81　自閉スペクトラム症と注意欠如・多動性障害の遺伝研究	中村　和彦

【目的】自閉スペクトラム症（Autism Spectrum Disorder: ASD）は有病率の上昇により臨床的にも注目されている神経発達障害の一つで、診断基準は現在なお流動的である。今回の診断基準改訂において主症状が二つにカテゴリー化された。一つは社会的コミュニケーションともう一つは限局された反復的な行動であり、この二つが揃って初めて ASD と診断される。しかしながら、全く相互関係のない異なる症状の二つが融合することで疾病が成り立つことは病態学的に未解明である。我々が得た過去の研究結果より、ASD は二つの疾患の合併症であり、それらは遺伝学的要因が決定し、環境要因は症状の重症度に関与するとの仮説を考案した。また先行研究における Genome-Wide Association Study の結果では、欧米人サンプルにアジア人サンプルを含んで解析すると有意差がなくなることから、本研究では、コミュニティーベースドの日本人サンプルを用いて、特徴的なコピー数異常領域を見出すことを目的とした。

【方法】遺伝学的研究を行うにあたり、コミュニティーベースドかつ後天的な影響の少ない 5 歳児の健常者 129（男児：64、女児：65）名、ASD 患者 67（男児：43、女児：24）名の末梢血由来ゲノム DNA を用いて、Affymetrix Genome-Wide Human SNP6.0 キットによる Copy Number Variation（CNV）解析を行った。サンプルデータは Penn CNV および Partek Genomics Suite7.0 を用いて、隠れマルコフモデルにより Copy Number を推定し、CN = 2 以外をコピー数異常領域とした。健常者と比較して ASD 患者群においてコピー数異常が見られた領域は、Chi-squared test により算出し、$P < 0.05$ で有意差ありと見なした。

【結果】欧米人を対象とした先行研究では、健常者と比較して ASD 患者 1 人あたりのコピー数異常領域の箇所が多いことが報告されていたが、我々の研究では、健常者 37.8（男児：38.2、女児：37.4）箇所、ASD 患者 37.4（男児：38.0、女児：36.8）箇所と有意差は認められなかった（$P = 0.466$）。また、下記に示すようなゲノム領域において ASD 患者で有意にオッズ比が高いコピー数異常領域を検出した。欧米人を対象とした CNV 解析では、いずれの領域も ASD 患者では高い頻度でコピー数異常があることが報告されており、日本人においても共通のコピー数異常領域があることが明らかになった。先行研究の場合オッズ比が 1.2～1.6 と小さいが、日本人を対象とした本研究の結果ではオッズ比が 2.0～3.5 と比較的高い値を示したことから、日本人においては ASD 発症により関わるコピー数異常領域であることが示唆された。

日本人 ASD 患者に特徴的なコピー数異常領域

染色体	領域	CNV タイプ	健常者該当者数（人/129 人）	ASD 患者該当者数（人/67 人）	オッズ比	*P*- value
chr12	q21.31~ q21.33	deletion	11 (8.53%)	15 (22.39%)	2.63	0.013
chr4	q13.2	duplication	8 (6.2%)	12 (17.91%)	2.89	0.02
chr8	p23.1	deletion-duplication	5 (3.88%)	9 (13.43%)	3.47	0.03
chr18	q12.3	deletion-duplication	15 (11.62%)	16 (23.88%)	2.05	0.043

81. 自閉スペクトラム症と注意欠如・多動性障害の遺伝研究

中村　和彦

弘前大学 大学院医学研究科 神経精神医学講座

Key words：自閉スペクトラム症(ASD)，注意欠如・多動性障害(AD/HD)，CNV 解析，コピー数異常

緒　言

自閉スペクトラム症（Autism Spectrum Disorder: ASD）は、有病率の上昇により臨床的にも注目されている神経発達障害の一つで診断基準は現在なお流動的で、今回の診断基準改訂においては主症状が二つにカテゴリー化された。一つは社会的コミュニケーションともう一つは限局された反復的な行動である。この二つが揃って初めて ASD と診断される。しかしながら、全く相互連関のない異なる症状の二つが融合することで疾病が成り立つことであり病態学的には未解明である点に着目した。

ASD は遺伝学的要因が大きいと考えられてきたが、遺伝学的要因と ASD 症状との関連は明らかになっていないため、我々は遺伝学的研究と画像学的研究を進めてきた。遺伝学的研究は ASD 関連遺伝子を見つけるために、ASD のトリオサンプル 200 家族（本人、父、母）を集積し、各種関連遺伝子を検索し、ASD 関連遺伝子を各種報告した［1〜4］。近年の研究では自閉症関連遺伝子の数は 1007 個あると報告されている（SFARI GENE、2018 年 4 月現在)。そして画像研究では ASD のセロトニン系の障害に注目し、帯状回におけるセロトニン系の障害と ASD の社会的コミュニケーション障害との相関があり、視床のセロトニン系の障害と ASD の限局された反復的な行動との相関があるとの報告を行った［5］。さらに脳内ミクログリアの活性が高いほど社会的コミュニケーション障害の重症度が高いことを明らかにした［6］。以上の研究成果から我々は ASD が二つの障害の合併であり、それらは遺伝学的要因が決め、環境要因は症状の重症度に関与するとの仮説を考案した。

さらに我々は ASD の発症に関する 2 ヒットモデルを適応し、ASD になりやすい家族性の common variants が 1 ヒット目であり、それに 2 ヒット目として、個々の ASD の *de novo* 遺伝子変異があると考えた。そして今までの Genome-Wide Association Study（GWAS）研究において、対象症例を多くしても、オッズ値が上がらず、さらに欧米人 ASD サンプルの中に、アジア人 ASD サンプルを含むと有意差がなくなるとのことより、実際の研究では欧米人 ASD に集約して研究が行われている。したがって、欧米人 ASD とアジア人 ASD については、GWAS 研究における common variant における共通性よりは、ASD の個々の *de novo* 変異の起こり方が欧米人 ASD とアジア人 ASD 異なると推測できるため、コミュニティーベースドの日本人を対象として遺伝学的研究を行った。

本研究では、コミュニティーベースドの 5 歳児に対して、コホート調査を実施し ASD の有病率や併存症を明らかにし、また ASD 患者の CNV 解析による遺伝学的な探索を行う。また、欧米人と比較して特徴的なコピー数異常ゲノム領域が認められるかを明らかにし、さらにコミュニティーベースドサンプルにおける ASD 診断の有効性について検討する。

方　法

アメリカ神経学会 American Academy of Neurology（AAN）が推奨した 2 段階のアルゴリズムに従って表 1 に示す診断プロトコルを作成した。

表 1. 各発達障害の診断プロトコル

疾患名	診断基準	使用した診断ツール
ASD	DSM-V, ADOS-2, ADI-R	**DISCO-11**：:The Diagnostic Interview for Social and Communication Disorders **SP**：Sensory profile **AQ**：,Autism-Spectrum Quotient **PARS-TR** short version：Pervasive Developmental Disorders Autism Society Japan Rating Scale Text-Revision **SCQ**：Social Communication Questionnaire
AD/HD	DSM-V	Parents' **Conners3**：Conners 3rd Edition
DCD	DSM-V, EACD	**MABC-2**：Movement Assessment Battery for Children, Total score ≦ 16 percentile (7 points)
ID/BI	DSM-V, Vineland-II	FSIQ of **WISC-IV**：Wechsler Intelligence Scale for Children Fourth Edition ID:FSIQ<70,BIF:70≤FSIQ<80

Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder, DCD：Developmental Coordination Disorder,
ID/BI：Intellectual Disability / Borderline intelligence

CNV 解析では、健常者 129（男児：64、女児：65）名、ASD 患者 67（男児：43、女児：24）名を対象とした。被験者から末梢血を採取しゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA は精製度や断片化の有無を確認したのち、Affymetrix Genome-Wide human SNP6.0 キットを用いて、CNV 解析を行った。Penn CNV によるコピー数異常の検出には、QC（Quality Control）: 0.4 < かつ MAPD（the Median of the Absolute values of all Pairwise Differences）: < 0.4 をみたしたサンプルのみを用いた。また、隠れマルコフモデルにより Copy Number を推定し、CN = 2 以外をコピー数異常領域とした。健常者と比較して ASD 患者群においてコピー数異常が見られた領域は、Chi-squared test により算出し、P< 0.05 で有意差ありと見なした。

結果および考察

1. コホート調査による ASD 有病率とその他発達障害との併存症調査

コミュニティーベースドの 5 歳児における ASD の有病率は 3.3%であり、ASD の 60.0%に AD/HD、61.1%に DCD、40.0%に知的障害か境界知能の併存（重複も含む）が確認された。文化的に最も近い韓国の 7～12 歳の疫学調査［7］において、有病率は 2.64%であり、割合の検定では我々の結果と有意差はなかった。

表 2. コミュニティーベースドサンプルにおける ASD 有病率とその他の発達障害併存率

平均月齢(月)	ASD 有病率	AD/HD 併存率	DCD 併存率	ID/BI 併存率
63	3.3%	60.0%	61.1%	40.0%

被験者の平均月齢とASD有病率、その他の発達障害との併存率を示した。

2. ASD 患者における特徴的なコピー数異常ゲノム領域の検出

欧米人を対象とした先行研究では、健常者と比較して ASD 患者 1 人あたりのコピー数異常領域の箇所が多いことが報告されていたが、我々の研究では、健常者 37.8（男児：38.2、女児：37.4）箇所、ASD 患者 37.4（男児：38.0、女児：36.8）箇所と有意差は認められなかった（Student's t-test, $P = 0.466$）。また、表 3 に示すようなゲノム領域において ASD 患者で有意にオッズ比が高いコピー数異常領域を検出した。欧米人を対象とした CNV 解析では、本研究で明らかになったいずれの領域もコピー数異常があることが複数報告されており［8～10］、日本人においても欧米人と共通のコピー数異常ゲノム領域が原因であることが明らかになった。しかしながら、先行研究の場合オッズ比が 1.2～1.6 と小さい一方で、日本人を対象とした本研究の結果ではオッズ比が 2.0～3.5 と比較的高い値を示したことから、日本人においては ASD 発症により関わるコピー数異常ゲノム領域であることが示唆された。12q21.31～q21.33 には遺伝子が含まれておらず、4q13.2 には *UBA6*、8p23.1 には *MCPH1* と *PINX1*、18q12.3 には *RIT2* と *SETBP2* が含まれている。これらの遺伝子の点突然変異は rare ではあるが、ASD と関連していることが知られている。以上のコピー数異常ゲノム領域や遺伝子が日本人 ASD において重要な発症要因となっているかは今後検討する予定である。

表 3. コミュニティーベースドサンプルにおける日本人 ASD 患者の特徴的なコピー数異常ゲノム領域

染色体	領域	CNV タイプ	健常者該当者数（人/129 人）	ASD 患者該当者数（人/67 人）	オッズ比	*P*- value
chr12	q21.31~ q21.33	deletion	11 (8.53%)	15 (22.39%)	2.63	0.013
chr4	q13.2	duplication	8 (6.2%)	12 (17.91%)	2.89	0.02
chr8	p23.1	deletion-duplication	5 (3.88%)	9 (13.43%)	3.47	0.03
chr18	q12.3	deletion-duplication	15 (11.62%)	16 (23.88%)	2.05	0.043

コミュニティーベースドで集積した日本人ASD患者に特徴的なゲノム領域、CNVタイプ、健常者およびASD患者（合併症含む）における該当者数とその割合、オッズ比、*P*-valueを示した。deletionはCN＝0または1、duplicationはCN＝3または4を示している。*P*-valueの算出にはChi-squared testを用い、$P < 0.05$を満たしたものを表に示した。

3. コピー数異常ゲノム領域によるASD診断の有効性検討

2で明らかにしたコピー数異常ゲノム領域をもとにして、コミュニティーベースドサンプルにおけるASD診断が可能かを検討した。個々のASD患者が共通のコピー数異常領域があるかを検討したが、被験者数およびASD患者における特徴的なコピー数異常ゲノム領域が少なかったこともあり十分な検出力は得られなかった。また、健常者と共通のコピー数異常ゲノム領域を保持しているASD患者も多いため、ASD患者におけるコピー数異常ゲノム領域の共通性あるいはそれらの組み合わせを利用したASD診断は有効ではないことが明らかになった。

共同研究者

本研究の共同研究者は、弘前大学大学院医学研究科脳神経生理学講座の上野伸哉、神経精神医学講座の斉藤まなぶである。

文 献

1) Takata A, Miyake N, Tsurusaki Y, Fukai R, Miyatake S, Koshimizu E, Kushima I, Okada T, Morikawa M, Uno Y, Ishizuka K, Nakamura K, Tsujii M, Yoshikawa T, Toyota T, Okamoto N, Hiraki Y, Hashimoto R, Yasuda Y, Saitoh S, Ohashi K, Sakai Y, Ohga S, Hara T, Kato M, Nakamura K, Ito A, Seiwa C, Shirahata E, Osaka H, Matsumoto A, Takeshita S, Tohyama J, Saikusa T, Matsuishi T, Nakamura T, Tsuboi T, Kato T, Suzuki T, Saitsu H, Nakashima M, Mizuguchi T, Tanaka F, Mori N, Ozaki N, Matsumoto N. Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. Cell Rep. 2018 Jan 16;22(3):734-747. PubMed PMID: 29346770 DOI:10.1016/j.celrep.2017.12.074

2) Morimura N, Yasuda H, Yamaguchi K, Katayama KI, Hatayama M, Tomioka NH, Odagawa M, Kamiya A, Iwayama Y, Maekawa M, Nakamura K, Matsuzaki H, Tsujii M, Yamada K, Yoshikawa T, Aruga J. Autism-like behaviours and enhanced memory formation and synaptic plasticity in Lrfn2/SALM1-deficient mice. Nat Commun. 2017 Jun 12;8:15800. PubMed PMID: 28604739 DOI: 10.1038/ncomms15800

3) Shimamoto C, Ohnishi T, Maekawa M, Watanabe A, Ohba H, Arai R, Iwayama Y, Hisano Y, Toyota T, Toyoshima M, Suzuki K, Shirayama Y, Nakamura K, Mori N, Owada Y, Kobayashi T, Yoshikawa T. Functional characterization of FABP3, 5 and 7 gene variants identified in schizophrenia and autism spectrum disorder and mouse behavioral studies. Hum Mol Genet. 2014 Dec 15;23(24):6495-511. PubMed PMID: 25027319 DOI:10.1093/hmg/ddu369

4) Anitha A, Thanseem I, Nakamura K, Vasu MM, Yamada K, Ueki T, Iwayama Y, Toyota T, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Suzuki K, Sugiyama T, Tsujii M, Yoshikawa T, Mori N. Zinc finger protein 804A (ZNF804A) and verbal deficits in individuals with autism. J Psychiatry Neurosci. 2014 Sep;39(5):294-303. PubMed PMID: 24866414

5) Nakamura K, Sekine Y, Ouchi Y, Tsujii M, Yoshikawa E, Futatsubashi M, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Iwata Y, Suzuki K, Matsuzaki H, Suda S, Sugiyama T, Takei N, Mori N. Brain serotonin and dopamine transporter bindings in adults with high-functioning autism. Arch Gen Psychiatry. 2010 Jan;67(1):59-68. PubMed PMID: 20048223 DOI:10.1001/archgenpsychiatry.2009.137

6) Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Futatsubashi M, Takebayashi K, Yoshihara Y, Omata K, Matsumoto K, Tsuchiya KJ, Iwata Y, Tsujii M, Sugiyama T, Mori N. Microglial activation in young adults with autism spectrum disorder. JAMA Psychiatry. 2013 Jan;70(1):49-58. PubMed PMID: 23404112 DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2013.272

7) Kim YS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EC, Cheon KA, Kim SJ, Kim YK, Lee H, Song DH, Grinker RR. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. Am J Psychiatry. 2011 Sep;168(9):904-12. PubMed PMID: 21558103.DOI:10.1176/appi.ajp.2011.10101532

8) Poultney CS, Goldberg AP, Drapeau E, Kou Y, Harony-Nicolas H, Kajiwara Y, De Rubeis S, Durand S, Stevens C, Rehnström K, Palotie A, Daly MJ, Ma'ayan A, Fromer M, Buxbaum JD. Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. Am J Hum Genet. 2013 Oct 3;93(4):607-19. PubMed PMID: 24094742 DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.09.001

9) Pinto D, Pagnamenta AT, Betancur C. et al, Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. Nature. 2010 Jul 15;466(7304):368-72. PubMed PMID: 20531469 DOI:10.1038/nature09146.

10) Nava C, Keren B, Mignot C, Rastetter A, Chantot-Bastaraud S, Faudet A, Fonteneau E, Amiet C, Laurent C, Jacquette A, Whalen S, Afenjar A, Périsse D, Doummar D, Dorison N, Leboyer M, Siffroi JP, Cohen D, Brice A, Héron D, Depienne C. Prospective diagnostic analysis of copy number variants using SNP microarrays in individuals with autism spectrum disorders. Eur J Hum Genet. 2014 Jan;22(1):71-8. PubMed PMID:23632794 DOI: 10.1038/ejhg.2013.88