

## 自閉スペクトラム症を対象とした全ゲノムシーケンス解析による遺伝要因の解明

久島 周

名古屋大学医学部附属病院ゲノム医療センター  
名古屋大学大学院医学系研究科 精神医学分野

### 【研究の背景】

自閉スペクトラム症 (ASD) の発症には遺伝要因が強く関与することが知られている。我々は、これまで効果サイズが大きく、頻度の稀なバリエーションに着目した解析から、発症に関連するゲノムコピー数バリエーション (CNV) を同定したうえで、ASD の分子病態や関連する臨床的特徴を明らかにしてきた<sup>1)</sup>。一方で、効果の強い CNV が同定されるのは、患者の一部に過ぎない。近年のゲノム解析技術の発展により、ヒトゲノムの DNA 配列を全て解読する全ゲノムシーケンス解析 (whole genome sequencing (WGS) 解析) が研究領域で広く活用されつつある<sup>2, 3)</sup>。その結果、一塩基バリエーション (SNV) や CNV を含む多種類のバリエーションを効率的に検出することが可能になった。本研究では、ASD のトリオ家系を対象に WGS 解析を行い、発症に関わるバリエーションを同定することを目指した。

### 【目 的】

ASD 患者および両親を対象に WGS 解析を行い、発症に関わるリスクバリエーションを同定する。さらに、バリエーションを有する患者の臨床的特徴を明らかにする。

### 【方 法】

ASD 患者を含む 40 トリオ家系を対象に WGS 解析を実施した。ASD 患者とその両親の末梢血あるいは唾液からゲノム DNA を抽出した。次に、抽出 DNA を Illumina の TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit でライブラリーを作製した。作製したライブラリーを Illumina NovaSeq6000 シーケンサーでシーケンス解析を行った。シーケンスで得られたリードは、30x 以上の平均カバレッジが得られるようにした。CNV の検出には CNVkit を使い、SNV と INDEL の検出には GATK (Genome Analysis Toolkit) の HaplotypeCaller を使用した。シーケンスデータの解析では、患者のシーケンスデータを両親のシーケンスデータと照合することで、de novo の SNV およびゲノムコピー数バリエーション (CNV) を検出した。さらに、得られたバリエーションが自閉スペクトラム症との関連が報告されているものであるかどうかを調べ、リスクバリエーションの候補を同定した。さらに、これらのバリエーションを有する患者の臨床表現型についても調査を行った。

### 【結 果】

ASD 患者を含む 40 トリオ家系の WGS 解析を実施した結果、既知の ASD 関連遺伝子に de novo の非同義的バリエーションを 5 個同定した。具体的には、4 つのミスセンスバリエーション (*MCM6* P149S、*KMT2C* E3717D、*CLTC* V727A、*PTEN* L320S) と *CHD7* のナンセンスバリエーション (W2090\*) が含まれる。*MCM6* (minichromosome maintenance complex component 6) は DNA 複製の開始を調節する MCM 複合体の一部を構成する。*KMT2C* (Lysine (K)-specific methyltransferase 2C) はヒストンタンパク質 (DNA が巻き付いているタンパク質) 上のリシン残基にメチル基を付加することで、遺伝子の発現を調節する。*CLTC* (clathrin heavy chain) はクラスリン重鎖 1 をコードし、細胞内輸送、エンドサイトーシス、細胞分裂中の染色体の配列、および発達中の脳での神経伝達におけるシナプス小胞のリサイクルと放出に関与する。*PTEN* (phosphatase and tensin homolog) は、

タンパク質脱リン酸化酵素であり、細胞成長、分裂、生存における重要な調節因子として知られる。3 つのミスセンスバリエント (*MCM6* P149S、*CLTC* V727A、*PTEN* L320S) は SIFT あるいは PolyPhen を用いた *in silico* 解析で有害な効果があると判定された。

*MCM6* P149S をもつ ASD 患者 (男性) は、言葉の発達の遅れ、オウム返し、視線が合わないといった ASD の臨床的特徴に加え、先天性網膜上腫瘍、眼振を認めた。*PTEN* の L320S を有する ASD 患者 (10 代男性) は、重度知的能力障害、右耳難聴、巨頭、耳介低位といった特徴を持っていた。有意語なく、簡単な言語指示は理解できるが、相互的な対人交流はなく、著明な感覚過敏を示した。*CHD7* の W2090\* を有する ASD 患者は、知的能力障害に加え、動脈管開存症、耳介変形、難聴を認め、特にコミュニケーションが苦手であった。

ASD との関連が報告されている病的 CNV については、3 例の ASD 患者において合計 4 個同定した。すなわち、16p12.1 欠失、15q11.2-q13.1 重複、1q21.1 重複 + 15q11.2 欠失が含まれる。このうち、16p12.1 欠失、15q11.2-q13.1 重複、15q11.2 欠失は、片親由来であることを確認した。

16p12.1 欠失をもつ ASD 患者 (10 代女性) は ADHD を併存し、多動が目立つが、知的発達の遅れはなかった。15q11.2-q13.1 重複の ASD 症例 (10 代男児) は、知的能力障害を認め、会話はほとんどできず、特に、新規場面が苦手であった特徴があった。

## 【考 察】

本研究では、5 つの既知リスク遺伝子に *de novo* SNV を同定した。これらの遺伝子では、ASD やその他の神経発達症で *de novo* バリエントが複数報告されており、今回同定したバリエントも発症に関与している可能性が示唆された。一方で、ミスセンスバリエントが当該タンパク質に与える生物学的影響の詳細については明らかではない。今後、モデルマウスや患者 iPS 細胞を用いた機能解析によって、バリエントの生物学的意義や ASD 病態への寄与について検討する必要がある。今回 INDEL についても検出を試みたが、検出されたバリエントの精度が低いため、パイプラインの最適化が必要である。

今回同定した病的 CNV は、不完全浸透を示すことが報告されており、実際に 4 つ中 3 つは片親から伝わったものであった。同じ CNV によって発症する場合と発症しない場合がある理由は不明であるが、他の病的バリエントが関与するとの仮説があり、この点について今後検証する必要がある。また片親から病的 CNV が伝わっている家系では、ゲノム解析結果を開示する際に、家族への影響を含めて、慎重に検討する必要がある。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

第一に、ASD の病態解明が進む。WGS 解析により、ASD の発症原因となる特定の遺伝子バリエントを同定できる。これにより、ASD の分子病態がより詳細に解明され、病態生理の理解が深まる。第二に、診断の確定が容易になる。病因遺伝子が判明すれば、その遺伝子解析を診断のために活用できる。WGS を行うことなく、特定の遺伝子の検査だけで ASD かどうか診断できるようになる。第三に、新規治療法の開発につながる可能性がある。病因遺伝子や病態生理が明らかになれば、その分子機構を標的とした治療法の開発が可能となる。将来的には遺伝子治療などの新規治療法開発に繋がるかもしれない。第四に、遺伝カウンセリングの実施が容易になる。家族が ASD の発症リスクを知りたい場合にも、病因遺伝子検査を行うことで、リスク評価に役立てることができる。

以上のように、ASD の WGS 解析は、病態解明、診断法確立、新規治療開発、遺伝カウンセリングの充実など、臨床に大きな影響を与え、ASD の医療を向上させることが期待される。ASD 患者とその家族の生活の質の改善に大きく貢献する研究である。

## 【参考・引用文献】

1. Kushima I, Nakatochi M, Aleksic B, Okada T, Kimura H, Kato H, et al. Cross-Disorder Analysis of Genic and Regulatory Copy Number Variations in Bipolar Disorder, Schizophrenia, and Autism Spectrum Disorder. *Biol Psychiatry*. 2022;92(5):362-74.

2. RK CY, Merico D, Bookman M, J LH, Thiruvahindrapuram B, Patel RV, et al. Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nat Neurosci.* 2017;20(4):602-11.
3. Trost B, Thiruvahindrapuram B, Chan AJS, Engchuan W, Higginbotham EJ, Howe JL, et al. Genomic architecture of autism from comprehensive whole-genome sequence annotation. *Cell.* 2022;185(23):4409-27 e18.