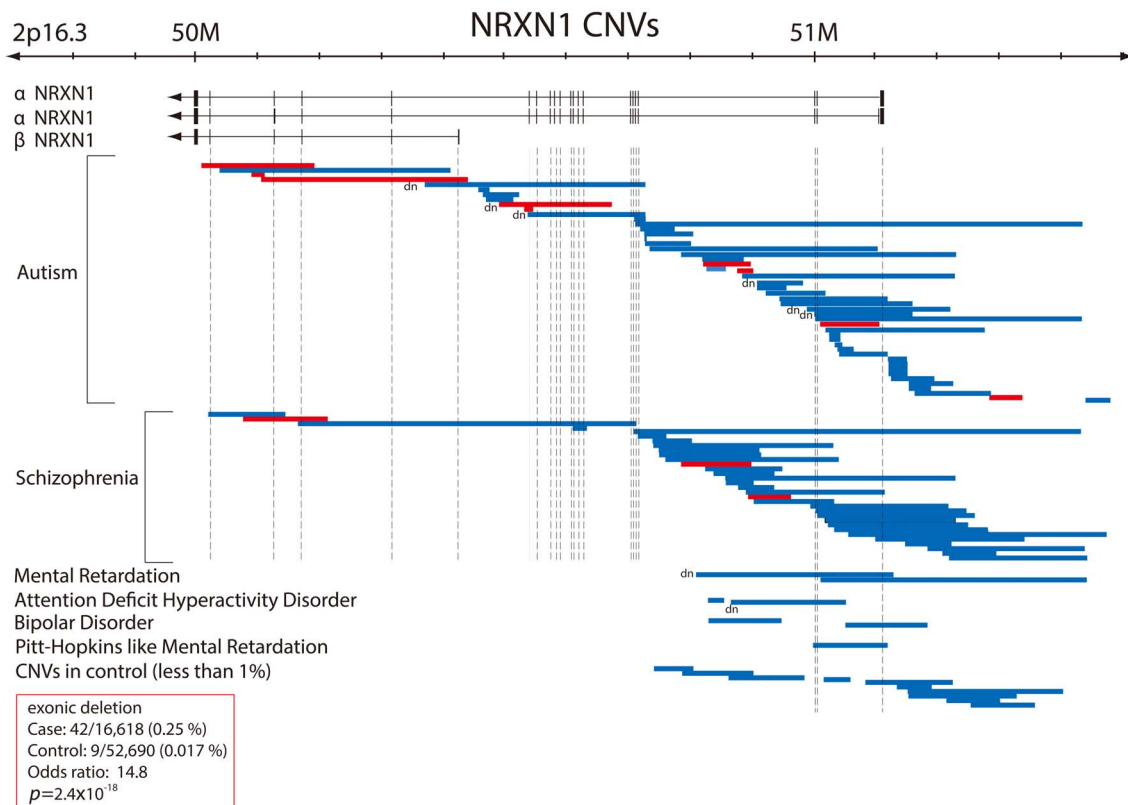


図 1. *NRXN1* 領域の CNV 解析

水平青色線は欠失、水平赤色線は重複、垂直の点線は *NRXN1* 遺伝子のエクソン。dn: *de novo*。

以上の結果より、シナプスに発現する *SHANK* 遺伝子と *NRXN1* 遺伝子の自閉症スペクトラム障害における CNV 頻度を確認することができた。自閉症スペクトラム障害は早期発見・療育で、その後の成育が良好になることが知られて

おり、これらの感受性遺伝子を含め、自閉症ゲノム診断に応用できれば、早期診断、療育に寄与する可能性がある。今後も更なる CNV 解析や動物モデル等を用いて病態解明に取り組みたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、Stephen W. Scherer (The Centre for Applied Genomics, The Hospital for Sick Children and the University of Toronto McLaughlin Centre, Toronto, Canada) と Thomas Bourgeron (Institut Pasteur, Human Genetics and Cognitive Functions Unit, Paris, France) です。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsäter H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Rogé B, Héron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet.* 2007 Jan;39(1):25-7. Epub 2006 Dec 17. PMID: 17173049. DOI: 10.1038/ng1933.
- 2) Moessner R, Marshall CR, Sutcliffe JS, Skaug J, Pinto D, Vincent J, Zwaigenbaum L, Fernandez B, Roberts W, Szatmari P, Scherer SW. Contribution of SHANK3 mutations to autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet.* 2007 Dec;81(6):1289-97. Epub 2007 Oct 16. PMID: 17999366. DOI: 10.1086/522590.
- 3) Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, Anney R, Merico D, Regan R, Conroy J, Magalhaes TR, Correia C, Abrahams BS, Almeida J, Bacchelli E, Bader GD, Bailey AJ, Baird G, Battaglia A, Berney T, Bolshakova N, Bölte S, Bolton PF, Bourgeron T, Brennan S, Brian J, Bryson SE, Carson AR, Casallo G, Casey J, Chung BH, Cochrane L, Corsello C, Crawford EL, Crossett A, Cytrynbaum C, Dawson G, de Jonge M, Delorme R, Drmic I, Duketis E, Duque F, Estes A, Farrar P, Fernandez BA, Folstein SE, Fombonne E, Freitag CM, Gilbert J, Gillberg C, Glessner JT, Goldberg J, Green A, Green J, Guter SJ, Hakonarson H, Heron EA, Hill M, Holt R, Howe JL, Hughes G, Hus V, Iglizoi R, Kim C, Klauck SM, Kolevzon A, Korvatska O, Kustanovich V, Lajonchere CM, Lamb JA, Laskawiec M, Leboyer M, Le Couteur A, Leventhal BL, Lionel AC, Liu XQ, Lord C, Lotspeich L, Lund SC, Maestrini E, Mahoney W, Mantoulan C, Marshall CR, McConachie H, McDougle CJ, McGrath J, McMahon WM, Merikangas A, Migita O, Minshew NJ, Mirza GK, Munson J, Nelson SF, Noakes C, Noor A, Nygren G, Oliveira G, Papanikolaou K, Parr JR, Parrini B, Paton T, Pickles A, Pilorge M, Piven J, Ponting CP, Posey DJ, Poustka A, Poustka F, Prasad A, Ragoussis J, Renshaw K, Rickaby J, Roberts W, Roeder K, Roge B, Rutter ML, Bierut LJ, Rice JP, Salt J, Sansom K, Sato D, Segurado R, Sequeira AF, Senman L, Shah N, Sheffield VC, Soorya L, Sousa I, Stein O, Sykes N, Stoppioni V, Strawbridge C, Tancredi R, Tansey K, Thiruvahindrapuram B, Thompson AP, Thomson S, Tryfon A, Tsiantis J, Van Engeland H, Vincent JB, Volkmar F, Wallace S, Wang K, Wang Z, Wassink TH, Webber C, Weksberg R, Wing K, Wittmeyer K, Wood S, Wu J, Yaspan BL, Zurawiecki D, Zwaigenbaum L, Buxbaum JD, Cantor RM, Cook EH, Coon H, Cuccaro ML, Devlin B, Ennis S, Gallagher L, Geschwind DH, Gill M, Haines JL, Hallmayer J, Miller J, Monaco AP, Nurnberger JI Jr, Paterson AD, Pericak-Vance MA, Schellenberg GD, Szatmari P, Vicente AM, Vieland VJ, Wijsman EM, Scherer SW, Sutcliffe JS, Betancur C. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature.* 2010 Jul 15;466(7304):368-72. doi: 10.1038/nature09146. Epub 2010 Jun 9. PMID: 20531469.
- 4) Sato D, Lionel AC, Leblond CS, Prasad A, Pinto D, Walker S, O'Connor I, Russell C, Drmic IE, Hamdan FF, Michaud JL, Endris V, Roeth R, Delorme R, Hugué G, Leboyer M, Rastam M, Gillberg C, Lathrop M, Stavropoulos DJ, Anagnostou E, Weksberg R, Fombonne E, Zwaigenbaum L, Fernandez BA, Roberts W, Rappold GA, Marshall CR, Bourgeron T, Szatmari P, Scherer SW. SHANK1 Deletions in Males with Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet.* 2012 May 4;90(5):879-87. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.03.017. Epub 2012 Apr 12. PMID: 22503632.
- 5) Leblond CS, Nava C, Polge A, Gauthier J, Hugué G, Lumbroso S, Giuliano F, Stordeur C, Depienne C, Mouzat K, Pinto D, Howe J, Lemièrre N, Durand CM, Guibert J, Ey E, Toro R, Peyre H, Mathieu A, Amsellem F, Rastam M, Gillberg IC, Rappold GA, Holt R, Monaco AP, Maestrini E, Galan P, Heron D, Jacqueline A, Afenjar A, Rastetter A, Brice A, Devillard F, Assouline B, Laffargue F, Lespinasse J, Chiesa J, Rivier F, Bonneau D, Regnault B, Zelenika D, Delepine M, Lathrop M, Sanlaville D, Schluth-Bolard C, Edery P, Perrin L, Tabet AC, Schmeisser MJ, Boeckers TM, Coleman M, Sato D, Szatmari P, Scherer SW, Rouleau GA, Betancur C, Leboyer M, Gillberg C, Delorme R, Bourgeron T. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet.* 2014 Sep 4;10(9):e1004580. doi: 10.1371/journal.pgen.1004580. eCollection 2014. PMID: 25188300.