

## 論文の内容の要旨

日本人サンプルを用いた 15 番染色体長腕領域における  
自閉症感性候補遺伝子の検討

指導教員 笠井 清登 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

加藤 千枝子

### ○はじめに

自閉症は(1)社会的な相互交渉の質的な障害、(2)コミュニケーション機能の質的な障害、(3)活動と興味の範囲の著しい限局性の 3 つを主な特徴とする脳の発達障害である。広義に捉えると児童 100 人に約 1 人が該当する。男女比は、4:1 で男児に多い。自閉症発症のメカニズムはまだ不明であるが遺伝要因が関与することは遺伝疫学的検討から明らかである。罹患一致率が一卵性双生児で 60~90%、二卵性双生児で 0~24%というのが多くの研究の見解であり、このような知見をもとに連鎖研究や関連研究などの手法により自閉症の原因遺伝子の探索が数多く行われてきている。しかし、明らかな

原因遺伝子の同定には至っていない。その理由の一つとして、自閉症が複数の遺伝子が関与する複雑疾患であることが考えられる。つまり、複数の疾患感受性遺伝子の変異が小さな寄与をすることにより質的形質としての罹病性が規定され、これに環境要因が加わって発症するというモデルである。民族により感受性遺伝子が異なる可能性もある為、海外で行われた研究結果を単純に日本人に当てはめることが必ずしも正しいとは限らないが、日本人における大規模なゲノム解析が行われるだけの対象を得ることは容易ではなく、海外での報告を参考に本研究を行った。

本研究では、自閉症との関連が示唆されているいくつかの候補領域の中から染色体変異を示す症例が最も多く報告されており、さらに自閉症様症状を現す Angelman syndrome (AS)における染色体異常の領域でもある 15番染色体長腕領域(15q11-q13)に着目した。15q11-q13 領域には父性発現遺伝子のある large proximal domain (~2Mb)と母性発現遺伝子のある maternal expression domain (MED; ~500kb)とどちらの親由来でも発現する遺伝子のある domain (~2Mb)がある。前者 2つの領域にあるインプリンティング遺伝子の発現は *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N) プロモーター領域にある imprinting center (IC)によって制御されている。MED には 2つのインプリンティング遺伝子 (*UBE3A* と *ATP10C*) が位置しており、どちらの親由来でも発現する遺伝子として GABA 受容体遺伝子 *GABRB3*、*GABRA5*、*GABRG3* がある。*UBE3A* は ubiquitin-protein

ligase E3A をコードしており、AS の発症に関与している。*ATP10C* 遺伝子産物はアミノリン酸脂質を輸送する ATP 分解酵素で、細胞膜の整合性の維持に関与しており、中枢神経系における細胞シグナリングに重要な役割を持つ。*GABRB3*、*GABRA5*、*GABRG3* は自閉症者の海馬で GABA 受容体の密度の減少がみられることや自閉症者で GABA 作動性の抑制反応の低下がみられることから自閉症研究において注目されている。そこで、本研究では MED と IC にある 41 SNPs についてと GABA 受容体遺伝子領域にある 11 SNPs について解析し、これらと自閉症との関連を検討した。

#### ○対象と方法

対象は疾患群 133 人（男性 115 人、女性 18 人）と健常群 191 人（男性 66 人、女性 125 人）である。自閉症の診断は 2 人の児童精神科医が診察し、両親からのインタビューを元に DSM-IV の診断基準に基づいて行った。健常群は面接と問診、性格・生活習慣に関する質問紙による調査を行い、自閉症スペクトラム障害や主要な精神疾患および身体疾患に罹患していないことを確認した。

なお、研究実施に当たって、東京大学大学院医学系研究科・医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を受け、被験者（必要時は保護者）に研究内容についての口頭・文書による説明と書面による同意を得た。

DNA は被験者の末梢血リンパ球からフェノールクロロホルム法により抽出した。ABI PRISM 7900HT で解析可能な Assay-on-Demand™ の SNPs から MED と IC を含む領域にある 41 SNPs と GABA 受容体領域にある 11SNPs について ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems、CA)で解析した。これらのうち多型が認められなかった 10SNPs については続く統計解析からは除外し、残りの SNPs について SNP 解析ソフト HaploView を使って各 SNPs の対立遺伝子頻度を比較した。連鎖不平衡度は  $D'$  で計算し、ハプロタイプブロックを調べその頻度を比較した。また、統計解析ソフト Statcel を使って各 SNPs の遺伝子型頻度を  $\chi^2$  検定で比較した。さらに、MED 領域にある SNPs については TDT 解析を HaploView を使って行った。

## ○結果と考察

### (1)MED 領域

対象全体で対立遺伝子頻度に有意な差はみられなかった。SNP8 (rs7164989)の遺伝子型分布に有意差を認めた ( $p=0.0235$ )。5つのハプロタイプブロックが認められたがどのハプロタイプブロックも有意差はなかった。対象を男性に限定すると対立遺伝子頻度には有意な差は認められず、遺伝子型頻度については SNP15 (rs1549477)と SNP16 (rs1549478)についてそれぞれ  $p=0.0460$ 、 $p=0.0323$  の有意差を示した。4つのハプロタイプブロックを認めた

がどのハプロタイプブロックも有意差はなかった。個々の検定で認められた有意差は多重検定の特異性を考慮するとすべて消失した。

対象全体における TDT 解析により SNP5 (rs4474655)と SNP3 (rs28687287)について有意差が認められた(permutation test  $p=0.00330$ 、 $0.0420$ )。対象を男性に限定すると SNP5、SNP3、SNP25 (rs4906629)、SNP28 (rs17637170)の 4SNPs で有意差が認められた(permutation test  $p=0.000300$ 、 $0.00160$ 、 $0.0113$ 、 $0.0326$ )。これらについても同様に多重検定の特異性を考慮すると有意差は消失した。

SNP3、5、8 は *SNRPN* と *SNRPN* upstream reading frame (*SNURF*) の intron region にあり、*SNRPN* はその下流が *UBE3A* とアンチセンスでオーバーラップしている。*SNRPN* は父親由来染色体から転写されるインプリンティング遺伝子であり、母親由来染色体からのみ発現する *UBE3A* の発現を調節している。本研究では、*UBE3A* にある SNPs と自閉症に関連は認めなかったが、*SNRPN* にある SNPs では関連がある傾向を示した。*SNRPN* による発現調節を介して *UBE3A* が自閉症の発症に直接的に関与している可能性がわずかだが示唆される。

SNP25 と SNP28 は *ATP10C* の intron region にある。*ATP10C* は aminophospholipid-transporting ATPases のサブファミリーで二重膜をはさんだアミノリン脂質の輸送に関わっており、AS の原因遺伝子であることがわかっている。AS が自閉症様症状を示すことからこれらの SNPs が自閉症に関係し

ている可能性がある。

## (2)GABA 受容体領域

対象全体でも男性限定でも対立遺伝子頻度や遺伝子型頻度、ハプロタイプブロックについて有意な差が認められた SNP やハプロタイプブロックはなかった。

本研究では *GABRB3*、*GABRA5*、*GABRG3* と自閉症は関連がないことがわかった。

本研究にはいくつかの問題点がある。研究全体において健常対照群は疾患群と年齢・性別が一致していない。しかし、双生児研究や家族研究、ならびに自閉症の発症年齢が極めて低いことから考えて自閉症の診断確定への出生後の環境要因の寄与は主たるものとは考えられないので年齢の差は大きな問題とはならないと考えられる。男女比については、自閉症が女性より男性に多いことから対象を男性に限定をして解析を行ったが、全体での結果とほぼ同じ結果が得られた。なお、自閉症の診断方法については、本研究ではその日本語版がなかったことから Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS) や Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) を用いていないが、最初の診断から6ヶ月のフォローを行っており-診断の信頼性は十分高いと考えている。

## ○考察

本研究では、自閉症感受性領域と考えられている 15 番染色体長腕領域 (15q11-q13) と自閉症との関連について、日本人を対象に検討した。まず 15q11-q13 領域で母親由来染色体の重複が繰り返し確認されている MED とその上流にある IC 領域を検討した。MED にある *UBE3A* と自閉症の関連は認めなかったが、*UBE3A* の発現を調節している *SNRPN* の SNPs では関連がある傾向を認め、*SNRPN* による発現調節を介して *UBE3A* が自閉症発症に間接的に関与していることが示唆される。

また、15q11-q13 領域にあり、海外で自閉症感受性遺伝子として報告されている *GABRB3*、*GABRA5*、*GABRG3* について日本人を対象に検討したが、本研究では関連は認められなかった。

これらの所見はまだ予備的なものであり、今後更なる検討が必要である。