

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6078211号  
(P6078211)

(45) 発行日 平成29年2月15日(2017.2.15)

(24) 登録日 平成29年1月20日(2017.1.20)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 A
A 61 K 45/00 (2006.01)	C 12 N 15/00 F
A 61 P 25/00 (2006.01)	A 61 K 45/00
C 12 Q 1/68 (2006.01)	A 61 P 25/00
	C 12 Q 1/68 A

請求項の数 15 (全 59 頁)

(21) 出願番号	特願2010-547822 (P2010-547822)	(73) 特許権者	301040958 ザ・チルドレン・ホスピタル・オブ・フィラデルフィア THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(86) (22) 出願日	平成21年2月20日 (2009.2.20)		
(65) 公表番号	特表2011-512163 (P2011-512163A)		
(43) 公表日	平成23年4月21日 (2011.4.21)		
(86) 國際出願番号	PCT/US2009/034784		
(87) 國際公開番号	W02009/105718		
(87) 國際公開日	平成21年8月27日 (2009.8.27)		
審査請求日	平成24年2月17日 (2012.2.17)		
審判番号	不服2015-4832 (P2015-4832/J1)		
審判請求日	平成27年3月11日 (2015.3.11)		
(31) 優先権主張番号	61/030, 136	(74) 代理人	100104411 弁理士 矢口 太郎
(32) 優先日	平成20年2月20日 (2008.2.20)	(72) 発明者	ハコナルソン、ハコン アメリカ合衆国、19355 ペンシルベニア州、マルバーン、1877 カバード ブリッジ ロード
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/107, 163		
(32) 優先日	平成20年10月21日 (2008.10.21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】自閉症および自閉症の表現型に関連する遺伝子変化ならびに自閉症の診断および治療に対するその使用方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

自閉症または自閉症スペクトラム障害を発現する傾向を検出する方法であって、前記方法は、標的ポリヌクレオチドにおいて欠失含有 C N V を有する少なくとも 1 つの遺伝子変化を検出する工程を含み、前記欠失含有 C N V は、c h r 8 : 4 3 7 6 5 5 7 0 ~ 4 3 7 7 6 5 9 5 であり、前記遺伝子変化が存在する場合、前記患者は自閉症および / または自閉症スペクトラム障害を発現するリスクが高いものであり、前記少なくとも 1 つの遺伝子変化は、N C B I B u i l d 3 6 に準拠したゲノム位置によって規定されるものである、方法。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載の方法において、この方法は、さらに、染色体 8 上の r s 8 1 8 5 7 7 1 、染色体 2 上の r s 4 9 7 1 7 2 4 、染色体 3 上の r s 1 0 5 1 0 2 2 1 、染色体 3 上の r s 1 4 4 4 0 5 6 、染色体 1 0 上の r s 1 2 4 1 1 9 7 1 、染色体 6 上の r s 1 2 2 1 4 7 8 8 、染色体 2 上の r s 2 1 6 4 8 5 0 、および染色体 1 6 上の r s 1 7 4 6 4 2 から成る群から選択される少なくとも 1 つの单一ヌクレオチド多型 ( S N P ) を検出する工程を含むものである、方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載の方法において、前記標的ポリヌクレオチドは検出前に増幅されるものである、方法。

## 【請求項 4】

10

20

請求項 1 または 2 記載の方法において、前記 C N V または S N P の存在を検出する工程は、特異的ハイブリダイゼーションの検出、対立遺伝子サイズの測定、制限断片長多型解析、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション分析、単一塩基プライマー伸長反応、および増幅ポリヌクレオチドのシークエンシングから成る群から選択される工程を行うことにより、ポリヌクレオチド試料を分析し、前記 C N V または S N P の存在を決定する工程をさらに含むものである、方法。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 記載の方法において、前記標的ポリヌクレオチドは D N A である、方法。

【請求項 6】

請求項 1 または 2 記載の方法において、前記標的ポリヌクレオチドはリボ核酸 ( R N A ) である、方法。

【請求項 7】

請求項 1 または 2 記載の方法において、前記少なくとも 1 つの遺伝子変化を有するポリヌクレオチドは、ヒト対象の単離された細胞から得られるものである、方法。

【請求項 8】

請求項 1 記載の方法であって、さらに、 c h r 2 : 5 1 1 2 0 6 4 4 ~ 5 1 1 4 7 6 0 0 、 c h r 3 : 1 9 1 5 1 9 0 ~ 1 9 1 5 9 2 2 、 c h r 3 : 4 1 9 9 7 3 1 ~ 4 2 3 6 3 0 4 、 c h r 1 0 : 8 7 9 4 1 6 6 6 ~ 8 7 9 4 9 0 2 9 、 c h r 6 : 1 6 2 5 8 4 5 7 6 ~ 1 6 2 5 8 7 0 0 1 、 c h r 2 : 7 8 2 6 8 1 9 9 ~ 7 8 3 1 1 2 4 9 、および c h r 1 6 : 4 5 8 3 4 3 2 1 ~ 4 5 8 8 7 7 4 5 から成る群から選択される欠失含有 C N V から選択される少なくとも 1 つの遺伝子変化を検出する工程を有する、方法。

【請求項 9】

請求項 1 記載の方法であって、さらに、 c h r 2 : 1 3 1 1 9 6 6 7 ~ 1 3 1 6 5 8 9 8 、 c h r 1 5 : 2 2 3 9 3 8 3 3 ~ 2 2 5 3 2 3 0 9 、 c h r 1 2 : 3 1 3 0 0 8 4 6 ~ 3 1 3 0 2 0 8 8 、 c h r 6 : 6 9 2 9 1 8 2 1 ~ 6 9 2 9 4 0 2 8 、 c h r 3 : 2 5 4 8 1 4 8 ~ 2 5 4 8 5 3 1 、 c h r 3 : 1 7 4 7 5 4 3 7 8 ~ 1 7 4 7 7 1 9 7 5 、 c h r 4 : 1 4 4 8 4 7 4 0 2 ~ 1 4 4 8 5 4 5 7 9 、 c h r 1 : 1 4 5 6 5 8 4 6 5 ~ 1 4 5 8 0 7 3 5 8 、 c h r 2 : 2 3 7 4 8 6 3 2 8 ~ 2 3 7 4 9 7 1 0 5 、 c h r 6 : 1 6 8 0 9 1 8 6 0 ~ 1 6 8 3 3 9 1 0 0 、 c h r 1 9 : 2 2 4 3 1 1 8 9 ~ 2 2 4 3 1 3 9 7 、 c h r 2 2 : 1 9 3 5 1 2 6 4 ~ 1 9 3 5 8 9 4 6 、 c h r 7 : 3 2 6 6 7 0 8 7 ~ 3 2 7 7 0 7 1 3 、 c h r 2 0 : 5 5 4 2 6 9 6 1 ~ 5 5 4 3 0 8 7 4 、 c h r 1 : 1 7 4 5 0 0 5 5 5 ~ 1 7 4 5 4 3 6 7 5 、 c h r 8 : 5 5 0 2 1 0 4 7 ~ 5 5 0 7 0 1 3 4 、および c h r 3 : 1 2 2 8 2 6 1 9 0 ~ 1 2 2 8 7 0 4 7 4 から成る群から選択される重複含有 C N V から選択される少なくとも 1 つの遺伝子変化を検出する工程を有する、方法。

【請求項 10】

請求項 1 記載の方法であって、さらに、 S N P 含有核酸を検出する工程を有し、前記 S N P 含有核酸は、染色体 5 上の r s 4 3 0 7 0 5 9 、 r s 7 7 0 4 9 0 9 、 r s 1 2 5 1 8 1 9 4 、 r s 4 3 2 7 5 7 2 、 r s 1 8 9 6 7 3 1 、および r s 1 0 0 3 8 1 1 3 から選択される、方法。

【請求項 11】

請求項 1 記載の方法であって、さらに、 S N P 含有核酸を検出する工程を有し、前記 S N P 含有核酸は、染色体 2 上の r s 4 3 4 6 3 5 2 、染色体 1 5 上の r s 7 4 9 7 2 3 9 、染色体 1 2 上の r s 6 1 7 3 7 2 、染色体 6 上の r s 9 3 4 2 7 1 7 、染色体 3 上の r s 1 7 0 1 5 8 1 6 、染色体 3 上の r s 9 8 6 0 9 9 2 、染色体 4 上の r s 7 6 8 1 9 1 4 、染色体 1 上の r s 1 2 4 0 8 1 7 8 、染色体 2 上の r s 1 1 0 7 1 9 4 、染色体 6 上の r s 9 3 4 6 6 4 9 、染色体 1 9 上の r s 1 2 3 0 3 0 0 、染色体 1 5 上の r s 7 4 9 7 2 3 9 、染色体 2 2 上の r s 6 7 4 4 7 8 、染色体 7 上の r s 1 3 2 2 5 1 3 2 、染色体 2 0 上の r s 6 0 2 5 5 5 3 、染色体 1 上の r s 1 0 7 9 8 4 5 0 、染色体 8 上の r s

10

20

30

40

50

1 0 4 3 5 6 3 4、および染色体 3 上の r s 2 0 7 0 1 8 0 から選択される、方法。

【請求項 1 2】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 つに記載の方法における少なくとも 1 つの遺伝子変化の存在を検出するためのプローブとしての、単離された自閉症関連 C N V 含有核酸の使用であつて、前記 C N V は、c h r 8 : 4 3 7 6 5 5 7 0 ~ 4 3 7 7 6 5 9 5 の欠失を有し、前記 C N V は、N C B I B u i l d 3 6 に準拠したゲノム位置によって規定されるものである、使用。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 記載の、単離された自閉症関連 C N V 含有核酸の使用であつて、さらに、c h r 2 : 5 1 1 2 0 6 4 4 ~ 5 1 1 4 7 6 0 0、c h r 3 : 1 9 1 5 1 9 0 ~ 1 9 1 5 9 10  
2 2、c h r 3 : 4 1 9 9 7 3 1 ~ 4 2 3 6 3 0 4、c h r 1 0 : 8 7 9 4 1 6 6 6 ~ 8  
7 9 4 9 0 2 9、c h r 6 : 1 6 2 5 8 4 5 7 6 ~ 1 6 2 5 8 7 0 0 1、c h r 2 : 7 8  
2 6 8 1 9 9 ~ 7 8 3 1 1 2 4 9、およびc h r 1 6 : 4 5 8 3 4 3 2 1 ~ 4 5 8 8 7 7  
4 5 からなる群から選択される欠失、および / または c h r 2 : 1 3 1 1 9 6 6 7 ~ 1 3  
1 6 5 8 9 8、c h r 1 5 : 2 2 3 9 3 8 3 3 ~ 2 2 5 3 2 3 0 9、c h r 1 2 : 3 1 3  
0 0 8 4 6 ~ 3 1 3 0 2 0 8 8、c h r 6 : 6 9 2 9 1 8 2 1 ~ 6 9 2 9 4 0 2 8、c h  
r 3 : 2 5 4 8 1 4 8 ~ 2 5 4 8 5 3 1、c h r 3 : 1 7 4 7 5 4 3 7 8 ~ 1 7 4 7 7 1  
9 7 5、c h r 4 : 1 4 4 8 4 7 4 0 2 ~ 1 4 4 8 5 4 5 7 9、c h r 1 : 1 4 5 6 5 8  
4 6 5 ~ 1 4 5 8 0 7 3 5 8、c h r 2 : 2 3 7 4 8 6 3 2 8 ~ 2 3 7 4 9 7 1 0 5、c  
h r 6 : 1 6 8 0 9 1 8 6 0 ~ 1 6 8 3 3 9 1 0 0、c h r 1 9 : 2 2 4 3 1 1 8 9 ~ 2 20  
2 4 3 1 3 9 7、c h r 2 2 : 1 9 3 5 1 2 6 4 ~ 1 9 3 5 8 9 4 6、c h r 7 : 3 2 6  
6 7 0 8 7 ~ 3 2 7 7 0 7 1 3、c h r 2 0 : 5 5 4 2 6 9 6 1 ~ 5 5 4 3 0 8 7 4、c  
h r 1 : 1 7 4 5 0 0 5 5 5 ~ 1 7 4 5 4 3 6 7 5、c h r 8 : 5 5 0 2 1 0 4 7 ~ 5 5  
0 7 0 1 3 4、および c h r 3 : 1 2 2 8 2 6 1 9 0 ~ 1 2 2 8 7 0 4 7 4 から成る群から選択される重複を有する、少なくとも 1 つの自閉症関連 C N V 含有核酸を有する、使用。  
。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 記載の、単離された自閉症関連 C N V 含有核酸の使用であつて、さらに、少なくとも 1 つの自閉症関連 S N P 含有核酸を有し、前記 S N P は、r s 4 3 0 7 0 5 9、r s 7 7 0 4 9 0 9、r s 1 2 5 1 8 1 9 4、r s 4 3 2 7 5 7 2、r s 1 8 9 6 7 3 1 30  
、および r s 1 0 0 3 8 1 1 3 から選択される、使用。

【請求項 1 5】

請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか 1 つに記載の、単離された自閉症関連 C N V 含有核酸の使用において、前記自閉症関連 C N V 含有核酸は、固体担体に固定されている、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 0 8 年 2 月 2 0 日、2 0 0 8 年 1 0 月 2 1 日付け出願の米国仮特許出願第 6 1 / 0 3 0 , 1 3 6 号および同第 6 1 / 1 0 7 , 1 6 3 号に対して優先権を主張するものであり、これらはこの参照により本明細書に組み込まれる。 40

【0 0 0 2】

本発明は、遺伝学の分野ならびに自閉症および自閉症スペクトラム障害の診断および治療に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

本発明が関連する最新技術を説明するために本明細書全体にわたつていくつかの刊行物および特許文献が参照されるが、これらはこの参照により本願明細書に完全に組み込まれる。

【0 0 0 4】

自閉症 (M I M [ 2 0 9 8 5 0 ] ) は、異常な反復運動および他の行動障害のパターン

50

に対する傾向を伴い、社会的行動およびコミュニケーション能力における異常によって特徴づけられる、深刻で比較的よく見られる精神神経疾患である。現在の推定患者数は、自閉症については人口の0.1~0.2%であり、ASDについては人口の0.6%である<sup>1</sup>。世界的には、男性は女性の4倍罹りやすい<sup>2</sup>。したがって、自閉症は、成人期まで継続し、社会に対して大きな経済的負担となり、原因不明の公衆衛生上の大きな懸念をもたらす。自閉症の最も顕著な特徴は、社会的およびコミュニケーション上の欠陥である。前者は、低い社交性（社会的交流を求める事、または注目することへの傾向が低い）、社会的ルールに対する認識の不足、社会的模倣および象徴的な遊びが困難なこと、他者に慰めを与えること、求めたりしないことおよび他者と社会的関係を形成しないこと、言葉を使わないコミュニケーション、たとえばアイコンタクトを使用できないこと、他者の精神および情動状態に対する認識の不足、相互関係の欠如、および他者と経験を共有できないこと、として現れる。コミュニケーション障害は、言語の遅れもしくは不足、他者との会話の開始もしくは継続する能力の障害、および言語の常的もしくは反復使用として現れる。自閉症児は、同様の知的能力を有するクラスメートよりも、自由遊びにふけることが遙かに少なく、遙かに低い発達レベルを示す。罹患児童における社会的欠陥の特徴は、12~18月齢の早期に現れるため、これにより、自閉症が神経発生障害であることを示唆される。自閉症は、社会的機能および情緒的機能を支配する神経系の発育不全に由来することが示唆されている。社会性および認知発達は一般集団においては高度に相關するが、社会的障害の程度は、自閉症の個人においてIQとはあまり相關しない。反対のことがダウントおよびウィリアムズ症候群で見られ、この場合、社会性発達が認識機能よりも優れている。両例は、社交性の複雑な要因を指摘するものである。10

#### 【0005】

自閉症の最も一般的な形態の病因はまだわかっていない。この疾患の最初の記載において、Kannerは、罹患児童の親の類似した特質を観察して、自閉症の発現に対する育児法の影響を示唆した。いくつかの環境的仮説は、実験データによって裏付けられないが、この障害に対する強い遺伝的影響の証拠が増大している。罹患者の兄弟姉妹における自閉症の割合は2~6%であり、一般集団におけるよりも2倍高い。双子の研究は、一卵性および二卵性双生児の一一致率において有意な差を示し、前者は双生児組の60%で一致し、非自閉症一卵性双生児のほとんどは、より軽度の関連する社会的およびコミュニケーション異常を示す。社会的、言語および認識問題は、対照の親類と比較すると、自閉症患者の親類でも見られる。自閉症の遺伝率は>90%と推定されている。20

#### 【0006】

自閉症の遺伝的基礎は、過去10年において、3つの相補的アプローチ、すなわち細胞発生研究；リンクージ分析、および候補遺伝子分析を用いて広く研究されてきた。概説については、Vorstman et al. (2006) Mol. Psychiatry 11:18-28; Veenstra-VanderWeele and Cook, (2004) Mol. Psychiatry 9:819-32を参照。自閉症における染色体異常の研究によって、端部欠失および中間部欠失、平衡転座および非平衡転座、ならびに多数の染色体上の逆位が明らかになり、染色体15、7、およびX上の異常が最も多く報告されている。細胞発生研究によって示された領域の重要性は、マルチブレックス自閉症家族における全ゲノムスクリーンによって評価された (International Molecular Genetic Study of Autism Consortium, 1998)。自閉症感受性遺伝子座の強力かつ合致した証拠が染色体7qについて得られ；染色体15q、16p、19p、および2q上の遺伝子座については中程度の証拠が得られ；この研究の大部分は、X染色体のリンクージについて裏付けを見いだせない (Lamb et al., (2005) Med Genet. 42:132-137; Lord et al., (2000) Autism Dev Disord. 30:205-223)。 AGRE試料は、17qおよび5p上の遺伝子座についての最も強力な証拠を提供した (Yonan et al., (2003) Am J Hum Genet. 73:886-97)。自閉症における多くの候補遺伝子研究は、その位置304050

または機能に関するいくつかの有力候補に焦点を合わせてきた (Veenstra - VandeWeele et al 2004、上記において概説)。Jamaianら ((2003) *Nat Genet*. 34 : 27 - 9) は、ASD と関連するリンクエージ領域で、ニューロリジンをコードする X 連鎖遺伝子、特に、NLGN3 および NLGN4 における希少な非同義変異を報告している。自閉症エンドフェノタイプの遺伝的基礎についての他の証拠は、脆弱性 X およびレット症候群などの自閉症と重複する表現型特性を共有する疾患の研究から得られる。

#### 【0007】

自閉症の多くの新たな理論は、これらの疾患の潜在的な根本原因として、神経連結性における変化に焦点を合わせている。画像解析によって、活性依存性皮質発達の局所的および大域的連結性における変化が明らかになり、発生的研究は、自閉症が、発達中の抑制性および興奮性シナプス結合の不均衡の結果起こり得ることを示唆する。神経連結性の基本単位はシナプスであるので、自閉症が神経連結性の障害であるならば、ニューロンに関して、シナプス結合の障害として理解することができる。実際に、遺伝学研究によって、主要タンパク質における突然変異がシナプス発生および可塑性に関与することが明らかになり、たとえばニューロリジン、FMRP および MeCP2 は自閉症および自閉症の兆候を伴う知能発育不全の 2 つの形態、特に脆弱性 X およびレット症候群の個体において見いだされる (Jamaian 等、2003、上記)。したがって、遺伝子異常と (エンド) 表現型との間の関連性のニューロンレベルでの探求は、当然かつ有意義であるように思われる。さらに、このような神経連結性異常は、たとえば直接白質トラクトグラフィーによるか、または特徴的な電気的活動における観察可能な遅延によって、ASD の行動的および臨床症状と直接関連し得ることが明らかになり、これらのニューロンレベルの表現型は行動の神経相関と解釈することができる。

10

20

30

#### 【0008】

全般的に、今まで実施され、上述したリンクエージ分析研究は、多くの理由、なかでもリンクエージ分析法が、適度の効果のある一般的な遺伝的変異の同定において概してうまくいかないという一般的な問題のために、自閉症の遺伝的決定基の同定にごくわずかしか成功しなかった。この問題は、多様な表現型が複数の遺伝因子と環境因子間の相互作用の最終結果によって決定され、同定される特定の遺伝的変異が疾患の全リスクにほとんど影響しない可能性が高いスペクトラム障害である自閉症において顕著である。

30

#### 【0009】

最近の研究では、Sebat と共同研究者が、デノボコピー数多型 (CNVs) の自閉症との関連性を報告し<sup>8</sup>、CNVs がこの疾患の根底にある可能性があることを示唆している。実際、彼らの結果は、4 つの遺伝子座での CNVs が、ASD のわずかな比率を占めることを示唆している<sup>8</sup>。

#### 【0010】

しかし、これらの関連性の結果は、自主研究においてまだ再現されておらず、自閉症のわずかな割合の遺伝的リスクをまとめて説明するだけであり、従ってさらなる遺伝子座の存在を示唆するが、その頻度および効果の大きさは不明である。残りの遺伝子座について系統的に探索する目的で、本発明者らは、1200 人の白色人種の自閉症児および 200 人を超える無病のヨーロッパ系対照において GWA 研究を実施した。

40

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0011】

【非特許文献 1】 Chakrabarti, S. & Fombonne, E. Pervasive developmental disorders in preschool children. *Journal of the American Medical Association* 285, 3093 - 3099 (2001).

【非特許文献 2】 Chakrabarti, S. & Fombonne, E. Pervasive developmental disorders in pres

50

chool children: confirmation of high prevalence. *Am J Psychiatry* 162, 1133-41 (2005).

【非特許文献3】Jones, M. B. & Szatmari, P. Stoppage rules and genetic studies of autism. *J Autism Dev Disord* 18, 31-40 (1988).

【非特許文献4】Ritvo, E. R. et al. The UCLA-University of Utah epidemiologic survey of autism: prevalence. *Am J Psychiatry* 146, 194-9 (1989).

【非特許文献5】Bailey, A. et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25, 63-77 (1995).

【非特許文献6】Klauck, S. M. Genetics of autism spectrum disorder. *Eur J Hum Genet* 14, 714-20 (2006).

【非特許文献7】Vorstman, J. A. et al. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 11, 1, 18-28 (2006).

【非特許文献8】Sebat, J. et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445-9 (2007).

【非特許文献9】Gunderson, K. L., Steemers, F. J., Lee, G., Mendoza, L. G. & Chee, M. S. A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet* 37, 549-54 (2005).

【非特許文献10】Steemers, F. J. et al. Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods* 3, 31-3 (2006).

【非特許文献11】Hakonarson, H. et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 448, 591-594 (2007).

【非特許文献12】Abrahams, B. S. & Geschwind, D. H. Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 9, 341-55 (2008).

【非特許文献13】Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss5601.pdf>. (2007).

【非特許文献14】Bailey, A. et al. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25, 63-77 (1995).

【非特許文献15】Lauritsen, M. B., Pedersen, C. B. & Mortensen, P. B. Effects of familial ri

10

20

30

40

50

sk factors and place of birth on the risk of autism: a nationwide register-based study. *J Child Psychol Psychiatry* 46, 963-71 (2005).

【非特許文献16】Sykes, N. H. & Lamb, J. A. Autism: the quest for the genes. *Expert Rev Mol Med* 9, 1-15 (2007).

【非特許文献17】Gupta, A. R. & State, M. W. Recent advances in the genetics of autism. *Biol Psychiatry* 61, 429-37 (2007).

10

【非特許文献18】Freitag, C. M. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry* 12, 2-22 (2007).

【非特許文献19】Veenstra-VanderWeele, J. & Cook, E. H., Jr. Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 9, 819-32 (2004).

【非特許文献20】Vorstman, J. A. et al. Identification of novel autism candidate regions through analysis of reported cytogenetic abnormalities associated with autism. *Mol Psychiatry* 11, 1, 18-28 (2006).

20

【非特許文献21】Sebat, J. et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 316, 445-9 (2007).

【非特許文献22】Weiss, L. A. et al. Association between Microdeletion and Microduplication at 16p11.2 and Autism. *N Engl J Med* (2008).

30

【非特許文献23】Kumar, R. A. et al. Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet* 17, 628-38 (2008).

【非特許文献24】Marshall, C. R. et al. Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82, 477-88 (2008).

【非特許文献25】WTCCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-78 (2007).

40

【非特許文献26】Sklar, P. et al. Whole-genome association study of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 13, 558-69 (2008).

【非特許文献27】Alkelai, A. et al. The XVth World Congress of Psychiatric Genetics, October 7-11, 2007: Rapporteur summaries of oral presentations. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 174B, 233-277 (2008).

【非特許文献28】O'Donovan, M. C. et al. Identifi

50

c a t i o n o f l o c i a s s o c i a t e d w i t h s c h i z o p h r e n i a b y g e n o m e - w i d e a s s o c i a t i o n a n d f o l l o w - u p . N a t G e n e t ( 2 0 0 8 ) .

【非特許文献29】Ferreira, M.A. et al. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* (2008).

【非特許文献30】Martin, E.R., Monks, S.A., Warren, L.L. & Kaplan, N.L. A test for linkage and association in general pedigrees: the pedigree disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 67, 146-54 (2000).

【非特許文献31】Chung, R.H., Morris, R.W., Zhang, L., Li, Y.J. & Martin, E.R. X-APL: an improved family-based test of association in the presence of linkage for the X chromosome. *Am J Hum Genet* 80, 59-68 (2007).

【非特許文献32】de Bakker, P.I. et al. Practical aspects of imputation-driven meta-analysis of genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 17, R122-8 (2008).

【非特許文献33】Wang, K. et al. PennCNV: an integrated hidden Markov model designed for high-resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Res* 17, 1665-1674 (2007).

【非特許文献34】Siepel, A. et al. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* 15, 1034-50 (2005).

【非特許文献35】Ovcharenko, I. et al. Evolution and functional classification of vertebrate gene deserts. *Genome Res* 15, 137-45 (2005).

【非特許文献36】Kools, P., Vanhalst, K., Van den Eynde, E. & van Roy, F. The human cadherin-10 gene: complete coding sequence, predominant expression in the brain, and mapping on chromosome 5p13-14. *FEBS Lett* 452, 328-34 (1999).

【非特許文献37】Visel, A., Thaller, C. & Eichelle, G. GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. *Nucleic Acids Res* 32, D552-6 (2004).

【非特許文献38】Heinzen, E.L. et al. Tissue-Specific Genetic Control of Splicing: Implications for the Study of Complex Traits. *PLoS Biol* 6, e1000001 (2008).

【非特許文献39】Witte, J.S. Multiple prostate c 50

ancer risk variants on 8q24. *Nat Genet* 39, 579-80 (2007).

【非特許文献40】Ghoussoaini, M. et al. Multiple loci with different cancer specificities within the 8q24 gene desert. *J Natl Cancer Inst* 100, 962-6 (2008).

【非特許文献41】Kim, H.G. et al. Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82, 199-207 (2008).

【非特許文献42】Szatmari, P. et al. Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 39, 319-28 (2007).

【非特許文献43】Arking, D.E. et al. A common genetic variant in the neurexin superfamily member CNTNAP2 increases familial risk of autism. *Am J Hum Genet* 82, 160-4 (2008).

【非特許文献44】Alarcon, M. et al. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 82, 150-9 (2008).

【非特許文献45】Bakkaloglu, B. et al. Molecular cytogenetic analysis and resequencing of contactin associated protein-like 2 in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 82, 165-73 (2008).

【非特許文献46】Morrow, E.M. et al. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* 321, 218-23 (2008).

【非特許文献47】Redies, C. Cadherins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 61, 611-48 (2000).

【非特許文献48】Wang, K., Li, M. & Bucan, M. Pathway-Based Approaches for Analysis of Genomewide Association Studies. *Am J Hum Genet* 81 (2007).

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0012】

本発明にしたがって、自閉症および自閉症スペクトラム障害の診断および治療のための組成物および方法が提供される。例示的な方法では、標的ポリヌクレオチドにおいて少なくとも1つの欠失を含むCNVの存在を検出する工程を必要としており、前記CNVが存在する場合、前記患者は自閉症および/または自閉症スペクトラム障害を発現する高いリスクを有しており、前記欠失含有CNVは、chr8:43765570~43776595、chr2:51120644~51147600、chr3:1915190~1915922、chr3:4199731~4236304、chr10:879416

10

20

30

40

50

66 ~ 87949029、chr6:162584576 ~ 162587001、chr2:78268199 ~ 78311249およびchr16:45834321 ~ 45887745から成るCNVsの群より選択される。前記方法は、選択的に、染色体8上のrs8185771、染色体2上のrs4971724、染色体3上のrs10510221、染色体3上のrs1444056、染色体10上のrs12411971、染色体6上のrs12214788、染色体2上のrs2164850、および染色体16上のrs174642から成る群から選択される少なくとも1つの单一ヌクレオチド多型の検出を含むものであっても良い。

#### 【0013】

本発明のさらに別の実施形態において、自閉症または自閉症スペクトラム障害を発現する傾向を検出する方法は、標的ポリヌクレオチドにおいて少なくとも1つの重複を含むCNVの存在を検出する工程を含み、前記CNVが存在する場合、前記患者は自閉症および/または自閉症スペクトラム障害を発現する高いリスクを有しており、前記重複含有CNVは、chr2:13119667 ~ 13165898、chr15:22393833 ~ 22532309、chr12:31300846 ~ 31302088、chr6:69291821 ~ 69294028、chr3:2548148 ~ 2548531、chr3:174754378 ~ 174771975、chr4:144847402 ~ 144854579、chr1:145658465 ~ 145807358、chr2:237486328 ~ 237497105；chr6:168091860 ~ 168339100、chr19:22431189 ~ 22431397、chr15:22393833 ~ 22532309、chr22:19351264 ~ 19358946、chr7:32667087 ~ 32770713、chr20:55426961 ~ 55430874、chr1:174500555 ~ 174543675、chr8:55021047 ~ 55070134、およびchr3:122826190 ~ 122870474から成るCNVの群から選択される。前記方法は、選択的に、染色体2上のrs4346352、染色体15上のrs7497239、染色体12上のrs617372、染色体6上のrs9342717、染色体3上のrs17015816、染色体3上のrs9860992、染色体4上のrs7681914、染色体1上のrs12408178、染色体2上のrs1107194、染色体6上のrs9346649、染色体19上のrs1230300、染色体15上のrs7497239、染色体22上のrs674478、染色体7上のrs13225132、染色体20上のrs6025553、染色体1上のrs10798450、染色体8上のrs10435634および染色体3上のrs2070180から成る群から選択される少なくとも1つの单一ヌクレオチド多型の検出を含むものであっても良い。

#### 【0014】

本発明の別の態様において、これを必要とする患者において自閉症または自閉症スペクトラム障害を発現する傾向を検出する方法を提供する。典型的な方法は、標的ポリヌクレオチドにおいて核酸を含む少なくとも1つのSNPの存在を検出する工程を必要とし、前記SNPが存在する場合、前記患者は、自閉症および/または自閉症スペクトラム障害を発現する高いリスクを有しており、前記核酸含有SNPは、染色体5上のrs4307059、rs7704909、rs12518194、rs4327572、rs1896731、およびrs10038113から成るSNPの群から選択されるものである。

#### 【0015】

本発明の別の実施形態において、神経シグナリングおよび/または形態を変化させる薬剤を同定する方法が提供される。当該方法は、前記CNVまたはSNPの少なくとも1つを発現する細胞を提供し(工程a)；CNVまたはSNP含有核酸に対応する同種野生型配列を発現する細胞を提供し(工程b)；各試料からの細胞を試験薬と接触させ、前記薬剤が、工程b)のものと比べて工程a)の細胞の神経シグナリングおよび/または形態が変わるか否かを分析し、これによって神経シグナリングおよび形態を変化させる薬剤を同定することを含む。好適な実施形態において、前記試験薬は、カドヘリンを介する細胞接

10

20

30

40

50

着を調整する。これを必要とする患者において、本明細書で記載する方法を用いて同定される試験薬の投与によって、自閉症患者を治療する方法も、本発明に含まれる。

【0016】

本発明は、rs4307059、rs7704909、rs12518194、rs4327572、rs1896731およびrs10038113から成る群から選択される、少なくとも1つの単離された自閉症に関連するSNP含有核酸も提供する。このようなSNP含有核酸は、選択的に、神経細胞における発現のために適した発現ベクター中に含まれていてもよい。

【0017】

本発明の別の態様において、前記CNVおよびSNPを含む核酸が提供される。好適な実施形態において、核酸は固体担体に付着したものである。 10

【0018】

本明細書に記載したCNVおよび/またはSNP含有核酸分子を含むトランスジェニックマウスもまた提供される。このようなマウスは、自閉症の進行および発現を調整する薬剤を同定するための優れた生体内スクリーニング手段を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1A】図1(A)は、AGREおよびACCコホートのゲノムワイド関連メタアナリシスから得られるSNPの- $\log_{10}(P)$ 値を示すマンハッタンプロットである。

【図1B】(B)最も重要なSNPsを含むゲノム領域は、UCSCゲノムブラウザに表示され、保存されたゲノム要素はPhastConsトラックにおいてLODスコアを用いて表示されている。 20

【図1C】(C)遺伝子型同定されたSNPs(菱形)および帰属されたSNPs(灰色円)はどちらもゲノム位置の関数としてそのP値(- $\log_{10}$ 値として)を用いてプロットする(NCBI Build 36)。遺伝子型同定されたSNPsをrs4307059との相互関係に基づいて着色した(赤:  $r^2 > 0.8$ ; 橙:  $0.5 < r^2 < 0.8$ ; 黄:  $0.2 < r^2 < 0.5$ ; 白:  $r^2 < 0.2$ )。HapMapデータから推定される再結合速度をプロットして、局所的LD構造を反映する。

【図1D】(D)ヒト胎児脳におけるCDH10のインサイチュハイブリダイゼーション、上記の対応するクレシル・バイオレット染色されたマーカースライド。眼窩前頭皮質(OFCtx)および前頭皮質(FCtx)を強調し、前頭皮質で発現が大幅に濃縮される。 30

【図1E】(E)rs4307059のSNP遺伝子型は、93大脳皮質組織におけるCDH9もしくはCDH10転写産物レベルと関連しない。

【図2】図2は、表8における6のSNPs間の連鎖不均衡。D値(A)と $r^2$ 値(B)との両方を示す図である。図はHaploview(27)によって作製する。

【図3】図3は、4つのコホートに関するこれらの合計P値(- $\log_{10}$ 値)を用いた、5p14.1領域上の全ての遺伝子型同定/帰属SNPsについての連鎖不均衡プロットである( $P < 1 \times 10^{-7}$ を有するマーカーを赤色で強調する)。この領域における最も重要なSNPsはすべて同じLDブロック中にある。図はWGAViewer(33)によって作製する。 40

【図4A】図4は、UCSCゲノムブラウザによって視覚化された本発明者らの研究におけるCDH10とCDH9との間のCNVsである。本発明者らは、定量的PCR(QPCR)および多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)アッセイによる遺伝子間CNVsの実験的な検証を試みた。以下の図のそれぞれは、重複するかまたはCDH10とCDH9間の1つのCNV遺伝子座を示し、各図中の赤色バーは、CNVsの位置および座標を表す。

【図4B】図4は、UCSCゲノムブラウザによって視覚化された本発明者らの研究におけるCDH10とCDH9との間のCNVsである。本発明者らは、定量的PCR(QPCR)および多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)アッセイによる遺伝子 50

間CNVsの実験的な検証を試みた。以下の図のそれぞれは、重複するかまたはCDH10とCDH9間の1つのCNV遺伝子座を示し、各図中の赤色バーは、CNVsの位置および座標を表す。

【図4C】図4は、UCSCゲノムブラウザによって視覚化された本発明者らの研究におけるCDH10とCDH9との間のCNVsである。本発明者らは、定量的PCR(QPCR)および多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)アッセイによる遺伝子間CNVsの実験的な検証を試みた。以下の図のそれぞれは、重複するかまたはCDH10とCDH9間の1つのCNV遺伝子座を示し、各図中の赤色バーは、CNVsの位置および座標を表す。

【図4D】図4は、UCSCゲノムブラウザによって視覚化された本発明者らの研究におけるCDH10とCDH9との間のCNVsである。本発明者らは、定量的PCR(QPCR)および多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)アッセイによる遺伝子間CNVsの実験的な検証を試みた。以下の図のそれぞれは、重複するかまたはCDH10とCDH9間の1つのCNV遺伝子座を示し、各図中の赤色バーは、CNVsの位置および座標を表す。

【図4E】図4は、UCSCゲノムブラウザによって視覚化された本発明者らの研究におけるCDH10とCDH9との間のCNVsである。本発明者らは、定量的PCR(QPCR)および多重ライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA)アッセイによる遺伝子間CNVsの実験的な検証を試みた。以下の図のそれぞれは、重複するかまたはCDH10とCDH9間の1つのCNV遺伝子座を示し、各図中の赤色バーは、CNVsの位置および座標を表す。

【図5】図5は、UCSCゲノム・ブラウザ・アノテーション・データベースでアノテートされる、CDH10とCDH9間のすでに報告されているCNVsである。ゲノム変異体のデータベース(<http://projects.tcag.ca/variation/>)トラック、ならびに9のすでに公開されているものからコンパイルされた「Structural Variation」トラックを包含する2つのトラックをブラウザで表示した。両トラックは、CDH10とCDH9間に共通のCNVsは同定されなかつたことを示すが、CDH93領域を中断するCNVは複数の被験者においては検出された。したがって、現在の技術基盤によって検出されない非常に小さなCNVが存在しなければ、トップSNP関連性結果は、CNVとの連鎖不均衡が原因である可能性は低い。

【図6】図6は、CDH10とCDH9間のゲノム領域のゲノム・ブラウザ・ショットである。AGREコホートおよびACCコホートのSNP関連性を、-log<sub>10</sub>(P)値を表す垂直線として表示する。ゲノム・ブラウザ・トラックで示されるように、この領域において公知のmicroRNAsもしくは核内低分子RNAはない。「ヒトEST」トラック(34)において示されるように、LDブロックと重複するスプライスされたヒト発現標識配列(Expression Sequence Tags:ESTs)はない。ヒト組織の様々な群についての発現値(発現が減少するとともに色が赤から黒から緑へと変化する)を「GNF発現アトラス2」トラック(26)に表示する。予測される転写開始部位を「FirstEF」トラック(35)に表示し、このような部位はLDブロックと重複しない。予測されるmicroRNA標的を「標的Scan」トラック(36)に表示し、そのうちのどれもLDブロックと重複しない。保存されたゲノム要素をPhaseConsトラック(37)においてLODスコアとともに表示する。

【図7】図7は、79のヒト組織に関するGNF SymAtlasデータベースに基づいたCDH9(プローブ識別子:207729\_at)の組織特異的遺伝子発現レベルである。黒線は中央値を表す。

【図8】図8は、79のヒト組織に関するGNF SymAtlasデータベースに基づいたCDH10(プローブ識別子:220115\_s\_at)の組織特異的遺伝子発現レベルである。黒線および青線は、それぞれ中央値およびその3倍値を表す。

【発明を実施するための形態】

【0020】

10

20

30

40

50

疫学研究によって、成人期にまで及ぶ可変型表現型発現を提示する、児童においてよく見られる精神神経疾患である自閉症の病因に遺伝因子が関与することがわかる。自閉症スペクトラム障害（A S D）の小サブセットから成るデノボコピー数変動（C N V s）をはじめとするいくつかの遺伝的決定基はすでに報告されている。関係するゲノム領域は、N R X N 1、N L G N 3、S H A N K 3 およびA U T S 2 をはじめとするいくつかの遺伝子において報告される変動を有し、非常に不均一であると思われる。自閉症の病因に寄与する新規遺伝因子を同定するために、本発明者らは、シンプレックスおよびマルチプレックス家系の混合ならびに200人のヨーロッパ系の無病対照児童からの120人の自閉症患者（A D I - R および/またはA D O S 陽性）のコホートにおいてゲノムワイド関連性（G W A）研究を実施する。本発明者らの関連分析によって、ゲノムワイドで有意なシグナルはないことが明らかになった（P>X×10-7）。しかし、本発明者らは、自閉症と関連するいくつかの新規C N V s を同定し、あらかじめ特定された有意性閾値（P<1×10-5）を満たす合計12の欠失遺伝子座および9の複製遺伝子座を同定した。これらのC N V s のサブセットは、T R P S 1 およびH C N 1 をはじめとする自閉症遺伝情報源交換局（A u t i s m G e n e t i c R e s o u r c e E x c h a n g e : A G R E ）コンソーシアムからの独立した自閉症コホートにおいて複製され、単一のS N P を用いて標識することができた。あわせると、これらの結果は、自閉症における遺伝的景観が、自閉症の表現型と関連する一般的C N V s と希少C N V s の両方を包含することを示唆する。これらのC N V s は高度に不均一であり、ほとんどの場合、個々の家族および神経シグナリングおよび発生の種類において濃縮される遺伝子の周りのクラスタに特有である。  
10

### 【0021】

自閉症スペクトラム障害（A S D s）の根底にあるさらなる遺伝的リスク因子も、これらのゲノムワイド関連性研究において同定された。膜細胞接着分子をコードする2つの遺伝子、つまりカドヘリン10（C D H 1 0 ）とカドヘリン9（C D H 9 ）間にある6のS N P s は強力な関連性シグナルを示し、最も重要なS N P はr s 4 3 0 7 0 5 9 である（P = 3 . 4 × 10 -8 ; O R = 1 . 1 9 ）。これらの関連性シグナルを487の自閉症家族（1,537人の被験者）、ならびに108人のA S D 患者および540人の対照のコホートを含む2つの独立したコホートにおいて複製し、合計P値は10,000人を超える対象の全データ組について7 . 9 × 10 -8 ~ 2 . 1 × 10 -10 の範囲であった。本発明者らの結果は、A S D s の病因において神経細胞接着分子が関与するとし、A S D に関する感受性を有する共通の変異体のゲノムワイドに重要な関連性をはじめて示すものである。  
20

### 【0022】

#### 定義：

「コピー数多型（C N V ）」とは、個体の遺伝子型における特定の遺伝子のコピー数を意味する。C N V は、ヒト表現型多様性の主な遺伝子成分である。遺伝性疾患に対する感受性は、単一ヌクレオチド多型（S N P ）だけでなく、C N V s をはじめとする構造および他の遺伝子変化とも関連することが知られている。C N V は、約1キロベース（k b ）またはそれ以上であるD N A 断片を含むコピー数変化を表す（F e u k e t a 1 . 2 0 0 6 a ）。本明細書において記載するC N V は、後のC N V 分析の複雑さを最小限に抑えるために、転移要素（たとえば、約6 k b のK p n I 繰り返し）の挿入/欠失から生じる変異体を含まない。C N V という用語は、したがって、大規模なコピー数変異体（L C V s ; I a f r a t e e t a 1 . 2 0 0 4 ）、コピー数多型（C N P s ; S e b a t e t a 1 . 2 0 0 4 ）、および中間サイズの変異体（I S V s ; T u z u n e t a 1 . 2 0 0 5 ）などのあらかじめ導入された項目を含むが、レトロポゾン挿入を含まない。  
40

### 【0023】

「単一ヌクレオチド多型（S N P ）」とは、D N A 中の単一塩基が、その位置での通常の塩基と異なる変化を意味する。これらの単一塩基の変化を、S N P もしくは「スニップ  
50

ス ( s n i p s ) 」と呼ぶ。数百万の S N P s がヒトゲノムにおいて分類されている。いくつかの S N P s 、たとえば鎌状細胞の原因となるものが、疾患に関与する。他の S N P s はゲノムにおける通常の変化である。

【 0 0 2 4 】

「遺伝子変化」という用語は、本明細書で用いられる場合、1つもしくはそれ以上の核酸分子の野生型もしくは参照配列からの変化を意味する。遺伝子変化としては、制限なく、塩基対置換、公知の配列の核酸分子からの少なくとも1つのヌクレオチドの付加および欠失が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

「固体マトリックス」という用語は、本明細書において用いられる場合、任意の構成のもの、たとえばビーズ、微小粒子、マイクロアレイ、マイクロタイトトレーショングルもしくは試験管の表面、尿試験紙またはフィルターを意味する。マトリックスの材料は、ポリスチレン、セルロース、ラテックス、ニトロセルロース、ナイロン、ポリアクリルアミド、デキストランまたはアガロースであつてよい。

10

【 0 0 2 6 】

「～から本質的に成る」という語句は、特定のヌクレオチドまたはアミノ酸について言及する場合、所与の配列 I D 番号の特性を有する配列を意味する。たとえば、アミノ酸配列に関連して用いられる場合、この語句は、配列自体ならびに配列の機能および新規特性に影響を及ぼさない分子修飾を包含する。

【 0 0 2 7 】

20

「標的核酸」とは、本明細書において用いられる場合、複合核酸混合物中の存在する核酸のあらかじめ規定された領域を意味し、前記規定された野生型領域は、自閉症と関連するか、または関連しない少なくとも1つの公知のヌクレオチド変化を含む。核酸分子は、c D N A クローニングもしくはサブトラクティブハイブリダイゼーションによって天然源から単離することができるか、または手作業で合成することができる。核酸分子は、トリエステル合成法によって手作業で合成することができるか、または自動化 D N A 合成機を用いることによって合成することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明において用いられる核酸に関して、「単離された核酸」という用語が時折用いられる。この用語は、 D N A に対して適用される場合、これが由来する生物の天然に存在するゲノムにおいて、( 5 ' および 3 ' 方向において ) これのすぐ隣の配列によって隔てられた D N A 分子を意味する。たとえば、「単離された核酸」は、プラスミドもしくはウイルスベクターなどのベクター中に挿入されるか、または原核生物もしくは真核生物のゲノム D N A 中に組み入れられた D N A 分子を含んでもよい。「単離された核酸分子」は、 c D N A 分子も含んでよい。ベクター中に挿入された、単離された核酸分子も、本明細書において組換え核酸分子と称する場合もある。

30

【 0 0 2 9 】

R N A 分子に関して、「単離された核酸」という用語は、主に、上記定義の単離された D N A 分子によってコードされる R N A 分子を意味する。あるいは、前記用語は、その自然状態において( すなわち、細胞もしくは組織において ) 関連する R N A 分子から十分に分離され、したがって「実質的に純粋な」形態で存在する R N A 分子を意味する。

40

【 0 0 3 0 】

核酸に関連して「濃縮された」という用語を使用することによって、特異的 D N A もしくは R N A 配列が、正常細胞もしくは配列を採取した細胞におけるよりも、対象の細胞もしくは溶液中に存在する全 D N A もしくは R N A の有意に高い割合( 2 ~ 5 倍 ) を構成することを意味する。これは、存在する他の D N A もしくは R N A の量の優先的減少によるか、または特異的 D N A もしくは R N A 配列の量の優先的増加によるか、またはこれら2つの組み合わせによって、人為的に引き起こすことができる。しかし、「濃縮された」とは、他の D N A もしくは R N A 配列が存在しないという意味ではなく、単に対象の配列の相対量が有意に増加したことを意味する。

50

## 【0031】

ある目的に関しては、ヌクレオチド配列が精製された形態であることも有利である。核酸に関する「精製された」という用語は、絶対的な純度（たとえば、均一調製物）を要求するわけではなく、当該配列が、自然環境におけるよりも相対的に純粋であることを示す（自然のレベルと比較して、このレベルは、たとえばmg / mlで表して少なくとも2~5倍高い）。cDNAライブラリから単離された個々のクローンを精製して、電気泳動均質性にことができる。これらのクローンから得られる、クレームされるDNA分子は、全DNAもしくは全RNAから直接得ることができる。cDNAクローンは天然には存在せず、むしろ好ましくは部分的に精製された天然に存在する物質（メッセンジャーRNA）の操作によって得られる。mRNAからのcDNAライブラリの構築は、合成物質（cDNA）の作製を含み、純粋な個々のcDNAクローンの作製は、cDNAライブラリを担う細胞のクローン選択によって合成ライブラリから単離することもできる。mRNAからのcDNAライブラリの構築および別個のcDNAクローンの単離を含むプロセスによって、本来のメッセージの約10<sup>-6</sup>倍の精製が得られる。したがって、少なくとも1倍、好ましくは2倍もしくは3倍、さらに好ましくは4倍もしくは5倍の精製が特に想定される。

## 【0032】

「実質的に純粋な」という用語は、少なくとも50~60重量%の対象の化合物（たとえば、核酸、オリゴヌクレオチド等）（たとえば、核酸、オリゴヌクレオチド等）を含む調製物を意味する。さらに好ましくは、前記調製物は、少なくとも75重量%、最も好ましくは90~99重量%の対象の化合物を含む。純度は、対象の化合物について適切な方法によって測定する。

## 【0033】

「相補的」という用語は、多数の有益な互いとの相互作用を形成し得る2つのヌクレオチドを表す。たとえば、アデニンはチミンに対して相補的である。その理由は、これらが2つの水素結合を形成できるためである。同様に、グアニンとシトシンとは、これらが3つの水素結合を形成できるため、相補的である。したがって、核酸配列が次の塩基配列、チミン、アデニン、グアニンおよびシトシンを含むならば、この核酸分子の「補体」は、チミンの代わりにアデニン、アデニンの代わりにチミン、グアニンの代わりにシトシン、そしてシトシンの代わりにグアニンを含む分子である。補体は、親核酸分子と最適の相互作用を形成する核酸配列を含み得るので、このような補体はその親分子と高い親和性で結合することができる。

## 【0034】

一本鎖核酸、特にオリゴヌクレオチドに関して、「特異的にハイブリダイズする」という用語は、当分野において一般的に用いられる、あらかじめ決められた条件下でこのようなハイブリダイゼーションを可能にするために十分相補的な配列の2つの一本鎖ヌクレオチド分子間の関連性を意味する（「実質的に相補的」と称する場合もある）。特に、この用語は、本発明の一本鎖DNAもしくはRNA分子内に含まれる実質的に相補的な配列を用いたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを意味し、非相補的配列の一本鎖核酸を用いたオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを実質的に排除する。たとえば、特異的ハイブリダイゼーションは、任意の自閉症特異的マーカー遺伝子もしくは核酸とハイブリダイズするが、他のヌクレオチドとはハイブリダイズしない配列を意味し得る。また、「特異的にハイブリダイズする」ポリヌクレオチドは、神経特異的マーカー、たとえば本明細書に含まれる表中に示される自閉症特異的マーカーのみとハイブリダイズし得る。様々な相補性を有する一本鎖核酸分子の特異的ハイブリダイゼーションを可能にする適切な条件は、当分野で周知である。

## 【0035】

たとえば、特定の配列相同性を有する核酸分子間のハイブリダイゼーションを達成するために必要なストリンジエントな条件を計算するための1つの一般式を以下に記載する（Sambrook et al. , Molecular Cloning , Cold S 50

pring Harbor Laboratory (1989) :

【数1】

$$T_m = 81.5^\circ C + 16.6 \log [Na^+] + 0.41(\% G+C) - 0.63(\% ホルムアミド) - 600 \text{二本鎖中のbp数}$$

【0036】

上記式に示すように、 $[Na^+] = [0.368]$  および 50% ホルムアミド (GC 含有量 42%、平均プローブサイズ 200 塩基) を用いて、 $T_m$  は 57 である。DNA 二本鎖の  $T_m$  は、相同性が 1% 減少するごとに 1~1.5 減少する。したがって、約 75% を超える配列同一性を有する標的が、42 のハイブリダイゼーション温度を用いて観察される。

10

【0037】

ハイブリダイゼーションおよび洗浄のストリンジェンシーは、主に溶液の塩濃度および温度に依存する。一般的に、プローブをその標的を用いてアニーリングする速度を最大にするために、ハイブリダイゼーションは、通常、ハイブリッドの計算された  $T_m$  より 20~25 低い塩および温度条件で実施する。洗浄条件は、標的のプローブに関する同一性の程度について可能な限りストリンジェントであるべきである。一般的に、洗浄条件はハイブリッドの  $T_m$  よりも約 12~20 低くなるように選択される。本発明の核酸に関して、中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーションは、6×SSC、5×デンハート液、0.5% SDS および 100 μg / ml 变性サケ精子DNA 中 42 中でのハイブリダイゼーションと、2×SSC および 0.5% SDS 中 55 で 15 分間洗浄と定義される。高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、6×SSC、5×デンハート液、0.5% SDS および 100 μg / ml 变性サケ精子DNA 中 42 でのハイブリダイゼーションと、1×SSC および 0.5% SDS 中 65 で 15 分間洗浄として定義される。極高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションは、6×SSC、5×デンハート液、0.5% SDS および 100 μg / ml 变性サケ精子DNA 中 42 でのハイブリダイゼーションと、0.1×SSC および 0.5% SDS 中 65 で 15 分間の洗浄として定義される。

20

【0038】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書において用いられる場合、2 もしくはそれ以上、好ましくは 3 より多いリボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドから構成される核酸分子として定義される。オリゴヌクレオチドの正確なサイズは、様々な因子およびオリゴヌクレオチドの具体的な用途および使用に依存するであろう。プローブおよびプライマーを含むオリゴヌクレオチドは、3 ヌクレオチドから核酸分子の完全長までの任意の長さであり得、明確には、3 から完全長のポリヌクレオチドまでの連続した核酸のあらゆる可能な数を包含する。好ましくは、オリゴヌクレオチドは少なくとも約 10 ヌクレオチドの長さであり、さらに好ましくは少なくとも 15 ヌクレオチドの長さであり、さらに好ましくは少なくとも約 20 ヌクレオチドの長さである。

30

【0039】

「プローブ」という用語は、本明細書において用いられる場合、精製された制限酵素消化物におけるなど天然に存在するか、または合成によって產生されるかにかかわらず、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチドまたは核酸、RNA もしくは DNA のいずれかを意味し、これはプローブに対して相補的な配列を有する核酸とアニーリングできるか、または核酸に対して特異的にハイブリダイズすることができる。プローブは、一本鎖もしくは二本鎖のいずれかであってよい。プローブの正確な長さは、温度、プローブ源および前記方法の使用をはじめとする多くの因子に依存するであろう。たとえば、診断用途に関して、前記標的配列の複雑さに応じて、前記オリゴヌクレオチドプローブは典型的には 15~25 もしくはそれ以上のヌクレオチドを含むが、これより少ないヌクレオチドを含む場合もある。本明細書におけるプローブは、特定の標的核酸配列の異なるストランドに対して相補的であるように選択される。このことは、前記プローブが、これらのそれぞれの標的ストランドとあらかじめ決められた条件下で、「特異的にハイブリダイズする」ことがで

40

50

きるかまたはアニールすることができるために十分相補的でなければならないことを意味する。したがって、前記プローブ配列は前記標的の正確な相補的配列を反映する必要はない。たとえば、非相補的ヌクレオチド断片を前記プローブの5'もしくは3'と結合させてもよく、前記プローブ配列の残りは前記標的ストランドに対して相補的である。あるいは、非相補的塩基またはさらに長い配列をプローブ中に組み入れることができる。ただし、前記プローブ配列は前記標的核酸の配列と、特異的にアニールするために十分な相補性を有するものとする。

## 【0040】

「プライマー」という用語は、本明細書において用いられる場合、RNAもしくはDNAのいずれか、一本鎖もしくは二本鎖のいずれか、生物系由来であるか、制限酵素消化によって生じるか、もしくは合成によって產生されるかのいずれかであるオリゴヌクレオチドであって、適切な環境中に置かれると、テンプレート依存性核酸合成の開始剤として機能的に作用できるオリゴヌクレオチドを意味する。適切な核酸テンプレート、核酸の適切なヌクレオシド三リン酸前駆体、ポリメラーゼ酵素、好適な補助因子ならびに好適な温度およびpHなどの条件が提供されると、前記プライマーを、ポリメラーゼの作用によるヌクレオチドの付加もしくは類似の作用によって3'末端で伸長して、プライマー伸長産物を得ることができる。前記プライマーは特定の適用条件および要件に応じて長さが変わり得る。たとえば、診断的適用において、前記オリゴヌクレオチドプライマーは典型的には15~25もしくはそれ以上のヌクレオチドの長さである。前記プライマーは、所望の伸長産物の合成を準備するために十分な、所望のテンプレートに対する相補性を有するものでなければならない。すなわち、ポリメラーゼもしくは類似の酵素による合成の開始で使用される適切な並置においてプライマーの3'ヒドロキシル部分を提供するために十分な方法で所望のテンプレートストランドとアニールすることができる。前記プライマー配列が所望のテンプレートの正確な補体である必要はない。たとえば、非相補的ヌクレオチド配列を、それ以外は相補的であるプライマーの5'末端と結合させてもよい。あるいは、非相補的塩基をオリゴヌクレオチドプライマー配列内に組み入れてもよい。ただし、前記プライマー配列は、前記伸長産物の合成用テンプレート・プライマー複合体を機能的に提供するために十分な、所望のテンプレートストランド配列との相補性を有する。

## 【0041】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、その開示全体がこの参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,683,195号明細書、同第4,800,195号明細書、および同第4,965,188号明細書に記載されている。

## 【0042】

「ベクター」という用語は、細胞中に感染、トランスフェクトもしくは形質転換することができ、独立的もしくは宿主細胞ゲノム内で複製できる、一本鎖もしくは二本鎖環状核酸分子に関する。環状二本鎖核酸分子は、切断することができ、それによって制限酵素で処理して直線化することができる。各種ベクター、制限酵素、および制限酵素によって標的とされるヌクレオチド配列の情報は、当業者には容易に利用可能であり、レプリコン、たとえばプラスミド、コスミド、バクミド、ファージもしくはウイルスを包含し、これに対して別の遺伝子配列もしくは要素(DNAもしくはRNAのいずれか)を結合させて、結合配列もしくは要素を複製することができる。ベクターを制限酵素で切断し、2断片を合わせてライゲートすることによって、本発明の核酸分子をベクター中に挿入することができる。

## 【0043】

原核生物もしくは真核生物中への発現構築物の形質転換、トランスフェクション、または形質導入を促進するために、当業者には多くの技術が利用可能である。「形質転換」、「トランスフェクション」、および「形質導入」という用語は、細胞もしくは宿主生物中へ核酸および/または発現構築物を挿入する方法を意味する。これらの方法は、前記細胞を高濃度の塩、電場、もしくは界面活性剤で処理して前記宿主細胞外膜もしくは壁を対象の核酸分子に対して透過性にすること、微量注入法、PEG融合法など、様々な技術を包

10

20

30

40

50

含する。

【0044】

「プロモータ要素」という用語は、一旦は適切な細胞の内部で、転写因子および／またはポリメラーゼ結合ならびにその後のベクターD N Aの一部のm R N A中への転写を促進できるベクター中に組み入れられるヌクレオチド配列を表す。一実施形態において、本発明のプロモータ要素は、自閉症特異的マーカー核酸分子の5'末端の前にあるので、後者がm R N A中に転写される。宿主細胞機構は次にm R N Aをポリペプチドに翻訳する。

【0045】

当業者は、核酸ベクターが、プロモータ要素および自閉症特異的マーカー遺伝子核酸分子以外の核酸要素を含み得ることを認識するであろう。これらの他の核酸要素は、これに限定されるものではないが、複製起点、リボソーム結合部位、薬剤耐性酵素またはアミノ酸代謝酵素をコードする核酸配列、および分泌シグナル、局在化シグナル、もしくはポリペプチド精製に有用なシグナルをコードする核酸配列を包含する。

【0046】

「レプリコン」は、任意の遺伝要素、たとえば、プラスミド、コスミド、バクミド、プラスチド、ファージもしくはウイルスであり、主にそれ自体の制御下で複製できるものである。レプリコンは、R N AもしくはD N Aのいずれかであってよく、一本鎖であっても、二本鎖であってもよい。

【0047】

「発現オペロン」は、転写および翻訳制御配列、たとえばプロモータ、エンハンサ、翻訳開始シグナル（たとえば、A T GもしくはA U Gコドン）、ポリアデニル化シグナル、ターミネータ等を有してもよく、宿主細胞もしくは生物におけるポリペプチドコーディング配列の発現を促進する核酸断片を意味する。

【0048】

本明細書で用いられる場合、「レポーター」、「レポーター系」、「レポーター遺伝子」、もしくは「レポーター遺伝子産物」という用語は、核酸が、発現された場合に、たとえば、生物学的検定法、免疫測定、放射免疫測定、または比色法、蛍光法、化学発光法もしくは他の方法によって容易に測定可能であるレポーターシグナルを産生する産物をコードする遺伝子を含む、機能的遺伝系を意味する。前記核酸は、R N AもしくはD N A、線状もしくは環状、一本鎖もしくは二本鎖、アンチセンスもしくはセンス極性のいずれかであり、レポーター遺伝子産物の発現に必要な制御要素と機能的に連結される。必要な制御要素は、レポーター系の性質、およびレポーター遺伝子がD N AもしくはR N Aの形態であるかどうかによって変化するが、これらに限定されるものではないが、プロモータ、エンハンサ、翻訳制御配列、ポリA付加シグナル、転写終結シグナル等の要素を挙げることができる。

【0049】

導入された核酸は、受容細胞もしくは生物の核酸中に組み入れられる（共有結合する）可能性もあるし、そうでない可能性もある。細菌、酵母、植物および哺乳動物細胞において、たとえば、導入された核酸をエピソーム要素もしくは独立レプリコン、たとえばプラスミドとして維持することができる。あるいは、導入された核酸は、受容細胞もしくは生物の核酸中に組み入れられるようになる可能性があり、当該細胞もしくは生物中で安定して維持され、前記受容細胞もしくは生物の子孫細胞もしくは生物にさらに伝えられるもしくは受け継がれる可能性がある。最後に、導入された核酸は、一時的にのみ受容細胞もしくは宿主生物において存在できる。

【0050】

「選択可能なマーカー遺伝子」という用語は、発現された場合に、形質転換細胞に選択可能な表現型、たとえば抗生物質耐性を付与する遺伝子を意味する。

【0051】

「機能的に連結された」という用語は、コーディング配列の発現に必要な調節配列が、コーディング配列の発現を行うためにコーディング配列に対して適切な位置にD N A分子

10

20

30

40

50

が位置していることを意味する。この同じ定義は、発現ベクター中の転写単位および他の転写制御要素（たとえば、エンハンサ）の配置に対しても適用される場合がある。

【0052】

「組換え生物」もしくは「トランスジェニック生物」という用語は、遺伝子もしくは核酸分子の新規組み合わせを有する生物を意味する。遺伝子もしくは核酸分子の新規組み合わせを、当業者に利用可能な多様な核酸操作手法を用いて生物中に導入することができる。「生物」という用語は、少なくとも1つの細胞から成る任意の生き物に関連する。生物は、1つの真核細胞のような簡単なものであってもよく、または哺乳動物のような複雑なものであってもよい。したがって、「組換え生物」という語句は、組換え細胞、ならびに真核生物および原核生物を包含する。

10

【0053】

「単離されたタンパク質」もしくは「単離され、かつ精製されたタンパク質」という語句を本明細書において用いる場合がある。この用語は、本発明の単離された核酸分子の発現によって産生されるタンパク質を主に意味する。あるいは、この用語は、これが自然に関連する他のタンパク質から十分に分離されているので、「実質的に純粋な」形態で存在するタンパク質を意味する場合もある。「単離された」という用語は、他の化合物もしくは物質との人工もしくは合成混合物、または基本的な活性を妨害せず、たとえば、不完全な精製、安定剤の添加、またはたとえば免疫原性製剤もしくは薬剤的に許容される製剤中の配合によって、存在する可能性がある不純物の存在を排除することを意味しない。

20

【0054】

「特異的結合対」は、正常な状態では他の分子に対してよりも互いに優先的に結合する、互いについて特別な特異性を有する特異的結合要素 (s b m) および結合パートナー (b p) を含む。特異的結合対の例は、抗原および抗体、リガンドおよび受容体ならびに相補的ヌクレオチド配列である。当業者は、多くの他の例を認識する。さらに、「特異的結合対」という用語は、特異的結合要素および結合パートナーのいずれかもしくは両方が大分子の一部を含む場合にも適用可能である。特異的結合対が核酸配列を含む実施形態において、これらは、アッセイ条件下で、互いにハイブリダイズする長さ、好ましくは10ヌクレオチドを超える長さ、さらに好ましくは15もしくは20ヌクレオチドを超える長さを有するものであろう。

30

【0055】

「試料」もしくは「患者試料」もしくは「生体試料」とは、概して、特定の分子、好ましくは自閉症特異的マーカー分子、たとえば下記の表中に示すマーカーについて試験することができる試料を意味する。試料は、これに限定されるものではないが、細胞、血液、血清、血漿、尿、唾液、脳脊髄液、涙液、胸膜液をはじめとする体液等を含んでもよい。

【0056】

「薬剤」および「試験化合物」という用語は、本明細書において交換可能に用いられ、化合物、化合物の混合物、生体高分子、または細菌、植物、真菌もしくは動物（特に哺乳動物）細胞もしくは組織などの生体材料から作製される抽出物を意味する。生体高分子としては、s i R N A、s h R N A、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ペプチド、ペプチド / D N A 複合体、および本明細書に記載される S N P および / または C N V 含有核酸またはこれらのコードされたタンパク質の活性を調節する能力を示す任意の核酸に基づく分子が挙げられる。薬剤は、本明細書で以下に記載するスクリーニングアッセイを組み入れることによって、潜在的な生物活性について評価される。

40

【0057】

自閉症および自閉症スペクトラム障害の発現の傾向を診断するために自閉症関連 C N V S および / または S N P S を使用する方法

これに限定されるものではないが、下記表中に記載されたものを含む自閉症関連 C N V および / または S N P 含有核酸を、本発明の様々な目的に関して使用することができる。自閉症関連 C N V / S N P 含有 D N A、R N A、もしくはその断片を、自閉症特異的マーカーの存在および / または発現を検出するためのプローブとして使用できる。自閉症特異

50

的マークー核酸をこのようなアッセイのプローブとして利用できる方法としては、これらに限定されるものではないが：(1)インサイチュハイブリダイゼーション；(2)サザンハイブリダイゼーション(3)ノーザンハイブリダイゼーション；および(4)ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの各種増幅反応が挙げられる。

【0058】

さらに、自閉症関連CNVs/SNPsを検出するためのアッセイを、これに限定されるものではないが、体液(血液、尿、血清、脳脊髄液、胃洗浄を含む)、任意の種類の細胞(たとえば、脳細胞、白血球、単核細胞)または生体組織を含む任意の種類の生体試料に関して実施することができる。

【0059】

先の考察から、本発明の、自閉症関連CNV/SNP含有核酸、これを発現するベクター、自閉症CNV/SNP含有マーカータンパク質および抗自閉症特異的マーカー抗体を用いて、生体組織、細胞、もしくは流体において自閉症関連CNVs/SNPsを検出し、自閉症の発現に関する遺伝子およびタンパク質相互作用を評価する目的で、自閉症SNP含有マーカータンパク質発現を変えることができる。 10

【0060】

自閉症関連CNVs/SNPsについてスクリーニングするためのほとんどの実施形態において、試料中の自閉症関連CNV/SNP含有核酸を、たとえばPCRを用いてまず増幅させて、試料中に存在する他の配列と比較してテンプレートの量を増加させる。これによって、標的配列が、もし試料中に存在するならば、高い感度で検出されること可能になる。この初期工程は、当分野でますます重要になってきている高感度アレイ技術を用いることによって回避できる。あるいは、新規検出技術で、この制限を克服することができ、全RNAで1μgもの少量しか含有しない小試料の分析を可能にできる。伝統的な蛍光技術に対して、共鳴光散乱(RLS)技術を用いて、ビオチンで標識されたハイブリッド標的および抗ビオチン抗体を使用して、複数の読み出しで少量のmRNAを検出することができる。PCR増幅の別の代替法は、シグナル対ノイズ比を増加させ、バックグラウンド干渉を減少させるために、プラナー型導波技術(PWG)を含む。両技術は、Quageen Inc.(米国)から市販されている。 20

【0061】

したがって、前記技術のいずれかを用いて、自閉症関連CNV/SNPマーカー発現を検出もしくは定量化することができ、ひいては自閉症を診断することができる。 30

【0062】

キットおよび製品

任意の前記製品を、自閉症関連CNV/SNP特異的マーカー(ポリヌクレオチドまたは遺伝子チップ)上に固定化された1もしくはそれ以上のかかるマーカー、オリゴヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、抗体、標識、マーカー、またはレポーター、薬剤的に許容される担体、生理学的に許容される担体、使用説明書、容器、投与用容器、アッセイ用基質、またはこれらの任意の組み合わせを含んでよいキット中に組み入れることができる。 40

【0063】

治療薬開発のために自閉症関連CNVs/SNPsを使用する方法

本明細書で同定されるCNVsおよびSNPsは自閉症の病因と関連するので、前記遺伝子およびかかるCNVs/SNPsを含有するこれらのコードされた産物の活性を調節する薬剤を同定するための方法によって、この状態と関連する様々な障害を治療するための有効な治療薬が得られるはずである。

【0064】

表に示すデータからわかるように、いくつかの染色体は、それらの活性を調節する治療薬の合理的設計に適した標的を提供する領域を含む。これらの領域に対応する小ペプチド分子を用いて、コードされたタンパク質の活性を有効に調節する治療薬の設計を促進することができる。

【0065】

10

20

30

40

50

分子モデリングは、機能に必要な立体構造もしくは重要なアミノ酸残基に基づいた C N V / S N P 含有核酸によりコードされるタンパク質の活性部位と結合する能力を有する特異的有機分子の同定を促進するはずである。コンビナトリアルケミストリー法を用いて、最高の活性を有する分子を同定し、次いで、さらなるスクリーニングサイクルのためにこれらの分子の相互作用を発展させる。

【 0 0 6 6 】

薬剤スクリーニングアッセイにおいて用いられるポリペプチドもしくは断片は、溶液中束縛されないか、固体担体に付着しているか、または細胞内にあるかのいずれかである。薬剤スクリーニングの一方法は、ポリペプチドもしくは断片を、好ましくは競合的結合アッセイにおいて発現する組換えポリヌクレオチドで適切に形質転換された真核生物もしくは原核生物宿主細胞を利用する。このような細胞は、生存可能な形態であっても、もしくは固定形態のいずれであっても、標準的結合アッセイに使用できる。前記ポリペプチドもしくは断片と試験される前記薬剤間の複合体の形成を決定できるか、または前記ポリペプチドもしくは断片と公知の基質間の複合体形成が試験される薬剤で干渉される程度を調べることができる。

【 0 0 6 7 】

薬剤スクリーニングのための別の技術は、コードされたポリペプチドに適した結合親和性を有する化合物についての高スループットスクリーニングを提供し、 G e y s e n 、 P C T 公開出願、国際公開第 8 4 / 0 3 5 6 4 号パンフレット ( 1 9 8 4 年 9 月 1 3 日付けで公開 ) で詳細に記載されている。簡単に言うと、多数の異なる小ペプチド試験化合物、たとえば前述のものを、プラスチックピンもしくはある他の表面などの固体基体上で合成する。ペプチド試験化合物を標的ポリペプチドと反応させ、洗浄する。結合したポリペプチドを次いで、当分野において周知の方法によって検出する。

【 0 0 6 8 】

薬剤スクリーニングのためのさらなる技術は、非機能的もしくは変更された自閉症関連遺伝子を有する宿主真核細胞系または細胞 ( たとえば、前述のもの ) の使用を包含する。これらの宿主細胞系または細胞は、ペプチドレベルが不良である。前記宿主細胞系もしくは細胞を薬剤化合物の存在下で成長させる。前記宿主細胞の細胞代謝速度を測定して、前記化合物が前記欠損細胞における細胞代謝を調節できるかどうかを決定する。本発明における使用が想定される宿主細胞としては、これらに限定されるものではないが、細菌細胞、真菌細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、および植物細胞が挙げられる。自閉症関連 C N V / S N P をコードする D N A 分子を、このような宿主細胞中に単独または組み合わせて導入して、このような発現によって付与される細胞の表現型を評価することができる。 D N A 分子を導入する方法も、当業者に周知である。このような方法は、 A u s u b e l e t a l . e d s . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , John Wiley & Sons , N Y , N . Y . 1 9 9 5 に記載され、その開示は、この参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 9 】

本発明の新規 D N A 配列を発現するように修飾することができる、様々な発現ベクターが利用可能である。本明細書で例示する特異的ベクターは単なる例であって、本発明の範囲を制限することを意図しない。発現方法は、 S a m b r o o k e t a l . M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l o r C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y 1 6 . 3 - 1 7 . 4 4 ( 1 9 8 9 ) によって記載されている。サッカロマイセス ( S a c c h a r o m y c e s ) における発現方法も C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y ( 1 9 8 9 ) で記載されている。

【 0 0 7 0 】

本発明の実施において使用するのに適したベクターとしては、原核生物ベクター、たとえば p N H ベクター ( S t r a t a g e n e I n c . , 1 1 0 9 9 N . T o r r e y P i n e s R d . , L a J o l l a , カリフォルニア州 9 2 0 3 7 ) 、 p E T ベク

10

20

30

40

50

ター (Novogen Inc., 565 Science Dr., Madison, ウィスコンシン州 53711) および pGEX ベクター (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, ニュージャージー州 08854) が挙げられる。本発明の実施において有用な真核生物ベクターの例としては、ベクター pRC/CMV、pRC/RSV、および pREP (Invitrogen, 11588 Sorrento Valley Rd., San Diego. カリフォルニア州 92121); pCDNA3.1/V5&His (Invitrogen); バクロウイルスベクター、たとえば pVL1392、pVL1393、もしくは pAC360 (Invitrogen); ならびに酵母ベクター、たとえば YRP17、YIP5、および YEP24 (New England Biolabs, Beverly, マサチューセッツ州)、ならびに pRS403 および pRS413 Stratagene Inc.); ピチアベクター、たとえば pHIL-D1 (Phillips Petroleum Co., Bartlesville, オ克拉ホマ州 74004); レトロウイルスベクター、たとえば PLNCX および pLPCX (Clontech); ならびにアデノウイルスおよびアデノ関連ウイルスベクターが挙げられる。

【0071】

本発明の発現ベクターにおいて用いられるプロモータとしては、原核細胞もしくは真核細胞において機能できるプロモータが挙げられる。原核細胞において機能できるプロモータとしては、ラクトース (lac) 制御要素、バクテリオファージラムダ (pL) 制御要素、アラビノース制御要素、トリプトファン (trp) 制御要素、バクテリオファージ T7 制御要素、およびこれらのハイブリッドが挙げられる。真核細胞において機能できるプロモータとしては、エプスタイン・バー・ウイルス・プロモータ、アデノウイルスプロモータ、SV40 プロモータ、ラウス肉腫ウイルスプロモータ、サイトメガロウイルス (CMV) プロモータ、バクロウイルスプロモータ、たとえば AcMNPV ポリヘドリンプロモータ、ピチアプロモータ、たとえばアルコール・オキシダーゼ・プロモータ、およびサッカロマイセスプロモータ、たとえば gal4 誘導プロモータおよび PGK 構成的プロモータ、ならびに神経細胞特異的血小板由来成長因子プロモータ (PDGF)、Thy-1 プロモータ、ハムスターおよびマウス・ブリオン・プロモータ (MOPrP)、およびグリア細胞におけるトランス遺伝子の発現のためのグリア細胞纖維性酸性タンパク質 (GFAp) が挙げられる。

【0072】

加えて、本発明のベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を促進する多様なマーカーのうちのいずれか 1 つを含んでもよい。このようなマーカーとしては、温度感受性、薬剤耐性、もしくは前記宿主生物の表現型の特徴と関連する酵素と関連する遺伝子が挙げられる。

【0073】

本発明の自閉症関連 CNVs / SNPs もしくはその機能的断片を発現する宿主細胞は、その中で潜在的な化合物もしくは薬剤を自閉症の発現を調節する能力についてスクリーニングするシステムを提供する。したがって、一実施形態において、本発明の核酸分子を、神経シグナリングならびに神経細胞伝達および構造と関連する細胞代謝の態様を調節する薬剤を同定するためのアッセイにおいて使用される組換え細胞系を作製するために使用することができる。本明細書では、CNV / SNP 含有核酸によってコードされるタンパク質の機能を調節できる化合物についてのスクリーン法も提供する。

【0074】

別の方法は、ファージ表面上の CNV / SNP 含有核酸によってコードされるポリペプチドの断片を発現するように操作された、ファージ・ディスプレー・ライプラリの使用を必要とする。このようなライプラリを次いで、発現されたペプチドとケミカルライプラリの成分との間の結合親和性を検出できる条件下で、コンビナトリアル・ケミカル・ライプラリと接触させる。米国特許第 6,057,098 号および同第 5,965,456 号明細書は、このようなアッセイを実施するための方法および装置を提供する。このような化

10

20

30

40

50

合物ライブラリは、これに限定されるものではないが、Maybridge Chemical Co. (英国コーンウォール州Trevillet)、Comgenex (ニュージャージー州Princeton)、Microsour (コネチカット州New Milford)、Aldrich (ウィスコンシン州Milwaukee)、Akos Consulting and Solutions GmbH (スイス国Basel)、Ambinter (仏国Paris)、Asinex (露国Moscow)、Aurora (オーストリア国Graz)、BioFocus DPI (スイス国)、Bionet (英国Camelford)、Chembridge (カリフォルニア州San Diego)、Chem Div (カリフォルニア州San Diego) を含む多くの企業から市販されている。当業者は、他の供給源を認識し、これを容易に購入することができる。治療上有効な化合物は、本明細書において記載するスクリーニングアッセイで同定されると、医薬組成物に処方することができ、自閉症の治療に利用することができる。  
10

#### 【0075】

合理的薬物設計の目標は、ポリペプチドのさらに活性もしくは安定な形態であるか、またはたとえば、ポリペプチドの生体内機能を向上もしくは妨害する薬剤を調製するために、対象の生物活性ポリペプチド、またはこれらと相互作用する小分子 (たとえば、作用物質、拮抗物質、阻害物質) の構造的類似体を產生することである。たとえば、Hodgson, (1991) Bio/Technology 9: 19-21を参照。前述の方法において、対象のタンパク質の三次元構造、またはたとえば、タンパク質・基質複合体の三次元構造を、X線結晶学によるか、核磁気共鳴によるか、コンピュータモデリングによるか、または最も典型的には方法の組み合わせによって解明する。それほど頻繁ではないが、ポリペプチドの構造に関する有用な情報が、相同タンパク質の構造に基づくモデリングによって得られる。合理的薬物設計の一例は、HIVプロテアーゼ阻害物質の開発である (Erickson et al., (1990) Science 249: 527-533)。加えて、ペプチドをアラニン・スキャンによって分析することができる (Wells, (1991) Meth. Enzym. 202: 390-411)。この技術では、アミノ酸残基をAlaと置換し、ペプチドの活性に対するその影響を決定する。ペプチドのアミノ酸残基のそれぞれを、ペプチドの重要な領域を決定するためのこのような方法で分析する。  
20

#### 【0076】

機能分析によって選択される、標的特異的抗体を単離することも可能であり、次いでその結晶構造を解明することができる。原則として、この方法は、その後の薬剤設計の基礎とすることができるファーマコア (pharmacore) を產生する。  
30

#### 【0077】

抗イディオタイプ抗体 (anti-ids) を生成させて、機能的な薬理活性抗体にすることによって、タンパク質結晶学を完全に回避することができる。鏡像の鏡像として、anti-idsの結合部位は、オリジナルの分子の類似体であることが予想される。anti-idsを次いで、化学的もしくは生物学的に產生されたペプチドバンクのバンクからペプチドを同定し、単離するために使用できる。選択されたペプチドはファーマコアとしての働きをする。  
40

#### 【0078】

このように、たとえば、改善されたポリペプチド活性もしくは安定性を有するか、またはポリペプチド活性の阻害物質、作用物質、拮抗物質等としての働きをする薬剤を設計することができる。本明細書において記載するCNV/SNP含有核酸配列の利用可能性に基づいて、十分な量のコードされたポリペプチドを、X線結晶学などの分析的研究を実施するために利用可能にすることができる。加えて、本明細書で提供するタンパク質配列の情報は、X線結晶学の代わりに、またはX線結晶学に加えて、コンピュータモデリング技術を採用する者の指針となるであろう。  
50

#### 【0079】

別の実施形態において、自閉症関連CNV/SNP含有核酸の利用可能性によって、本

10

20

30

40

50

発明の自閉症関連 C N V s / S N P s を保有する実験用マウスの系統の生産が可能になる。本発明の自閉症関連 C N V / S N P を発現するトランスジェニックマウスは、その中で自閉症の発生および進行において、S N P 含有核酸によりコードされるタンパク質の役割を調べるためのモデル系を提供する。実験用マウス中にトランス遺伝子を導入する方法は、当業者に公知である。3つの一般的な方法はとしては次のものが挙げられる：1. 対象の外来遺伝子をコードするレトロウイルスベクターを初期胚中に組み入れる；2. 新たに受精した卵の前胚中に D N A を注入する；および3. 遺伝子操作された胚幹細胞を初期胚中に組み入れる。前述のトランスジェニックマウスの生産は、様々な細胞代謝プロセスおよび神経プロセスにおける標的タンパク質の役割の分子的説明を容易にする。このようなマウスは、全動物モデルにおける推定治療薬剤を研究するための生体内スクリーニング手段を提供し、本発明に含まれる。

10

#### 【 0 0 8 0 】

「動物」という用語は、本明細書においては、ヒトを除く全ての脊椎動物を包含するために用いられる。胚形成および胎児期を包含する、発生のあらゆる段階における各動物も包含する。「トランスジェニック動物」は、標的組換えもしくは微量注入法もしくは組換えウイルスでの感染によるなど、細胞以下のレベルでの意図的な遺伝子操作によって、直接的もしくは間接的に、変更もしくは受容された遺伝子情報を有する1もしくはそれ以上の細胞を含む任意の動物である。「トランスジェニック動物」という用語は、古典的な交雑育種または体外受精を包含することを意味するのではなく、むしろ1もしくはそれ以上の細胞が組換え D N A 分子によって変更されているか、または組換え D N A 分子を受容した動物を包含することを意味する。この分子は、規定された遺伝子座を特異的に標的とするか、染色体内にランダムに組み入れられるか、または D N A を染色体外複製することができる。「生殖細胞系トランスジェニック動物」という用語は、その中で遺伝子変化もしくは遺伝情報が生殖細胞系中に導入され、これによって前記遺伝情報を子孫に移す能力が付与されたトランスジェニック動物を意味する。このような子孫が、実際に、この変化もしくは遺伝情報の一部または全てを有するならば、これらもまたトランスジェニック動物である。

20

#### 【 0 0 8 1 】

遺伝情報の変化は、受容者が属する動物種に対して異質であってもよく、または特定の各受容者のみに対して異質であってもよく、または受容者がすでに保有している遺伝情報であってもよい。最後の場合、変更もしくは導入された遺伝子は、生来の遺伝子とは異なって発現される可能性がある。このような変更もしくは異質遺伝情報は、自閉症関連 C N V / S N P 含有ヌクレオチド配列の導入を包含する。

30

#### 【 0 0 8 2 】

標的遺伝子を変えるために用いられる D N A は、これらに限定されるものではないが、ゲノム源からの単離、単離された m R N A テンプレートからの c D N A の調製、直接合成、またはこれらの組み合わせを包含する様々な技術によって得ることができる。

#### 【 0 0 8 3 】

トランス遺伝子導入に好適な種類の標的細胞は、胚性幹細胞 ( E S ) である。 E S 細胞は、体外で培養された着床前の胚から得ることができる ( Evans et al. , ( 1981 ) Nature 292 : 154 - 156 ; Bradley et al. , ( 1984 ) Nature 309 : 255 - 258 ; Gossler et al. , ( 1986 ) Proc. Natl. Acad. Sci. 83 : 9065 - 9069 )。トランス遺伝子は、 D N A トランスフェクションなどの標準的技術によるか、またはレトロウイルス媒介性形質導入によって、 E S 細胞中に有効に導入することができる。結果として得られる形質転換された E S 紹介細胞を、その後、ヒト以外の動物から得られる未分化胚芽細胞と組み合わせることができる。導入された E S 紹介細胞は、その後、胚でコロニーを形成し、結果として得られるキメラ動物の生殖細胞系に寄与する。

40

#### 【 0 0 8 4 】

個々の遺伝子およびこれらの発現産物の寄与を決定する問題に対する一つの取り組みは

50

、単離された自閉症関連 C N V / S N P 遺伝子を挿入カセットとして使用して、分化全能性の E S 細胞（たとえば、前述のもの）における野生型遺伝子を選択的に不活性化し、次いでトランスジェニックマウスを生成させることである。遺伝子標的トランスジェニックマウスの生成における遺伝子標的 E S 細胞の使用は記載され、他の場所で概説されている（F ro hman et al . , ( 1 9 8 9 ) C e l l 5 6 : 1 4 5 - 1 4 7 ; B r a d l e y et al . , ( 1 9 9 2 ) B i o / T e c h n o l o g y 1 0 : 5 3 4 - 5 3 9 ）。

【 0 0 8 5 】

任意の遺伝領域を不活性化もしくは変更して、染色体対立遺伝子中に特異的变化を導入するための標的相同組換えを用いることによって所望の突然変異にするための技術が利用可能である。しかし、1 0 0 % に近い頻度で起こる相同染色体外組換えと比較して、相同プラスミド - 染色体組換えは、当初、 $1 0 ^ { - 6 } \sim 1 0 ^ { - 3 }$  間の頻度で検出されるだけであると報告された。非相同プラスミド - 染色体相互作用は、匹敵する相同挿入よりも $1 0 ^ { 5 }$  倍 ~  $1 0 ^ { 2 }$  倍高いレベルでより頻繁に起こる。

【 0 0 8 6 】

ネズミ E S 細胞における標的組換えのこのような低い割合を克服するために、希少な相同組換え体を検出もしくは選択するための様々な方法が開発された。相同変化事象を検出するための一つの取り組みは、ポリメラーゼ連鎖反応（ P C R ）を用いて形質転換細胞のプールを相同挿入についてスクリーンし、続いて個々のクローンのスクリーンを行う。あるいは、相同挿入が起こる場合にのみ活性になり、これらの組換え体が直接的に選択されることが可能になるマーカー遺伝子が構築される、正の遺伝子選択法が開発されている。相同組換え体を選択するために開発された最も有力な方法のうちの 1 つは、変化の直接選択が存在しない遺伝子について開発された正負選択（ P N S ）法である。前記マーカー遺伝子はそれ自身のプロモータを有するので、前記 P N S 法は、高レベルで発現されない遺伝子を標的とするのにより有効である。非相同組換え体は、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ H S V - T K ）遺伝子を使用し、ガンシクロビル（ G A N C ）もしくは（ 1 - ( 2 - デオキシ - 2 - フルオロ - B - D アラビノフルラノシリ ) - 5 - ヨードウラシリル（ F I A U ）などの有効なヘルペス薬を用いたその非相同挿入に対して選択することによって、選択される。この対抗選択によって、生存している形質転換体における多くの相同組換え体の数を増大させることができる。自閉症関連 S N P 含有核酸を標的挿入カセットとして使用することによって、たとえば、自閉症関連 S N P 核酸によってコードされるポリペプチドについて免疫特異的な抗体に対する免疫反応性を獲得することにより可視化されるような挿入の成功を検出するための手段が得られ、かくして所望の遺伝子型を有する E S 細胞のスクリーニング / 選択が促進される。

【 0 0 8 7 】

本明細書で用いられる場合、ノックイン動物は、内因的ネズミ遺伝子が、たとえば、本発明のヒト自閉症関連 C N V / S N P 含有遺伝子と置換されたものである。このようなノックイン動物は、自閉症の発現を研究するための理想的なモデル系を提供する。

【 0 0 8 8 】

本明細書で用いられる場合、自閉症関連 C N V / S N P 含有核酸、その断片、または自閉症関連 C N V / S N P 融合タンパク質の発現は、自閉症関連 C N V / S N P の全部もしくは一部をコードする核酸配列が、特定の組織もしくは細胞型においてコードされたタンパク質の発現を行う調節配列（たとえば、プロモータおよび / またはエンハンサ）に機能的に連結されているベクターを用いる、「組織特異的方法」または「細胞型特異的方法」で標的とすることができます。このような調節要素を、体外および生体内用途の両方について有利に使用することができる。組織特異的タンパク質を管理するプロモータは当分野で周知であり、本明細書で記載する。

【 0 0 8 9 】

本発明の自閉症関連 C N V / S N P をコードする核酸配列を、トランスジェニック動物における発現のために様々なプロモータ配列と機能的に連結することができる。このよう

10

20

30

40

50

なプロモータとしては、これに限定されるものではないが、米国特許第5,877,399号明細書およびBorchelt et al., Genet. Anal. 13 (6) (1996) pages 159-163に記載されているハムスターおよびマウス・プリオン・プロモータ(MoPrP)などのプリオン遺伝子プロモータ；米国特許第5,612,486号明細書、および同第5,387,742号明細書に記載されるラット神経細胞特異的エノラーゼプロモータ；米国特許第5,811,633号明細書に記載される血小板由来成長因子B遺伝子プロモータ；米国特許第5,849,999号明細書に記載される脳特異的ジストロフィンプロモータ；Thy-1プロモータ；PGKプロモータ；CMVプロモータ；神経細胞特異的血小板由来成長因子B遺伝子プロモータ；およびグリア細胞におけるトランス遺伝子発現のためのグリア細胞纖維性酸性タンパク質(GFAP)プロモータが挙げられる。10

#### 【0090】

本発明のトランスジェニックマウスの使用法も本明細書で記載する。自閉症関連CNVs/SNPsを含有する核酸もしくはそのコードされたタンパク質が導入されているトランスジェニックマウスは、たとえば、自閉症の発現を調節できる治療薬を特定するために治療薬をスクリーンするためのスクリーニング法を開発するために有用である。

#### 【0091】

##### 調合薬およびペプチド療法

本明細書で記載する自閉症関連CNVs/SNPsによる神経シグナリングおよび脳構造における役割を解明することによって、自閉症の治療および診断に有用な医薬組成物の開発が促進される。これらの組成物は、上記物質のうちの1つのほかに、薬剤的に許容される賦形剤、担体、緩衝液、安定剤または当業者に周知の他の物質を含んでもよい。このような物質は、無毒であり、かつ前記活性成分の有効性を妨害しないものでなければならない。前記担体または他の物質の正確な性質は、たとえば、経口、静脈内、皮膚もしくは皮下、鼻、筋肉内、腹腔内経路などの投与経路に依存する可能性がある。20

#### 【0092】

ポリペプチド、抗体、ペプチド、核酸分子、小分子または個体に投与される本発明の他の薬剤的に有用な化合物であるかどうかによらず、投与は好ましくは、個体に対して効果を示すのに十分な、「予防上有効な量」もしくは「治療上有効な量」である（場合によつては、予防が想定される治療である可能性があるが）。30

#### 【0093】

以下の実施例は、本発明のある実施形態を説明するために記載する。これらは本発明を限定することを意図しない。

#### 【0094】

以下の材料および方法は、本発明の実施を容易にするために記載する。

#### 【0095】

自閉症コホートは、3人の核家族（罹患児童1人と両親）もしくはマルチプレックス家族のいずれかに属する1200人の自閉症患者から構成され、遺伝子型同定のために罹患者1人だけをランダムに選択した。全患者は12才未満であり、標準的ADI-Rおよび/またはADOS基準を満たしていると診断された。民族的背景は、最大1つのヨーロッパ系サブセットと混合した（n=900）。ヨーロッパ系の被験者のみを分析で使用した。各病院および他の関連施設の倫理研究委員会は研究を承認し、全ての被験者から書面でのインフォームド・コンセントを得た。40

#### 【0096】

研究複製コホートについての詳細な情報は、ARGEウェブサイトで入手可能である。ARGE試料も米国で集め、ほとんどの被験者はヨーロッパ系であり；ヨーロッパ系の被験者のみを複製分析において使用した。

#### 【0097】

対照群は、自己申告で白色人種、平均年齢9.42才；53.05%の男性および46.95%の女性で自閉症もしくはASDでない児童を含んでいた。これら個人は、CHO

50

Pの臨床医および4カ所のプライマリー・ケア診療所ならびにいくつかのグループ診療および健康児童診察も含む外来患者診療所を含むチップス・ヘルス・ケア・ネットワーク (CHOP's Health Care Network) 内の看護職員が集めた。CHOPの倫理研究委員会は、研究を承認し、全ての被験者から書面でのインフォームド・コンセントを得た。

【0098】

本発明者らは、すでに記載されているようにして<sup>11</sup>、 Illumina Infinium (商標) II HumanHap550 BeadChip technology<sup>9, 10</sup> ( Illumina, San Diego)を、CHOPの(センター・フォア・アプライド・ゲノミクス(Center for Applied Genomics)で使用して、高スループットゲノムワイドSNP遺伝子型同定を実施した。

【実施例1】

【0099】

ケースコントロール比較のために、本発明者らは、1200人の自閉症発端者(そのほとんどは、散発性/シンプレックス自閉症家族の出である)および2000人のヨーロッパ系の非血縁対照(自己申告に基づき、約561, 466単一ヌクレオチド多型(SNPs)を有する)を、 Illumina Human Hap550 Genotyping BeadChip プラットフォーム<sup>9</sup>を使用して遺伝子型を同定した。全ての患者は、標準的ADI-Rおよび/またはADOS基準に基づいて臨床的に証明された自閉症であった。561, 466のSNPsのうち、5254は90%のコール頻度(call frequency)を満たさず、16, 391のSNPsは1%MAF未満であり、15, 264のSNPsはハーディー・ワインバーグ平衡(Hardy-Weinberg Equilibrium: HWE)に達せず、廃棄した。この結果、524, 557組のSNPsをGWA分析に使用する。本発明者らは、自閉症児、罹患していない兄弟姉妹、および親から得られた5, 975試料を遺伝子型同定した。これらのうち、316は98.0%のコール率閾値(call rate threshold)より低くなり、除外した。したがって、5, 659試料は遺伝子型同定コール率(call rate)が97.5%より高かった。自閉症患者および対照被験者は、2つの独立した試料セット由来であった。I: CHOP/Seattleから来たシンプレックスおよびマルチプレックス家族の混合であり、1, 057人の自閉症患者、582人の親および2518人の罹患していない対照を含んでいた。II: AGRE由来のマルチプレックス家族であり、1697人の自閉症患者および932の固有家族からの2323人の罹患していない兄弟姉妹もしくは親を含んでいた。ケースコントロール分析において、単一マーカー対立遺伝子頻度を、全てのマーカーについて<sup>2</sup>統計を用いて比較した。表1に示すように、本発明者らは、Bonferroni相関後に0.05レベルのゲノムワイド有意性を満たす1つのSNP(rs2381595)を同定した。さらなる試験によると、前記希少対立遺伝子の前記対立遺伝子頻度は希少で、患者集団では2%であり、対照では0.6%であり、SNPはケースコントロール分析においてのみシグナルを示し(PDT分析において陰性)、これはシグナルを示すこの領域での唯一のSNPであり、このことは、誤りである可能性を示唆する。表1は、示唆的P値を有するSNPsを記載する(名目P<1×10<sup>-5</sup>)。

【0100】

本発明者らは、自閉症表現型に対するCNV関連性についてのゲノムワイド調査も実施した。データの品質は、98%を超えるコール率、家系情報マーカー(AIMs)クラスタ化に基づいて綿密に分類された患者および対照の母集団、0.35未満の正規化強度の標準偏差、GC含有量に一致する強度の低波形、および個人あたり40CNVsの最大数に基づいて厳密にフィルターにかけた。この結果、2072の自閉症例および2518人の対照が得られた。隠れマルコフモデル(Hidden Markov Model: HMM)法を利用して、最も可能性が高いCNV状態を各試料のSNPの連続配列について報告する。本発明者らは、まず、これに限定されるものではないが、NRXN1、SHA

N K 3、A U T S 2 およびN L G N 3 を含む自閉症もしくはA S D 表現型に関連するとすでに報告されているC N V の複製について調査した。表2に示すように、N R X N 1 は、C N V 関連性 (P = 0 . 0 1 7) によって本発明者らが確認できた唯一すでに報告されている遺伝子であった。残りの遺伝子に対する関連性についての証拠はなかった。S N P に基づく全ゲノムC N V 関連性をあらかじめ形成して、患者集団と対照集団間の複合C N V 重複において最も有意な点を記録した。カイニ乗統計量を、各S N P について欠失および重複のC N V 観察に対して適用した。結果を非重複的方法で提示するために、統計的極小値を、1 M B 内にあるS N P s を含む名目有意性の領域に関連して報告する。本発明者らは、この方法を用いて、自閉症における新規(表3)および過剰(表4)のC N V s の領域を同定した。C N V s の大部分は、Seattl e / C H O P コンソーシアムからの血液由来試料と自閉症遺伝情報源交換局(AGRE)からの細胞系試料との間に複製を有する。最も重要な関連性は、P O T E 8 (前立腺、卵巣、および精巣において発現されるタンパク質)である (p = 1 . 3 6  $\cdot$  1  $\cdot$  1)。

#### 【0101】

自閉症に関連する直接機能確認のために遺伝子含量に集中するために、遺伝子含量に直接影響を及ぼすC N V s のみについて分析を実施した。遺伝子に基づく方法は、異なる位置で同じ遺伝子に影響を及ぼし得るC N V s の不完全な重複を取り込むためにより柔軟性が高い。各C N V コールは、自閉症のトップ候補遺伝子を確立するために遺伝子含量でアノテートした。本発明者らは、この方法を用いて、自閉症における新規(表5)および過剰(表6)のC N V s の領域を同定した。表7は他の名目上有意なC N V s を記載する。この方法から得られる非常に有意な結果のうちの1つ (p = 4 . 5  $\cdot$  1  $\cdot$  5) は、M G A M (マルターゼ・グルコアミラーゼ) 遺伝子の欠失をもたらすC N V 、デンプン消化の最終工程に関与する刷子縁膜酵素を含む。この遺伝子は、腸の微絨毛ライニングにおいて主に発現され、デンプンの消化に関与し；デンプンが消化されない場合、腸は、D - 乳酸およびこれらの産物としてデルモフィンを産生する細菌の温床となる。これらの代謝物は、中枢神経系(C N S)の血液脳関門を通じて脳へと伝播し、奇矯な行動と関連する。41%のA G R E 患者は、胃腸障害および消化不良が報告されており、これは対照が10%であるのに対して、44%の自閉症児が胃腸症状を有することを示す他の報告と一致する。

#### 【0102】

自閉症と関連するか、または自閉症において過剰であるかのいずれかであるC N V s を含む、本発明者らが同定した他の遺伝子の一部の潜在的な生物学的役割に取り組むために、デイビッド・バイオインフォーマティクス・データベース(D A V I D B i o i n f o r m a t i c s D a t a b a s e)を用いて列挙した全遺伝子の機能注解クラスタリング(F u n c t i o n a l A n n o t a t i o n C l u s t e r i n g: F A C)を実施した。本発明者らは、シナプス伝達機能を有するとして分類された遺伝子が、これらの自閉症候補遺伝子のうち最高に濃縮され (p = 7 . 1  $\cdot$  3) 、したがって自閉症に対して著しい生物学的関連性を有することを観察した。これらの遺伝子は、発達中の神経系における軸索結合の形成に関与する、C N T N 4 (コンタクチン4)；中枢神経系シナプスの形成および再形成に関与する、N L G N 1 (ニューロリジン1)；G R I D 1 (グルタミン酸受容体、イオンチャンネル型)、L - グルタメートは、興奮性神経伝達物質としての働きをする；節後交感神経細胞のシナプス小胞において発現され、ドーパミンをノルエピネフリンに変換し、A D H D と関連する、D B H (ドーパミン・ベータ・ヒドロキシラーゼ)；アセチルコリンエステラーゼ(A C H E)を神経筋接合部の基底膜および脳におけるニューロンのシナプスの膜に固定するために必要な、P R I M A 1 (プロリンリッチな膜アンカー)；神経細胞におけるシナプス後骨格の一部であり、D L G 1 ~ 4 およびS H A N K 1 ~ 3 と相互作用する、D L G A P 1 (ディスク・ラージ・ホモログ(d i s c s l a r g e h o m o l o g) 関連タンパク質)を含む。これらの遺伝子は、N L G N 1 を除いては、自閉症に関して新規である。自閉症発現に対するこれらの遺伝子におけるC N V s との直接機能的関連性は、説得力がある。いくつかの他の遺伝子は、本発明者らが観察したC N V s によって影響を受け、一方、その自閉症における役割は、この時

10

20

30

40

50

点では明らかではなくてもよく、関連性シグナルの強度は、これらの遺伝子およびこれらの隣接する領域が自閉症表現型になりやすくすることを示唆する。

【 0 1 0 3 】

あわせると、これらの結果は、自閉症の病因における遺伝的展望は、一般的および希少CNVsの両方を含み、これらは自閉症表現型と関連し、この場合、前記希少CNVsは非常に異質であり、個々の家族および神経シグナリングおよび発生に関与する遺伝子上のクラスタに特有である。

【 0 1 0 4 】

【表 1 - 1】

P COMBINED	AGE POT CHIP		AGE		POT CHIP		AGE		POT		AGE POT CHIP		
	SNP	CHR	SNP	CHR	SNP	CHR	SNP	CHR	SNP	CHR	SNP	CHR	
对照組													
0.026877	9	rs2381595	37007656	0.02769	44.5322	2.72E-12	4.11E-12	5.11	4.33	4.09	0.795459339	6.05E-11	
0.05741	5	rs4120656	104892450	0.03955	6.8618	0.014394545	0.6761	597	477	457	7.93E-06	1.94E-06	
0.06377	1	rs1324463	129591828	0.06377	17.75768	1.68E-06	0.5059	532	442	423	0.076875985	2.17E-05	
0.161	1	rs1324466	162037735	0.161	33.9584	3.61E-07	1.432	554	442	442	0.630224795	3.71E-06	
0.40544	12	rs476776	98674597	0.40544	6.0213	8.37E-04	1.162	604	477	460	2.76E-04	3.76E-06	
0.42776	14	rs480522	1042137624	0.42931	24.1091	1.35E-06	1.407	563	470	448	0.232212007	5.00E-06	
0.01658	20	rs1608151	300820496	0.01658	20.7516	1.48E-06	0	514	444	405	0.248213053	5.73E-06	
0.00404	1	rs5918959	648103327	0.01548	21.3576	3.17E-05	0.3414	565	459	436	0.015351225	8.02E-06	
0.03985	1	rs1203591	159538187	0.03985	16.3262	9.05E-06	1.688	575	458	445	8.33E-06	8.33E-06	
0.1534	7	rs472551	25765066	0.103	20.8867	2.35E-06	0.6334	588	469	456	1.58E-05	1.58E-05	
0.0163	5	rs630315	889650751	0.0163	0.0324	0.459751333	1.011	604	483	462	2.50E-05	1.98E-05	
0.02798	5	rs3167378	416831308	0.02798	15.4596	0.002213382	0.7601	608	482	463	6.58E-04	2.19E-05	
0.01959	5	rs10942597	889643151	0.01959	0.0122	0.457903886	1.037	609	483	463	2.27E-05	2.27E-05	
0.0352	11	rs1109816	115618972	0.0352	11.531	2.89E-05	0.8039	494	424	415	0.0056014717	2.32E-05	
0.03435	12	rs1109816	985657778	0.03435	15.1472	3.77E-04	0.7847	609	483	463	0.004419684	2.38E-05	
0.1191	7	rs10239764	118358401	0.1191	14.5086	3.67E-05	1.371	609	483	463	0.0465087523	2.42E-05	
0.4161	5	rs4691448	88962482	0.4162	0.0484	0.448405325	1.013	607	483	462	3.70E-06	2.45E-05	
0.3848	9	rs10942459	4024585	0.3848	0.04473	3.79842	2.54E-06	0.773	656	478	451	0.712018864	2.59E-05
0.0663	6	rs12137338	164505561	0.0663	0.1128	24.7814	3.14E-05	0.5587	590	477	458	0.056471143	2.61E-05
0.1885	8	rs2074096	13585074	0.1885	16.5317	1.97E-05	0.6397	603	483	461	0.028525336	2.74E-05	
0.10551	14	rs4862396	21599307	0.10485	21.8149	1.56E-05	1.485	608	483	462	0.123497903	2.76E-05	
0.02655	5	rs2365773	88974343	0.02655	0.0572	0.668609325	1.015	607	482	462	3.04E-06	2.86E-05	
0.1877	2	rs12039930	1485988705	0.18695	20.7578	2.55E-05	1.373	604	483	459	0.083362268	3.02E-05	
0.1466	7	rs2338971	147038218	0.1466	12.0134	0.0056826533	1.308	609	483	463	4.27E-04	3.04E-05	
0.3085	1	rs7533958	175649428	0.31058	3.0285	0.025254571	1.118	609	482	463	4.98E-05	3.61E-05	
0.18018	11	rs10753345	78104970	0.18085	0.02446	0.120856888	0.9633	608	482	463	3.90E-05	3.90E-05	
0.10551	2	rs1524370	149032007	0.14024	0.1232	0.14705	1.3756	608	483	462	4.03E-05	2.86E-05	
0.0189	4	rs6816194	12678567	0.01448	0.02189	18.6916	4.98E-05	1.954	606	483	462	0.0617607617	4.19E-05
0.01017	5	rs4663334	19725523	0.01456	5.0116	5.01E-05	1.504	606	483	461	0.06284931	4.19E-05	
0.224	5	rs4257797	165903173	0.0337	0.378	15.111	2.48E-04	1.26	606	481	462	0.0127567679	4.32E-05
0.1903	13	rs17143209	889834629	0.14817	0.4713	0.50808	1.526E-05	7.59E-06	568	458	438	0.0196151507	4.47E-05
0.1875	11	rs494214	78075887	0.16564	3.2795	0.038523914	0.8654	601	477	459	3.89E-05	4.47E-05	
0.03228	6	rs10872715	155605595	0.03228	0.3045	0.074394356	1.139	597	476	458	4.81E-05	4.56E-05	
0.01194	7	rs10275972	118363317	0.01566	0.05497	25.0781	4.76E-05	0.7381	609	477	458	0.062950044	5.13E-05
0.0245	15	rs4776719	77762687	0.0245	0.0511	17.6161	6.54E-05	1.262	590	464	442	0.032895541	5.14E-05
0.04817	5	rs11743205	889834629	0.04817	0.31937	0.50816	0.025654287	1.202	598	483	462	7.02E-04	4.69E-05
0.1848	17	rs9075056	268931688	0.1848	0.04469	0.004952381	1.209	603	479	459	3.64E-05	4.70E-05	
0.031	3	rs688525	898931518	0.03187	0.0529	23.147	9.93E-05	0.7468	606	480	462	0.0356926399	4.83E-05
0.01055	2	rs432408	203121928	0.01055	0.04939	0.001439356	1.339	597	476	458	4.51E-05	4.51E-05	
0.01817	2	rs6749689	203177290	0.01857	0.05497	25.0781	7.65E-05	0.7381	603	473	458	0.0495122135	5.13E-05
0.01854	13	rs9318534	23915863	0.01854	0.0511	17.6161	2.94E-04	0.4664	560	450	442	0.0312895541	5.14E-05
0.0285	17	rs2105852	368154845	0.02339	0.05167	0.50808	0.025654287	1.043	598	483	462	7.02E-04	5.14E-05
0.04111	10	rs4390535	350861025	0.03773	0.13939	0.313909	6.01E-06	0.59588	591	479	459	0.0665615362	5.44E-05
0.031	3	rs688525	898931518	0.03187	0.04469	0.004952381	0.60179307	0.9384	540	441	432	0.0356926399	5.52E-05
0.01055	20	rs7267210	489323004	0.01055	0.05003	0.001787773	1.332	609	483	463	4.73E-04	5.58E-05	
0.02852	10	rs674617	489317837	0.015641	0.05035	0.0301062758	0.6689	523	422	405	0.0041451783	5.79E-05	
0.02043	8	rs10088568	996155453	0.02043	0.05044	0.0301062758	0.50803	605	479	459	0.0346951273	5.83E-05	
0.03772	12	rs7306259	996155453	0.02292	0.04372	0.00398445	0.0023137	0.9384	590	477	459	0.0023317793	6.03E-05

【 0 1 0 5 】

### 【表 1 - 2】

8	8	79309951	9240511	0.2074	0.2659	29.927	0.7227	609	483	483	6.12E-05	0.26597105		
14	14	757149898	37822503	0.1702	0.213	12.8466	7.14E-04	465	446	446	6.24E-05	0.00638226		
		757121187	11949001	0.08827	12.5779	9.95E-05	0.6239	502	431	413	6.35E-05	0.04819354		
8	8	751327923	75719400	0.2227	0.2688	1.3223	0.16556405	1.085	609	483	483	3.11E-05		
15	15	757157802	428074196	0.3093	0.2645	11.5732	1.46E-04	1.245	605	478	462	6.48E-05	0.03366551	
3	3	75812475	171447688	0.007109	0.0242	14.5362	0.2887	525	420	409	6.67E-05	0.00638256		
20	20	751796246	151445372	0.1618	0.1215	16.5516	1.67E-05	1.398	507	483	461	6.30971241	8.18E-05	
12	12	751018349	50744486	0.2821	0.2071	18.1703	3.99E-04	0.7733	608	472	459	7.25E-05	0.158054906	
15	15	753055221	55856208	0.4317	0.4835	27.3985	8.40E-05	0.7342	507	483	462	6.66337398	7.31E-05	
7	7	756969710	1118498680	0.1572	0.1233	11.5961	2.94E-04	1.526	509	494	469	7.60E-05	0.052507482	
1	1	75287835	8485011	0.1535	0.1877	4.4257	6.29E-04	0.2948	606	482	462	4.54E-04	7.67E-05	
17	17	752151377	566682536	0.3039	0.265	8.59562	0.068974722	1.211	609	483	463	8.53E-04	7.71E-05	
5	5	75827009	42711101	0.2424	0.2894	11.9184	0.0629207634	0.7892	609	483	463	7.25E-04	7.75E-05	
X	X	7510866805	103929289	0.1507	0.1243	27.5920	7.69E-04	0.7319	609	482	463	0.075672113	7.75E-05	
5	5	7510666805	103929289	0.1507	0.1732	5.9422	0.18871776	0.8471	509	473	444	0.776468515	7.78E-05	
1	1	75848106	32800173	0.22515	0.2489	0.0413	0.421265157	1.014	509	479	457	1.59E-05	8.29E-05	
3	3	752526588	50148980	0.22515	0.2724	11.0376	7.28E-05	0.7914	609	483	463	8.44E-05	8.44E-05	
X	X	755981019	14872437	0.12328	0.2983	5.12183	0.037957651	0.8275	601	482	458	7.51E-05	8.49E-05	
7	7	754656009	48483354	0.035565	0.05873	11.3638	2.26E-04	0.5927	609	483	463	0.03010972	8.79E-05	
5	5	75723021	30767889	0.08433	0.06341	10.5439	1.67E-04	1.431	505	481	462	0.04313467	9.41E-05	
5	5	75130762	417562150	0.2434	0.288	11.1933	0.11262	0.7553	609	483	463	6.57E-04	9.48E-05	
1	1	751467652	158378247	0.08729	0.1436	18.2157	1.01E-04	0.6423	508	467	451	0.074499319	9.67E-05	
12	12	751723973	57312836	0.082934	0.02991	12.2918	0.01301251	1.142	604	480	469	9.80E-05	0.089245057	
6	6	751752315	75312836	0.082934	0.02991	12.2918	0.01301251	1.142	604	480	462	4.58E-04	9.80E-05	
5	5	758305483	898693943	0.4782	0.4884	0.04111	0.43938217	0.958	605	480	462	1.78E-05	9.87E-05	
19	19	75242016	14152442	0.2482	0.2532	0.1523	0.401275749	0.9734	609	483	463	0.04313467	9.41E-05	
12	12	751810161	58152516	0.246	0.2089	15.4387	0.13E-05	0.7652	609	483	463	0.120394492	1.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	483	462	0.165620456	1.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	0.179573178	1.00E-04	
7	7	752158036	921503750	0.51211	0.07147	12.4826	0.0775	0.43938217	0.958	609	483	463	1.28E-05	1.00E-04
14	14	751723973	57312836	0.082934	0.02991	12.2918	0.01301251	1.142	604	480	462	4.58E-04	9.80E-05	
17	17	751723973	57312836	0.082934	0.02991	12.2918	0.01301251	1.142	604	480	462	4.58E-04	9.80E-05	
15	15	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	16.3864	4.35E-05	1.277	506	478	451	0.212212025	1.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.254424467	1.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	483	462	0.28720517	1.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	0.35255136	1.00E-04	
6	6	754545853	13402515	0.07619	0.1168	17.1167	3.15E-05	0.6236	505	483	462	0.373562157	1.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.431317449	1.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	1.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	1.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2.00E-04	
15	15	7516263122	55175641	0.373	0.4245	22.8135	3.72E-05	0.7158	509	479	455	0.513392695	2.00E-04	
11	11	751223355	127881116	0.1755	0.466	13.8415	5.46E-05	1.247	607	481	462	0.75E-05	2.00E-04	
14	14	751723988	505997181	0.295948	0.093388	17.5278	5.05E-05	1.547	605	481	463	4.79E-05	2.00E-04	
17	17	7516263122	34539761	0.4603	0.4003	14.4499	5.40E-05	1.252	603	482	463	0.456715403	2	

[ 0 1 0 6 ]

【表 1 - 3】

2	rs1430804	15145157	0.2584	0.3123	15.7414	6.17E-05	463	463	0.2145E4275
19	rs48207598	4465135	0.03687	0.0398	16.8503	2.49E-05	0.4855	602	0.00E-04
15	rs1037958	55103834	0.4185	0.4526	25.64	2.47E-05	0.7413	604	2.00E-04
8	rs16856493	1036014719	0.05987	0.04242	18.9654	1.97E-05	1.0365	609	2.00E-04
5	rs17085428	95413771	0.3236	0.2895	23.5286	2.04E-05	1.365	603	4.00E-04
2	rs1437998	138612771	0.05922	0.04953	0.0112	0.82994423	1.015	605	3.57E-05
1	rs11119932	2050599389	0.1997	0.1035	15.0708	6.46E-05	1.405	606	3.00E-04
2	rs46660883	28655957	0.234	0.1844	18.0747	5.78E-05	1.351	608	4.00E-04
5	rs2040704	4133229	0.2236	0.2706	12.0064	4.26E-05	0.7763	593	4.00E-04
2	rs12620553	112665344	0.2755	0.3971	18.7453	4.76E-05	0.748	569	4.00E-04
8	rs11780975	103536562	0.05022	0.08155	15.8264	6.17E-05	0.5955	473	4.00E-04
2	rs795053	112622380	0.4395	0.5056	17.2373	4.48E-05	0.7825	609	4.00E-04
7	rs4628213	54186817	0.5972	0.4813	13.1311	3.83E-05	1.251	601	4.00E-04
1	rs1120754	59856524	0.1266	0.0853	22.774	2.65E-05	1.555	619	4.00E-04
10	rs7081294	15839648	0.2478	0.2006	15.4135	2.64E-05	1.313	607	4.00E-04
7	rs11674615	16521457	0.2201	0.3118	9.1668	3.29E-05	0.3165	604	4.00E-04
4	rs9307938	157216933	0.1663	0.1014	0.5827	0.43390798	1.053	609	4.00E-04
3	rs48524517	135360268	0.3047	0.2545	0.57086531	1.033	605	475	4.00E-04
2	rs17713683	54612720	0.1997	0.1617	11.8181	5.72E-05	1.254	602	4.00E-04
17	rs31474700	45847579	0.2562	0.3441	11.2851	9.86E-05	0.8024	609	4.00E-04
8	rs646544	102555237	0.2371	0.1849	19.8047	7.93E-05	1.37	593	4.00E-04
10	rs70939325	37996650	0.3945	0.4691	25.6237	7.56E-05	0.7374	608	4.00E-04
14	rs4899982	103707980	0.2985	0.3112	53.1112	5.85E-05	0.5125	547	4.00E-04
11	rs1951329	115545374	0.4032	0.4751	23.854	3.91E-05	0.7465	607	4.00E-04
12	rs15620948	27443659	0.1783	0.239	11.1203	3.89E-05	0.7774	609	4.00E-04
11	rs17832388	1155473258	0.4945	0.5056	23.6862	4.95E-05	0.75	609	4.00E-04
10	rs23993763	82023574	0.4876	0.1047	0.567025724	0.9409	609	463	4.00E-04
12	rs365664	27590018	0.3443	0.3836	7.4964	9.38E-05	0.8435	609	4.00E-04
8	rs13251195	103349698	0.0519	0.08142	14.0709	8.15E-05	0.5176	608	4.00E-04
19	rs64614600	6899841	0.3969	0.4968	16.6857	5.29E-05	0.7828	609	4.00E-04
10	rs1194682	53798747	0.4236	0.5036	29.0714	8.38E-05	0.7245	609	4.00E-04
12	rs1222553	859162802	0.0787	0.04934	17.4398	8.51E-05	1.653	549	4.00E-04
7	rs17684059	1653493988	0.2627	0.2053	57.666	7.23E-05	0.8505	609	4.00E-04
9	rs4502059	56877112	0.0722	0.04042	16.9226	6.15E-05	1.676	578	4.00E-04
17	rs4520545	18630743	0.08265	0.1261	11.8183	4.77E-05	0.7076	583	4.00E-04
10	rs556406	11264671	0.07569	0.07011	0.5269	0.834236155	1.0865	609	4.00E-04
10	rs1144518	28654142	0.2107	0.2466	17.4397	7.47E-05	0.7417	602	4.00E-04
3	rs921464	65341845	0.2394	0.05767	18.5977	6.82E-05	0.4776	595	4.00E-04
12	rs776006	27484547	0.1499	0.1848	9.0457	5.32E-05	0.7778	608	4.00E-04
6	rs11755870	113850981	0.04003	0.03987	20.6414	9.77E-05	2.078	609	4.00E-04
17	rs1391249	164902459	0.2809	0.2288	17.3972	8.15E-05	1.317	609	4.00E-04
2	rs1377638	57244123	0.1736	0.1355	12.7258	7.79E-05	0.5269	604	4.00E-04
15	rs1814535	552365350	0.4337	0.5032	22.4526	7.50E-05	0.7561	601	4.00E-04
15	rs2585082	55045250	0.4265	0.4958	22.6485	6.81E-05	0.7553	605	4.00E-04
7	rs2157998	909655015	0.2933	0.3642	0.6368	0.58403373	1.001	443	4.00E-04
21	rs3819263	3782751	0.3435	0.0954	15.7806	8.72E-05	0.7689	599	4.00E-04
21	rs4236893	42094060	0.2642	0.3989	13.9372	8.37E-05	1.378	605	4.00E-04
12	rs1056320	314963311	0.1441	0.1688	13.9372	8.37E-05	1.378	609	4.00E-04

【表1-4】

8.00E-04	8.00E-04
----------	----------

0.975783945	0.93955645
0.972622037	0.972622037
1	1

438	452
-----	-----

553	605
-----	-----

585	475
-----	-----

1.332	0.7792
-------	--------

0.7816	0.7816
--------	--------

13.5563	21.9837
---------	---------

0.3855	0.5023
--------	--------

0.2829	0.4532
--------	--------

57206491	55258057
----------	----------

rs6951952	rs2414491
-----------	-----------

7	15
---	----

1	1
---	---

2	2
---	---

rs24957746	rs16426503
------------	------------

rs11674953	rs112730311
------------	-------------

0.3282	0.3282
--------	--------

0.2829	0.4532
--------	--------

57206491	55258057
----------	----------

rs6951952	rs2414491
-----------	-----------

7	15
---	----

1	1
---	---

2	2
---	---

【0108】

【表2】

すでに自閉症と関連づけられているCNVsを複製する試み (NRXN1のみが複製する)

10

20

30

40

染色体	遺伝子	最初 (B36 Mb)	最終 (B36 Mb)	影響を受けた症例	影響を受けなかった症例	影響を受けたコントロール	影響を受けなかったコントロール	P-値
2	NRXN1	50000992	51109836	8	918	2	1439	0.0173
X	NLGN3	70281436	70307776	1	925	0	1440	1
22	SHANK3	49459936	49518507	1	925	1	1440	1
7	AUTS2	68702255	69895790	1	925	0	1440	0.391

【0109】

## 【表3】

自閉症における新規CNVs: SNPに基づく全ゲノムCNV関連分析

## 欠失

Significance CNVR	P値(両側)	TDT(Pval)	欠失症例	欠失コントロール	関与又は隣接遺伝子
chr2:51120644-51147600	0.000353704	0.205078125	10	0	NRXN1
chr3:1915190-1915922	0.000783957	0.24609375	9	0	CNTN4
chr6:162584576-162587001	0.003845664	0.2734375	7	0	PARK2,parkin
chr2:78268199-78311249	0.003848162	0.1640625	7	0	BC030125
chr16:45834321-45887745	0.018869244	N/A	5	0	ITFG1

## 複製

Significance CNVR	P値(両側)	TDT(Pval)	複製症例	複製コントロール	関与又は隣接遺伝子
chr15:22393833-22532309	3.24E-05	0.087280273	13	0	C15orf2
chr22:19351264-19358946	0.001735832	N/A	8	0	BC035867
chr19:22431189-22431397	0.002465764	N/A	14	0	ZNF492
chr1:145658465-145807358	0.018819491	0.3125	5	0	GJA5
chr8:55021047-55070134	0.451753431	N/A	5	0	RGS20,TCEA1
chr20:55426961-55430874°	0.451893774	N/A	3	0	RBM38
chr7:32667087-32770713°	1	N/A	4	0	AK026768,AK057321,AK12796
chr1:174500555-174543675	1	N/A	6	0	RFWD2,RP11-318C24.3
chr3:122826190-122870474°	1	N/A	3	0	FBXO40,GOLGB1,HCLS1

## 【0 1 1 0】

## 【表4】

自閉症において過剰なCNVs: SNP塩基に基づく全ゲノムCNV関連分析

10

## 欠失

Significance CNVR	P値(両側)	TDT(Pval)	欠失症例	欠失コントロール	関与又は隣接遺伝子
chr8:43765570-43776595	1.36E-11	6.41E-08	89	29	POTE8
chr3:4199731-4236304	0.001346291	0.013885498	15	3	UNQ3037
chr10:87941666-87949029	0.002478015	0.022216797	14	3	GRID1

## 複製

Significance CNVR	P値(両側)	TDT(Pval)	複製症例	複製コントロール	関与又は隣接遺伝子
chr2:13119667-13165898	4.86E-06	0.123485238	31	7	AK123120
chr12:31300846-31302088	0.005659589	0.000210989	32	17	FAM60A
chr6:69291821-69294028	0.006196884	0.002946643	56	38	CR595314
chr3:2548148-2548531	0.007053862	0.017578125	9	1	CNTN4
chr3:174754378-174771975	0.00744663	0.012401551	110	92	NLGN1
chr4:144847402-144854579	0.008863484	0.1171875	10	2	LOC441046
chr2:237486328-237497105	0.02604212	0.0001297	17	8	AK056246
chr6:168091860-168339100	0.03197763	0.008753037	77	65	AX747198,FLJ00181,FRMD1

20

## 【0 1 1 1】

【表5】

自閉症における新規CNVs：遺伝子に基づく全ゲノムCNV関連分析

欠失遺伝子	Chr Position	P値	欠失症例	欠失コントロール	
SPANXA1	chrX:140505500-140506565	0.003156582	7	0	
OSBPL10	chr3:31677320-31998242	0.03730223	4	0	
KRT3	chr12:51469735-51476159	0.084915959	3	0	
CRYL1	chr13:19875805-19998012	0.084915959	3	0	
PLCB1	chr20:8061295-8813547	0.084915959	3	0	
PKIB	chr6:122834760-123089217	0.084915959	3	0	
FAM11A	chrX:148486014-148521375	0.193249464	2	0	10
HSFX1	chrX:148484725-148666329	0.193249464	2	0	
LOC728269	chrX:148471104-148476911	0.193249464	2	0	
TMEM185A	chrX:148486014-148521375	0.193249464	2	0	
複製遺伝子	Chr Position	P値	複製症例	複製コントロール	
SNPRN	chr15:22652791-22774822	0.001385031	8	0	
FLJ36144	chr15:21237111-21243483	0.003156582	7	0	
BCL9	chr1:145479805-145564639	0.016381537	5	0	
ACP6	chr1:145585791-145609238	0.016381537	5	0	
GJA5	chr1:145694955-145712108	0.016381537	5	0	
BSPRY	chr9:115151643-115173325	0.016381537	5	0	
HDHD3	chr9:115175518-115179080	0.016381537	5	0	
PRKAB2	chr1:145093308-145110753	0.03730223	4	0	20
CR610404	chr1:145110973-145113408	0.03730223	4	0	
NR_002305	chr1:145116053-145118152	0.03730223	4	0	
FMO5	chr1:145122507-145163569	0.03730223	4	0	
CHD1L	chr1:145180957-145234067	0.03730223	4	0	
LYG2	chr2:99225142-99238002	0.03730223	4	0	

【0 1 1 2】

【表6】

自閉症において過剰なCNVs：遺伝子に基づく全ゲノムCNV関連分析

欠失遺伝子	Chr Position	P値	欠失症例	欠失コントロール	
MGAM	chr7:141342147-141453016	4.50E-15	431	326	
CTDSPL	chr3:37878672-38000964	3.97E-06	54	23	
TMLHE	chrX:154372966-154495791	0.002134669	14	3	
AX748173	chrX:140418508-140565735	0.006704546	9	1	
BC042039	chrX:140541661-140542527	0.006704546	9	1	
GRID1	chr10:87349291-88116230	0.006913736	14	4	
ABCC6	chr16:16150922-16224838	0.007330262	10	2	
SPANXA2	chrX:140163261-140500526	0.013988147	9	2	
ASTN2	chr9:118227327-119217138	0.048683151	6	1	
ZNF675	chr19:23627547-23661857	0.048801793	7	2	
LCE3E	chr1:150804753-150805872	0.083414958	14	8	
LCE3D	chr1:150818483-150819604	0.083414958	14	8	40
RDH16	chr12:55631485-55638370	0.093198702	5	1	
DLGAP1	chr18:3488836-3870135	0.093198702	5	1	
ZNF681	chr19:23717999-23733479	0.117101565	7	3	
NRXN1	chr2:50000991-51109836	0.182798646	16	12	
PSG1-11	chr19:47917633-48132066	0.552060877	113	133	
複製遺伝子	Chr Position	P値	複製症例	複製コントロール	
NLGN1	chr3:174598937-175483810	0.012790041	105	94	
HDHD1A	chrX:6976960-7076189	0.326156915	3	1	

【0 1 1 3】

## 【表7】

遺伝子に基づく全ゲノムCNV関連分析から得られる、自閉症患者において検出され、自閉症でない被験者において観察されない希少CNVs

欠失遺伝子	Chr Position	P値	欠失症例	欠失コントロール	
C6orf64	chr6:39179817-39190843	0.016382	5	0	10
PNLIPRP1	chr10:118340479-118358676	0.084916	3	0	
PRIMA1	chr14:93254396-93324519	0.084916	3	0	
PRKCA	chr17:61729387-62237324	0.084916	3	0	
ZNF528	chr19:57592932-57613469	0.084916	3	0	
AK058073	chr19:57624251-57647380	0.084916	3	0	
AB086839	chr19:57626472-57634508	0.084916	3	0	
ZNF534	chr19:57626472-57634508	0.084916	3	0	
AB091373	chr19:57648570-57653219	0.084916	3	0	
AB091374	chr19:57648570-57653219	0.084916	3	0	
AB091376	chr19:57648677-57653219	0.084916	3	0	20
DBH	chr9:135491305-135514287	0.193249	2	0	
NF2	chr22:28329564-28424585	0.193249	2	0	
複製遺伝子	Chr Position	P値	複製症例	複製コントロール	
SH3PXD2A	chr10:105343773-105605154	0.037302	4	0	
LGR5	chr12:70120079-70266353	0.084916	3	0	
KIAA1864	chr16:69511994-69565424	0.084916	3	0	
FLJ22167	chr16:74129515-74147671	0.084916	3	0	
COTL1	chr16:83156704-83209170	0.084916	3	0	
AK127352	chr16:83156708-83168203	0.084916	3	0	
MYO1D	chr17:27843740-28228015	0.084916	3	0	
HEATR5B	chr2:37061656-37164989	0.084916	3	0	
AK091889	chr4:13265900-13541950	0.084916	3	0	
COX18	chr4:74139279-74154336	0.084916	3	0	
COX18HS	chr4:74139279-74154336	0.084916	3	0	
ANKRD17	chr4:74159365-74343366	0.084916	3	0	
xl1	chr5:118434798-118497772	0.084916	3	0	
DMXL1	chr5:118435083-118612721	0.084916	3	0	
TNFAIP8	chr5:118632316-118758193	0.084916	3	0	30
RSPO3	chr6:127481740-127560603	0.084916	3	0	
AJ606314	chr6:135860636-136078886	0.084916	3	0	
AJ606325	chr6:135860636-136078886	0.084916	3	0	
KIAA1023	chr7:2616423-2620886	0.084916	3	0	
KIAA0716	chr7:111290174-111633698	0.193249	2	0	

## 【0114】

## 実施例II

CDH10とCDH9間の遺伝子間領域における共通の遺伝子多様性は、自閉症スペクトラム障害に対する感受性と関連する。

## 【0115】

疫学研究によって、児童においてよく見られる精神神経疾患であり、成人期にまで及ぶ可変的表現型発現を提示する自閉症の病因において、遺伝因子が関与するとされる。自閉症スペクトラム障害(ASD)の小サブセットを構成し得るデノボコピー数多型(CNVs)をはじめとするいくつかの遺伝的決定基がすでに報告されている。関与するゲノム領域は、NRXN1、NLGN3、SHANK3およびAUTS2をはじめとするいくつかの遺伝子において報告されている変化を有し、非常に異質であるように見える。実施例Iを参照。

## 【0116】

以下の材料および方法は、実施例IIの実施を容易にするために記載する。

## 【0117】

40

50

## 自閉症遺伝情報源交換局 ( A G R E )

自閉症遺伝情報源交換局 ( A G R E ; ワールド・ワイド・ウェブ上 [a g r e . o r g](http://agre.org) ) は、自閉症スペクトラム障害 ( A S D s ) を有する家族からの D N A 試料および臨床情報を所有している ( 1 )。本発明者らは、 A G R E コレクション ( 2 0 0 7 年 8 月現在 ) からの 9 4 3 家族 ( 4 , 4 4 4 人 ) から得られた D N A 試料の遺伝子型を同定した。これらの A G R E 家族は、 9 1 7 マルチプレックス家族、 2 4 シンプレックス家族および A S D と診断されない 2 家族 ( 分析では使用しない ) を含んでいた。

## 【 0 1 1 8 】

A G R E アノテーション・データベースは、自閉症診断面接改訂版 ( A u t i s m D i a g n o s t i c I n t e r v i e w - R e v i s e d : A D I - R ) ( 2 ) に基づいて 3 つの診断区分：自閉症、広域 ( P D D - N O S およびアスペルガー症候群を含む広汎性発達障害の範囲に従った障害のパターン ) または不完全 ( N o t Q u i t e ) 自閉症 ( 社会的、コミュニケーション、および / または行動領域のいずれかもしくは全てに関する自閉症基準を 1 点だけ満たさず、「発症年齢」の基準を満たす個体 ; または、全ての領域に関して基準を満たすが、「発症年齢」の基準を満たさない個体 ) に分類される。本発明者らの分析において、「自閉症」を有する A G R E 患者 ( n = 1 , 6 8 4 ) 、「広域」 ( n = 1 7 1 ) または「不完全自閉症」 ( n = 7 9 ) 表現型アノテーションを、単一の A S D 群として処理した。これらのうち、 1 1 人の被験者は、自閉症診断観察スケジュール ( A u t i s m D i a g n o s t i c O b s e r v a t i o n S c h e d u l e : A D O S ) ( 3 ) により、 A D I - R ( 自閉症診断面接改訂版 ) を用いないで自閉症と診断された。

## 【 0 1 1 9 】

異なる診断区分の A S D 被験者についての発症年齢および評価年齢を下記表に記載した。 R a v e n s 推定非言語 I Q スコアは、 A G R E 個体のサブセットについて入手可能であり：中央値は、マルチプレックス家族 ( 7 0 8 人の A S D 被験者 ) においては 1 0 0 、シンプレックス家族 ( 4 9 人の A S D 被験者 ) においては 9 8 である。マルチプレックス家族中 3 8 7 人の A S D 被験者およびシンプレックス家族中 2 8 人の A D S 被験者は、低機能もしくは行動のいずれかのために R a v e n s に関して試験できない ( A G R E アノテーション・データベースにおいて「 R a v e n s 試験不可」としてアノテートする ) 。

## 【 0 1 2 0 】

10

20

30

【表8】

マルチプレックス	個体数	メジアン	平均	SD	範囲	10
自閉症	1358	発症年齢	1.25	1.25	0.68 <1~5才	
		評価年齢	7.12	8.11	4.68 2~46才	
	68	発症年齢	1.5	1.82	1.15 <1~6才	
		評価年齢	5.44	6.84	4.35 2~24才	
NQA	136	発症年齢	1.5	1.73	1.02 <1~5才	
		評価年齢	6.19	8.18	6.25 2~44才	
	136	発症年齢	1.5	1.73	1.02 <1~5才	
		評価年齢	6.19	8.18	6.25 2~44才	
広域	708	メジアン	平均	SD	範囲	20
		100	100	18	38~143	
	3	メジアン	平均	SD	範囲	
		9.98	9.57	4.52	3~30才	
Ravens推定非言語IQ	105	発症年齢	1.5	1.36	0.72 <1~3.5才	
		評価年齢	7.49	9.94	5.78 5~16才	
	13	発症年齢	2	1.6	0.57 1~2才	
		評価年齢	6.88	10.4	9.38 3~31才	
シンプレックス	13	メジアン	平均	SD	範囲	20
		1.5	1.92	1.25 <1~5才		
	49	評価年齢	6.88	10.4	9.38 3~31才	
		98	96	22	38~134	

## 【0121】

これらのA G R E個体についての自己申告の人種／民族情報を以下に記載する。しかし、本発明者らの関連分析において、本発明者らは、遺伝子型データに関して多次元スケーリングを使用し、ヨーロッパ系の全被験者を同定するために厳密な基準を適用し、本発明者らは、関連性試験から他の家系の被験者を除外した（下記の詳細なQ C手順を参照）。

## 【0122】

【表9】

AGRE自己申告家系	被験者数
アメリカ先住民／アラスカ先住民	10
アジア人	103
黒人、すなわちアフリカ系アメリカ人	99
2人種以上	262
ハワイまたは他の太平洋諸島先住民	28
不明	448
白人	3, 494

30

## 【0123】

自閉症ケースコントロール（Autism Case - Control : ACC）コホートにおけるA S Dおよび対照被験者

ACCコホート内のA S D被験者は、全米、ならびにC H O Pの複数の共同プロジェクトからの研究者によってもたらされ、この場合、全ての試料は遺伝子型が同定されていた。ケースコントロール分析に用いた全てのA S D被験者は、A D O S（自閉症診断観察スケジュール）、A D I（自閉症診断面接）またはA D I - R（自閉症診断面接改訂版）診断ツールを用いて診断した。共同研究者によって提供された「最良の診断」を用いて、遺伝子型同定のためにA S D被験者を選択し、これはA D IとA D O Sとの両方に基づく複

50

合基準である。遺伝子型同定されなかった被験者、データベースにおいて遺伝子型データがない被験者（チップ不良のため）、表現型アノテーションのない被験者、および診断データを紛失した被験者（「最良の診断」を「MISSING」として設定する）を除外した後、本発明者らには、陽性ADI/ADI-R、ADOSのいずれかまたは両者の研究基準を満たす1,453試料が残った。

【0124】

研究被験者の平均年齢は、10.3±6.6才であり、ADI診断の平均年齢は、8.4±4.7才であり、ADOS診断の平均年齢は9.9±7.2才であり、IQテストの平均年齢は10.9±6.7才である。1,241人のヨーロッパ系被験者のみを研究で使用した（下記QCの項を参照）。被験者の大部分（83.1%）は男性であった。ほとんど全て（94.5%）のDNA試料は全血から抽出し、他は細胞系由来であった。

10

【0125】

IQ分布は、公知である場合、以下に記載する。

【0126】

【表10】

Level	Number	NVIQ					VIQ				
		Median	Mean	SD	Number	Median	Mean	SD	Number	Median	Mean
Autism/AUT	572	89	85	27.7	562	72	75	29.8			
ASD/PDD-NOS/Asperger	29	100	98	18.8	36	106	105	24.8			

20

【0127】

ディスカバリー期で用いる対照群は、7,077人の自己申告で白色人種家系の児童を含んでいた（平均年齢は8.8±5.4SD才；52.08%の男性、47.65%の女性、そして0.27%不明であった）。全対照被験者はASDsの病歴がなく、診断検査に付されるべき症状を示さなかった。CHOP対照は、4カ所のプライマリー・ケア診療所ならびにいくつかのグループ診療および健康児童診察も含む外来患者診療所を含むCHOPヘルス・ケア・ネットワーク内のCHOP臨床医の指揮下で、CHOP看護および医療助手職員によって集められた。全DNA試料を全血から抽出した。これらの対照被験者は全て自己申告で白色人種であったが、本発明者らは、これらの被験者を患者と併せて組み合わせ、多次元スケーリングを使用して、本発明者らの品質管理的手順の間、ヨーロッパ系の被験者の同種集団と見なした（下記QCの項を参照）。

30

【0128】

ディスカバリーコホート用遺伝子型同定プラットフォーム

AGREコホートおよびACCコホートにおける個体を、 Illumina Human Hap550 SNP遺伝子型同定アレイを利用して、遺伝子型を同定し、このアレイは、ヒトゲノム全体にわたるハプロタイプ多様性をとらえるために、HapMap Phase IおよびPhase IIデータに基づいて選択される、550,000片より多いSNPsを含む。本発明者らの研究において使用したいくつかのコホートのうち、AGREからの試料を、エプスタイン・バー・ウイルス（EBV）で形質転換されたリンパ芽球様細胞系から抽出したDNAを用いて遺伝子型を同定し、一方、他のコホート中のほぼ全ての被験者（ASD患者と対照被験者との両方）は、全血から抽出したDNAを用いて遺伝子型を同定した。

40

【0129】

AGRE家族およびACC被験者の遺伝子型同定実験をCenter for Applied Genomics, Children's Hospital of Philadelphiaで実施した。ほとんどのAGRE試料（n=4,163）は、I11

50

u m i n a H u m a n H a p 5 5 0 バージョン 3 アレイで遺伝子型を同定したが、小サブセットの A G R E 試料 (n = 2 9 1) は、バージョン 1 アレイによって遺伝子型を同定した。バージョン 1 アレイとバージョン 3 アレイとの間の唯一の違いは、アレイの新バージョン中の約 1 0 K の S N P マーカーが I l l u m i n a で置換されていることである。

【 0 1 3 0 】

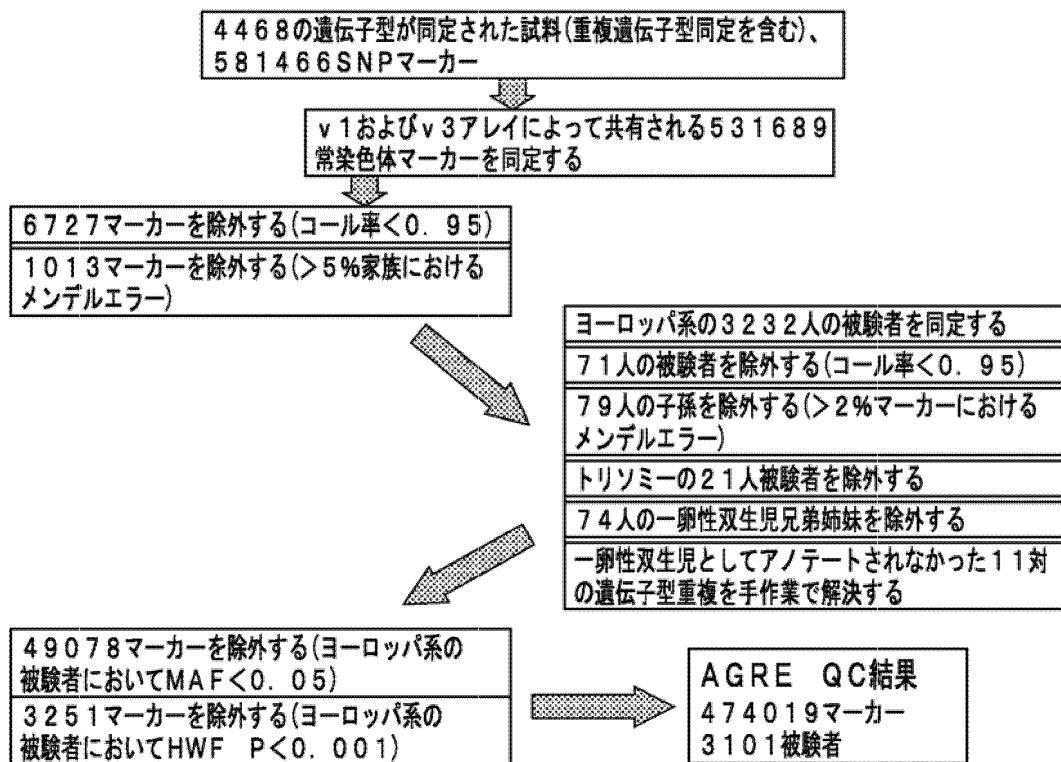
A G R E データセットについての品質管理 (Q C) 概要

A G R E データセット (常染色体マーカー) の品質管理 (Q C) 手順の概要を以下の図で示す。さらに詳細な Q C 手順を以下で記載する。

【 0 1 3 1 】

【表 1 1 】

10



20

30

【 0 1 3 2 】

P D T ソフトウェアを性染色体に関して使用できないので、本発明者らは、別の分析で染色体 X マーカーに関して X - A P L を適用し、Q C 手順を項で記載する。エラー！参照元が見つかりません。

【 0 1 3 3 】

A G R E コホートにおける関連分析での被験者選択についての品質管理

その後の関連分析のために、厳しい品質管理 (Q C) 基準を遺伝子型が同定された A G R E 被験者に対して適用した。Q C の様々な態様を以下で詳細に記載する。

40

【 0 1 3 4 】

低遺伝子型コール率

コール率は、I l l u m i n a B e a d S t u d i o ソフトウェアに実装されたデフォルト遺伝子型同定呼び出しアルゴリズムを用いて、「ノーコール (N o C a l l )」遺伝子型数に基づいて計算する。個体あたりのコール率を、P L I N K ソフトウェアによって評価した (4)。合計 2 4 試料は、遺伝子型同定の最初のバッチでは低コール率のために 2 回遺伝子型を同定した。あわせると、A G R E データセット中 4 7 の独自の個体は、低コール率のために分析から除外した。

【 0 1 3 5 】

メンデルエラー

50

ファミリーデータの利用可能性のために、本発明者らは、家系情報が公知の A G R E 試料間の家族関係をチェックできた。過剰のメンデルエラーを有する試料は、潜在的な父系問題、試料の誤標識、または遺伝子型同定実験中の試料取り扱いの問題を示す可能性があり、下流の関連分析から除外しなければならない。

【 0 1 3 6 】

この分析は、子孫に関して実施した。すなわち、メンデルエラーが存在する場合はいつでも、子孫はメンデルエラーのカウントを獲得し、一方、親はそのようなカウントを獲得しない。大核家族中の1人の子孫が（たとえば、この個体についての試料誤標識が原因の）メンデル問題を有する場合、この手順は、この子孫だけを確実に排除し、一方、他の子孫および親は依然として分析に含まれる。個体あたりのメンデルエラー率を P L I N K ソフトウェア（4）によって評価した。合計 79 試料（子孫として）は、親遺伝子型データに関してメンデル不一致を有する > 2 % のマーカーを有していた人と同定され、本発明者らの関連性試験から除外した。

10

【 0 1 3 7 】

一卵性双生児

A G R E コレクション中、70 家族が一卵性（M Z）双生児を含む（三つ子および四つ子兄弟姉妹がいる家族を含む）。本発明者らは、分析から 74 人を除去して、各家族中、1 組だけの M Z 双生児兄弟姉妹を分析に含める。

【 0 1 3 8 】

遺伝子型が一卵性双生児とアノテートされなかった人を複製する。

20

【 0 1 3 9 】

本発明者らは次に、遺伝子型重複（すなわち、ほぼ同じ遺伝子型を有する 2 人の被験者で、A G R E アノテーションで一卵性双生児としてアノテートされなかった人であり、その一部は 2 つの異なる家族中に存在する場合もある）をチェックした。予想されるように、2 つの異なる家族で 2 つの重複が存在する場合、彼らはメンデル不一致によって容易に検出することができ、通常、本発明者らはどの試料が間違った家族に誤表示されたかを推測できる。M Z 双生児と注記されなかった、重複個体の完全なリストを以下に記載し、これらの問題は手作業で調査し、解決した。

【 0 1 4 0 】

【表 1 2 】

30

個体 1	個体 2	注
AU026402	AU013801	AU013801は独身者であり、分析では使用しない
AU001201	AU000803	AU000803についてはメンデルエラー、分析から除外
AU043603	AU033402	AU043603についてはメンデルエラー、分析から除外
AU1242302	AU1214302	AU1214302についてはメンデルエラー、分析から除外
AU1364302	AU1378304	AU1364302についてはメンデルエラーであり、分析から除外；AU137804は分析から除外
AU1644304	AU1655201	AU1655201は親であり、この家族はQCに合格した子どもがいない
AU1070301	AU1008201	AU1008201は親であり、この家族はQCに合格した子どもがいない
AU1953302	AU1953303	両個体は分析から除外
AU1791301	AU1791302	家族AU1791は分析から除外
AU1833302	AU1833303	このM Z 双生児の組はA G R E 表現型データベースでアノテートされていない；AU1833303は手作業で分析から除外する
AU037803	AU035502	AU037803についてはメンデルエラー、分析から除外；AU035502は独身者であり分析出は使用しない

40

【 0 1 4 1 】

染色体 21 トリソミー

P e n n C N V アルゴリズム（5）を用いて、本発明者らは、AU075307、AU1227303 および AU015804 を含む染色体 21 トリソミーを有する 3 人の被験

50

者を同定した。個体 A U 0 1 5 8 0 4 を A G R E 表現型データベースにおいて「非突発性自閉症」としてアノテートし、本発明者らの関連分析から除外した。

#### 【 0 1 4 2 】

##### ヨーロッパ系の個体の推定

家族基準の研究設計は集団の階層化から保護するが、対立遺伝子の不均一性につながる可能性があり、真に関連するシグナルを隠す可能性がある。本発明者らは、本発明者らの全てのディスカバリーコホートおよび重複コホートにおける関連性シグナルについてヨーロッパ系の個体のみを調べることにした。

#### 【 0 1 4 3 】

本発明者らは、 P L I N K ソフトウェア ( P u r e l l a 、上記) に実装されているマルチ・ディメンジョンナル・スケーリング ( M u l t i - D i m e n s i o n a l S c a l i n g : M D S ) を、 A G R E データセットにおける集団構造を推定するために使用した。自己申告の家系を M D S で推測される家系と比較することによって、ヨーロッパ系の遺伝的に推測される個体を同定することの M D S の信頼性を確認した。主成分 1 が - 1 0 より大きいこと、および主成分 2 が - 2 ~ 2 の間であることによって定義されるように、これらの個体は、三角形の右側に集められる ( データは不掲載 ) 。前述の手順を用いて、合計 3 2 3 2 人がヨーロッパ系であると推定される。

#### 【 0 1 4 4 】

##### Q C に合格した被験者の最終人数

先の項のすべてで記載された Q C 基準を適用して、本発明者らは関連分析のために 3 1 0 1 人を残した。

#### 【 0 1 4 5 】

##### 関連分析における S N P s 選択のための品質管理

###### Human Hap550 v 1 および v 3 アレイの重複

A G R E コホートにおける小部分は、 Human Hap550 v 1 アレイによって遺伝子型が同定され ( n = 2 9 1 ) 、他の者は v 3 アレイによって遺伝子型が同定されるので、本発明者らの分析は、 v 1 および v 3 アレイによって共有されるマーカーのみを配慮する : Human Hap550 v 1 アレイは 5 5 5 3 5 2 マーカーを含み、一方、 v 3 アレイは、 2 つのアレイによって共有される 5 4 5 0 8 0 マーカーを含む 5 6 1 4 6 6 マーカーを含む。

#### 【 0 1 4 6 】

##### ミトコンドリアおよび性染色体マーカー

本発明者らは、 X 、 Y 、 X Y およびミトコンドリア染色体からマーカーを除外して、本発明者らの関連分析を常染色体マーカーに限定した。これによって、上記工程から 5 3 1 6 8 9 マーカーが残った。

#### 【 0 1 4 7 】

##### マーカーごとのノーコール率

9 5 % 未満のコール率を有するマーカーを分析から除外した。コール率は、 P L I N K ソフトウェアによって計算した。合計 6 7 2 7 のマーカーをこの工程において関連分析から除外した。

#### 【 0 1 4 8 】

##### メンデルエラー

過剰のメンデルエラーを有するマーカー (> 5 % 家族において) を分析から除外した。その理由は、これらが遺伝子型同定障害、 S N P クラスタ化障害もしくは共通のコピー数多型領域内に S N P s の存在を示す可能性があるからである。 P L I N K ソフトウェアによって計算された個体ごとのメンデルエラー率に基づいて、合計 4 9 2 のマーカーはこの閾値を満たさず、除外しなければならない。

#### 【 0 1 4 9 】

マイナー対立遺伝子頻度 ( M i n o r A l l e l e F r e q u e n c y ) ( ヨーロッパ系の個体 )

10

20

30

40

50

5 %未満のマイナー対立遺伝子頻度（MAF）を有するマークーを本発明者らの分析から除外した。この手順は、QCに合格し、本発明者らの関連分析で用いられるAGRE個体に限定され、MAFは、AGREコレクションの創始者（親）に関してPLINKソフトウェアによって計算する。合計49078マークーをこの工程で関連分析から除外した。

#### 【0150】

ハーディー・ワインバーグ平衡（ヨーロッパ系の個体）

0.001未満のハーディー・ワインバーグ平衡P値を有するマークーを分析から除外した。その理由は、これらのマークーが遺伝子型同定障害を有する可能性があるか、または共通のCNV領域中に位置するからである。この手順は、QCに合格し、本発明者らの関連分析で用いられるAGRE個体に限定され、MAFは、AGREコレクションの創始者（親）に関してPLINKソフトウェアによって計算する。合計3251マークーをこの工程で関連分析から除外した。

#### 【0151】

QCに合格したSNPsの最終数

SNPs選択のための上記QC手順の後、合計474019SNPsを続く関連分析で使用した。ゲノムワイドで有意なP閾値（ボンフェローニ補正に基づく）は $1.1 \times 10^{-7}$ と計算された。

#### 【0152】

ACCコホートの品質管理

ACCコホートについての品質管理手順は、AGREコホートに関して実施されたものとだいたい類似している。ここでは、ACCコホートに適用されたQCのいくつかの異なる態様を記載する。

#### 【0153】

集団階層化

本発明者らは、全被験者（患者と対照との両方を含む）間のゲノムワイドなIBS推定値を得るためにPLINKソフトウェアを適用し、次に集団異常値の目視検査のために多次元スケーリング（MDS）プロットを作製した。集団遺伝分析のシグナル「増強」を促進するために、本発明者らは、112HapMap個体（以下でCEU、CHB、JPT、YRIと表示）をMDS分析に含めた。ヨーロッパ系の個体を、-0.01を超える主成分1および0.03未満の主成分2によって選択する（データは不掲載）。

#### 【0154】

ACCコホートについてのデータの質を一連のルーチン分析によってスクリーンした。各SNPsが0.001未満のP値、各SNP遺伝子型収率95%未満、またはマイナー対立遺伝子頻度5%未満でハーディー・ワインバーグ平衡から偏っているならば、さらなる分析から除外した。加えて、被験者は、彼らの遺伝子型収率が95%未満である場合も除外した（26人の被験者を除外）。これらの手順は、AGREデータセットにおいて適用したものと同じであった。

#### 【0155】

集団階層化に関する問題にさらに取り組むために、本発明者らはEigenStratソフトウェア（A.L.Price et al., Nat Genet 38, 904 (2006)）も適用して、前記QC閾値に合格した患者および対照被験者に関する全関連性試験を再実施した。表9に記載したSNPsのP値は、全て10倍以内の差であり、集団異常値の除去におけるMDS法の有効性にさらに関連する。したがって、本発明者らは、先に公開されたGWAS研究にしたがい、未補正のP値を記載する。

#### 【0156】

曖昧な関連性および重複遺伝子型同定の検出および削除

本発明者らは、全患者および対照被験者間の全てのペアごとの比較についてゲノムワイドIBS推定値を計算した。本発明者らのデータセット中で曖昧な関連性および潜在的な重複遺伝子型同定を検出するために、本発明者らは、2工程手順を適用して、全個体間の

10

20

30

40

50

ペアごとの IBD 推定値を計算した。まず、MDS を調査し、95%を超えるコール率のヨーロッパ系と推定される個体を本発明者らのデータセット中にただ保管し；第2に、本発明者らは、ゲノムワイド IBS 推定値を再計算し、PLINK ソフトウェアを用いて IBD 推定値を再計算した。この2工程手順によって、集団間の対立遺伝子頻度の差が IBD 推定における偏りに至らないことを確実にする。本発明者らは、曖昧な関連性を検出するため厳しい閾値を適用し、すなわち、 $IBD > 0.15$  の被験者の任意の対を処理して、1人だけの被験者が最終関連性試験に残るようにした。

#### 【0157】

##### QC に合格した被験者の最終人数

これらの QC 手順の結果、1,204 の患者、6,491 の対照、および 480,530 SNPs をその後の関連分析で使用した。 10

#### 【0158】

##### 関連性試験

###### 家系不均衡試験 (PDT)

AGRE コホートについての関連分析を、家系不均衡試験に関連する PDT ソフトウェアバージョン 6 によって実施する (E. R. Martin, S. A. Monks, L. L. Warren, N. L. Kaplan, Am J Hum Genet 67, 146 (2000); E. R. Martin, M. P. Bass, N. L. Kaplan, Am J Hum Genet 68, 1065 (2001))。カスタムスクリプトを使用して、標準的な遺伝子型データを PDT ソフトウェアによって読み取ることができるフォーマットに変換し、メンデルエラーを消去し (PDT はメンデルエラーを正しく取り扱うために使用可能でなかったため)、そして親の遺伝子型データをその遺伝子型情報が入手可能でない親の欠測データとして水増しした。すべてのデフォルトパラメータを関連分析で使用した。PDT は：(1) 親遺伝子型と 1 もしくはそれ以上の罹患子孫との両方、または(2) 不一致 (一方が罹患し、一方は罹患していない) 同胞対のいずれかを必要とする。他の家族は当該分析で使用しなかった。試験統計量は、Zスコアとして与えられ、P 値は Zスコアに基づいて計算する。 20

#### 【0159】

##### 家族に基づく関連性試験 (FBAT)

PDT ソフトウェアによって計算された関連性結果を照合するために、本発明者らは FBAT (ファミリーに基づく関連性試験) ソフトウェアに関与する異なるアルゴリズムも適用した (S. Horvath, X. Xu, N. M. Laird, Eur J Hum Genet 9, 301 (2001))。PDT と同様に、FBAT ソフトウェアは、核家族情報と不一致同胞対情報とのどちらも関連性試験において使用できる。本発明者らは、FBAT ソフトウェアにおいて全てのデフォルトパラメータを (FBAT は家族において検出されたメンデルエラーを自動的に消去する)、追加のモデル、2 対立遺伝子試験とともに採用した。 30

#### 【0160】

##### FBAT 仮定関連性

本発明者らは、関連性について試験する場合に、潜在的な連鎖を考慮することによって、異なる FBAT モデルも試験した。これらの結果は、デフォルトパラメータによって得られたものとおおむね一致する。 40

#### 【0161】

##### 結果

本発明者らは、AGRE コホートにおいて ASD に対してゲノムワイドで有意な関連性 ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ) を観察しなかったが、最低の P 値内に重要な関連性が含まれると仮定した。これらの関連性を同定するための能力を強化するために、米国の複数の箇所由来の 1,453 人の ASD を有する被験者および Children's Hospital of Philadelphia 由来の ASD のない 7,070 人の対照被験者であって、同じプラットフォーム上で遺伝子型が同定された者を含む第2コホート (自閉症ケー 50

スコントロールコホート、またはACCコホート)を調べた。このコホート中のASDsを有する被験者を、ADIおよびADOSツールを使用して診断した。遺伝子型に対して完全な品質管理を行った後、関連性分析を、1,241人のASDを有する被験者およびヨーロッパ系と推定される6,491人の対照被験者に関して実施した(補充法)。本発明者らは、ACCコホートにおいてもASDに対するゲノムワイドで有意な関連性( $P < 5 \times 10^{-8}$ )を検出しなかった。したがって、本発明者らは、その後、推奨されるメタアナリシス法<sup>2,1</sup>を用いて、これら2つの独立したデータセットの複合解析を実施した。常染色体およびX染色体を調査すると、5p14.1に位置する1つのSNPがゲノムワイドな有意性に達し(rs4307059,  $P = 3.4 \times 10^{-8}$ )、同じ座位での5つのさらなるSNPsは $1 \times 10^{-4}$ より低いP値を有していた(表8および図1A)。本発明者らは、ACCコホートにおいてY染色体上の10マーカーについてさらに分析し、最も重要なSNPは、USP9Y(ユピキチン特異的プロテアーゼ9、Y-結合)内に位置するrs2032597である( $P = 1.1 \times 10^{-4}$ )。表9を参照。さらに、本発明者らは、2つのディスカバリーコホートにおいて性染色体の擬似常染色体領域中の15マーカーを分析したが、どのマーカーも関連性の証拠を示さなかった。表10を参照。

#### 【0162】

ASDsと関連するが、SNP遺伝子型同定アレイによって取り込まれなかったさらなる変異体を同定するために、本発明者らは、常染色体上の全ゲノム帰属遺伝子型を用いてディスカバリーコホートを分析した(補充法を参照)。最も重要な関連性シグナルは依然として5p14.1領域中にあった(表11および図1B、1C)；しかし、いくつかのさらなるゲノム遺伝子座、たとえば6p11.2(LRRK1内)、13q33.3(MYO16付近)および14q21.1(FBXO33付近)は、示唆的関連性シグナルを有するSNPsを有する(表12)。

#### 【0163】

5p14.1座位で本発明者らのゲノムワイド関連性結果を再現するために、本発明者らはIllumina HumanHap1M BeadChip上約100万のマーカーを用いて遺伝子型が同定された487の自閉症家族からの被験者1,537人を含む、第3の独立して生成され、分析されるコホートにおいてこれらのマーカーについての関連性統計量を調べた(CAPコホート、表8)。前記SNPsの全てについての前記関連性シグナルをこのコホートにおいて複製した( $P$ 値は $0.01 \sim 2.8 \times 10^{-5}$ の範囲)。複製のさらなる証拠を求めて、本発明者らは、108人のASD患者および540人の、HumanCNV370アレイ、つまりコピー数分析のために非多型マーカーを追加されたSNP遺伝子型同定アレイ上で遺伝子型が同定された、遺伝的に一致した対照被験者の第4の独立したコホート(CARTコホート、表8)からの関連性統計量を調べた。rs7704909およびrs10038113はこのアレイプラットフォーム中に存在しなかったので、本発明者らは帰属遺伝子型に関する関連性を分析した。遺伝子型が同定されたSNPと帰属されたSNPとの両方を、CARTコホートにおいて予想される方向で複製した(表8)。4つのデータセット全てに関するメタアナリシスは、6つのSNPs全てがASDsと関連し、合計 $P$ 値は $7.9 \times 10^{-8} \sim 2.1 \times 10^{-10}$ の範囲であることを示す。合わせると、収束する証拠のスコアは、5p14.1上の共通の遺伝子変異体がASDに関する感受性を付与することを確認した。

#### 【0164】

【表 1 3】

Table 8  
5p14.1上のCDH10とCDH9間の最も有意に関連するSNPs (ディスカバリーリスト)

遺伝子型別定 きけSNPs	位置	マイナ- ー/メジャー- 対立遺伝子 <sup>1</sup>	AGRE MAF <sup>2</sup>	AGRE P <sup>3</sup> (PDT)	AGRE Zスコア <sup>4</sup>	ACC 総MAF	ACC P <sup>3</sup> (PDT)	ACC オッズ比 <sup>4</sup>	ディスカバリ- ーコホート		複コホート	
									ディスカバリ- ーコホート	複コホート	CART P <sup>5</sup> (PDT)	CART P <sup>5</sup> (PDT)
rs4307059	26003460	C/T	0.38	1.1x10 <sup>-3</sup>	4.40	0.35	0.39	2.2x10 <sup>-4</sup>	1.19	3.4x10 <sup>-8</sup>	1.2x10 <sup>-2</sup>	1.6x10 <sup>-2</sup>
rs7704909	25934678	C/T	0.39	1.6x10 <sup>-3</sup>	4.31	0.36	0.40	6.2x10 <sup>-4</sup>	1.17	1.4x10 <sup>-7</sup>	9.1x10 <sup>-3</sup>	5.2x10 <sup>-2</sup>
rs12518194	25987318	G/A	0.39	1.3x10 <sup>-5</sup>	4.36	0.36	0.39	1.0x10 <sup>-3</sup>	1.16	2.0x10 <sup>-7</sup>	9.3x10 <sup>-3</sup>	1.8x10 <sup>-2</sup>
rs4327572	26008378	T/C	0.39	2.2x10 <sup>-3</sup>	4.24	0.36	0.39	2.0x10 <sup>-3</sup>	1.15	6.2x10 <sup>-7</sup>	7.3x10 <sup>-3</sup>	1.5x10 <sup>-2</sup>
rs1896731	25934777	C/T	0.34	1.7x10 <sup>-3</sup>	-3.14	0.38	0.34	1.7x10 <sup>-3</sup>	0.87	1.7x10 <sup>-4</sup>	7.7x10 <sup>-3</sup>	9.9x10 <sup>-1</sup>
rs10038113	25938099	C/T	0.40	1.4x10 <sup>-3</sup>	-3.19	0.43	0.39	2.4x10 <sup>-3</sup>	0.87	2.1x10 <sup>-5</sup>	2.8x10 <sup>-3</sup>	4.1x10 <sup>-1</sup>

1: 染色体座標および対立遺伝子表示はNCB136ゲノムアセンブリのフォワードストランドに基づく。

2:マイナ-ー対立遺伝子頻度(MAF)はヨーロッパ系のAGRE親に基づいて計算する。

3:PDTからのZスコアは、関連性の方向を示す。すなわち、正の値は、メジャー対立遺伝子の過剰伝達を示す。

4:オッズ比は、マイナ-ー対立遺伝子に対するメジャー対立遺伝子として計算する。

5:複製コホートは、ディスカバリーコホートと同じ方向で関連性を示した。

【表 1 4】

Table 9.

ACCコホートにおける染色体Y中の10マーカーに対する関連性分析。  
関連分析は、ASDを有する989人の被験者および3391人の対照被験者に関して実施し、被験者は全て男性被験者であった。対立遺伝子頻度およびオッズ比をA1（対立遺伝子1）に関して計算した。

SNP	位置	欠損率	A1	Freq_A1 in cases	Freq_A1 in controls	A2	CHISQ	P	オッズ 比
rs2058276	2728456	0.00411	A	0.4823	0.4889	G	0.1324	0.7159	0.974
rs1865680	6928118	0.003881	G	0.414	0.4237	A	0.2971	0.5857	0.9608
rs2032597	13357186	0.003653	C	0.2053	0.1532	A	15.05	0.000105	1.428
rs2032590	13529007	0.002968	G	0.001011	0.000592	T	0.1957	0.6582	1.709
rs2032624	13535818	0.02557	A	0.3962	0.4167	C	1.284	0.2572	0.9186
rs3848982	20176596	0.00411	A	0.06079	0.08148	G	4.611	0.03176	0.7296
rs2032612	20325879	0.007991	T	0	0	C	NA	NA	NA
rs2032621	20332126	0.003881	C	0	0	T	NA	NA	NA
rs2032617	20355649	0.006164	T	0	0.000892	G	0.8814	0.3478	0
rs2032652	20376701	0.003653	C	0.06275	0.08235	T	4.084	0.04329	0.7461

10

【0166】

20

【表 1 5】

Table 10.

ディスカバリーコホートにおける擬似常染色体領域中の15のマーカーに関する関連性分析。  
これらのマーカーを、常染色体マーカーと同じ手順で分析した。対立遺伝子頻度、OR（オッズ比）およびZスコアをA1（対立遺伝子1）に関して計算した。

SNP	HWE P 値 (ACCコ ントロール)	欠損率 (ACC)	A1	A2	A1_Freq (ACC cases)	A1_Freq (ACC controls)	P (ACC)	OR (ACC)	欠損率 (AGRE)	HWE P- value (親 AGRE)	A1_Freq (親 AGRE)	P (AGRE)	Z (AGRE)	P (統合)
rs4933045	0.5043	0.03042	A	G	0.318	0.3172	0.9381	1.004	0.02773	0.5646	0.3074	0.201089323	1.27845418	0.371141653
rs2738388	0.8302	0.00039	T	G	0.2107	0.2237	0.1589	0.9264	0.000645	0.3598	0.2342	0.853091955	-0.18517482	0.260141926
rs17792825	0.0681	0.00195	A	G	0.1539	0.1681	0.08583	0.9001	0.001935	0.7545	0.1637	0.555132985	-0.59008598	0.106951616
rs17719702	0.435	0.00221	C	T	0.3364	0.3352	0.9074	1.005	0.003225	1	0.3341	0.853846729	0.18421252	0.838470318
rs17148878	0.6602	0.05148	T	C	0.1453	0.1551	0.2244	0.9262	0.01999	0.7444	0.1585	0.4995597	-0.67518264	0.190433959
rs17148876	0.8627	0.0007799	T	C	0.1155	0.1227	0.3216	0.9337	0.00129	0.5791	0.1218	0.431525767	0.78658342	0.848849149
rs5989732	0.03712	0.01287	T	G	0.135	0.1267	0.2739	1.075	0.0129	0.2492	0.1486	1	0	0.435349662
rs5949188	0.3094	0.008189	C	A	0.261	0.2813	0.04228	0.9021	0.01129	0.2286	0.2538	0.068227172	1.82350349	0.80158916
rs17842869	0.5463	0.0006499	T	C	0.1615	0.159	0.755	1.019	0.000967	0.6858	0.1580	0.425153911	0.79751164	0.455788835
rs17842890	0.2685	0.0009099	G	A	0.03078	0.03526	0.2695	0.8689	0.000645	0.2841	0.03504	0.269744635	1.10365081	0.94979848
rs17842893	0.2733	0.00026	A	G	0.03117	0.0354	0.2984	0.8767	0	0.2947	0.03443	0.24668026	1.15845048	0.98492247
rs17653586	0.5903	0.00104	T	G	0.1635	0.1488	0.06548	1.118	0.00129	0.8329	0.1336	0.937863886	0.07795496	0.172410243
rs1764581	0.1797	0.0074097	T	C	0.4381	0.4377	0.9711	1.002	0.009029	0.2102	0.4524	0.478890479	-0.70808822	0.660776577
s6567787	0.6497	0.00221	T	C	0.2182	0.2072	0.2236	1.068	0.002257	0.3285	0.2105	0.98099172	-0.02381628	0.394180792
rs5983854	0.4633	0.00221	C	A	0.4525	0.4338	0.09087	1.079	0.003547	0.3929	0.4168	0.12688452	-1.52650344	0.83847888

30

【0167】

【表 1 6 - 1】

Table 11.

4つのコホートに関するインピューテーション主導のメタアナリシスは、5 p 1  
4. 1 領域上、 $P < 1 \times 10^{-4}$ を有するさらなるSNPsを同定する。A1およびA2は、それぞれ対立遺伝子1および対立遺伝子2を意味し、Zスコアは、A1対立遺伝子についての関連性の方向を反映する。

(a) 帰属されたSNPs

SNP	位置	A1	A2	P (AGRE)	Z (AGRE)	P (ACC)	Z (ACC)	P (CAP)	Z (CAP)	P (cart)	Z (cart)	P (統合)
rs12521681	25818156	A	G	7.69E-03	-2.67	4.07E-02	-2.05	2.85E-02	-2.19	3.06E-01	-1.02	8.54E-05
rs443439	25833145	A	G	3.00E-02	-2.17	2.65E-02	-2.22	7.85E-03	-2.66	2.59E-01	-1.13	7.54E-05
rs437316	25833210	A	G	3.00E-02	-2.17	2.60E-02	-2.23	7.85E-03	-2.66	2.59E-01	-1.13	7.41E-05
rs374014	25834849	G	A	2.65E-02	-2.22	2.56E-02	-2.23	7.85E-03	-2.66	2.59E-01	-1.13	6.46E-05
rs10491401	25836846	T	C	2.65E-02	-2.22	2.56E-02	-2.23	7.85E-03	-2.66	2.47E-01	-1.16	6.33E-05
rs2619940	25837489	C	T	2.80E-02	-2.20	2.77E-02	-2.20	7.85E-03	-2.66	2.80E-01	-1.08	7.64E-05
rs2619941	25837528	A	G	2.65E-02	-2.22	2.56E-02	-2.23	7.85E-03	-2.66	2.47E-01	-1.16	6.33E-05
rs2619942	25837575	A	G	2.65E-02	-2.22	2.56E-02	-2.23	7.85E-03	-2.66	2.47E-01	-1.16	6.33E-05
rs367519	25838585	C	T	2.65E-02	-2.22	2.56E-02	-2.23	7.85E-03	-2.66	2.47E-01	-1.16	6.33E-05
rs11740209	25875893	C	T	2.93E-03	-2.98	4.91E-03	-2.81	5.85E-03	-2.76	1.90E-01	-1.31	1.08E-06
rs409649	25876920	G	A	4.69E-03	-2.83	2.88E-04	-3.63	4.68E-03	-2.83	5.48E-01	-0.60	1.82E-07
rs10058083	25930155	A	G	1.63E-03	3.15	1.69E-03	3.14	7.67E-05	3.95	9.34E-01	-0.08	5.23E-08
rs4701511	25931761	C	A	3.27E-05	-4.15	7.12E-04	-3.39	9.06E-03	-2.61	6.94E-02	-1.82	2.63E-09
rs6894102	25933313	C	T	1.63E-03	3.15	1.69E-03	3.14	7.67E-05	3.95	9.96E-01	0.01	4.81E-08
rs7705715	25935171	T	C	3.27E-05	-4.15	6.18E-04	-3.42	1.01E-02	-2.57	5.26E-02	-1.94	2.20E-09

【0168】

10

20

【表 1 6 - 2】

rs13176113	25936197	A	G	3.27E-05	-4.15	6.18E-04	-3.42	1.52E-02	-2.43	5.26E-02	-1.94	3.16E-09
rs4701259	25936855	A	G	4.08E-05	-4.10	6.86E-04	-3.40	9.06E-03	-2.61	3.23E-02	-2.14	2.16E-09
rs17482975	25937365	T	C	5.43E-05	-4.04	5.58E-04	-3.45	6.56E-03	-2.72	2.26E-02	-2.28	1.45E-09
rs13187934	25938125	T	C	6.50E-05	-3.99	5.73E-04	-3.44	6.56E-03	-2.72	2.26E-02	-2.28	1.74E-09
rs11739167	25945521	T	C	4.92E-03	2.81	3.11E-04	3.61	1.34E-05	4.35	5.18E-01	-0.65	2.02E-08
rs10942147	25946686	A	G	3.30E-05	-4.15	7.41E-04	-3.37	8.07E-03	-2.65	2.23E-02	-2.28	1.54E-09
rs9293194	25946893	A	C	4.92E-03	2.81	3.11E-04	3.61	5.30E-06	4.55	5.18E-01	-0.65	1.26E-08
rs12521388	25947870	A	G	3.30E-05	-4.15	7.41E-04	-3.37	7.47E-03	-2.68	2.23E-02	-2.28	1.44E-09
rs1346536	25951409	G	A	9.36E-03	2.60	1.87E-04	3.73	5.30E-06	4.55	5.18E-01	-0.65	1.61E-08
rs12697669	25954780	A	C	1.85E-03	-3.11	2.02E-02	-2.32	2.01E-02	-2.33	6.60E-03	-2.72	2.53E-06
rs12659830	25956158	T	G	1.80E-01	1.34	6.57E-03	2.72	3.16E-05	4.16	6.40E-01	0.47	1.73E-05
rs6452304	25959985	T	C	6.39E-05	-4.00	7.33E-04	-3.38	8.49E-03	-2.63	2.26E-02	-2.28	2.78E-09
rs6452305	25960379	A	C	6.39E-05	-4.00	7.33E-04	-3.38	8.49E-03	-2.63	2.26E-02	-2.28	2.78E-09
rs7380139	25962123	A	G	4.15E-05	-4.10	1.00E-03	-3.29	8.49E-03	-2.63	2.26E-02	-2.28	2.72E-09
rs6873221	25964323	A	G	4.45E-03	2.84	2.54E-04	3.66	6.74E-06	4.50	5.38E-01	-0.62	1.01E-08
rs10063934	25968364	A	G	1.38E-01	1.48	7.20E-03	2.69	4.78E-05	4.07	8.56E-01	0.18	1.92E-05
rs12519594	25970562	A	G	4.15E-05	-4.10	1.03E-03	-3.28	8.49E-03	-2.63	2.23E-02	-2.29	2.78E-09
rs12187724	25970827	C	A	1.09E-01	1.60	1.20E-02	2.51	4.78E-05	4.07	6.28E-01	0.48	1.85E-05
rs10214380	25982692	T	C	6.58E-03	-2.72	4.64E-02	-1.99	3.73E-02	-2.08	6.50E-04	-3.41	1.84E-05
rs4475231	25991074	T	C	2.76E-05	-4.19	1.03E-03	-3.28	9.33E-03	-2.60	1.66E-02	-2.40	1.92E-09
rs12187661	25995303	T	C	1.90E-01	1.31	9.28E-03	2.60	2.49E-04	3.66	1.84E-02	2.36	1.55E-05
rs6891206	26005136	T	C	5.81E-04	-3.44	2.10E-03	-3.08	1.73E-02	-2.38	2.49E-03	-3.02	5.04E-08
rs13166776	26007113	C	T	4.08E-05	-4.10	9.78E-04	-3.30	1.11E-02	-2.54	1.73E-02	-2.38	2.95E-09
rs6898772	26081809	C	T	6.63E-02	1.84	1.31E-03	3.21	8.55E-03	2.63	7.71E-01	-0.29	3.42E-05
rs12516367	26084181	C	T	6.63E-02	1.84	1.14E-03	3.25	8.55E-03	2.63	7.64E-01	-0.30	3.08E-05
rs7720426	26101159	A	G	6.16E-02	1.87	1.04E-03	3.28	2.26E-03	3.05	7.90E-01	-0.27	1.17E-05
rs12173236	26107233	T	C	6.16E-02	1.87	9.69E-04	3.30	2.71E-03	3.00	7.97E-01	-0.26	1.22E-05
rs1330642	26108995	T	C	6.70E-02	1.83	6.15E-04	3.42	1.44E-02	2.45	6.82E-01	-0.41	2.93E-05

【0 1 6 9】

10

20

30

## 【表 1 7 】

(b) 遺伝子型が同定された S N P s

SNP	位置	A1	A2	P (AGRE)	Z (AGRE)	P (ACC)	Z (ACC)	P (CAP)	Z (CAP)	P (CART)	Z (CART)	P(統合)
rs423116	25837046	T	C	1.69E-02	-2.39	3.22E-02	-2.14	7.85E-03	-2.66	2.4E-01	-1.16	5.30E-05
rs10065041	25876207	T	C	2.72E-03	-3.00	4.91E-03	-2.81	5.85E-03	-2.76	1.9E-01	-1.31	1.01E-06
rs7704909*	25934678	T	C	1.60E-05	4.31	6.23E-04	3.42	9.06E-03	-2.61	5.2E-02	-1.94	1.12E-09
rs1896731	25934777	T	C	1.67E-03	-3.14	1.65E-03	-3.15	7.67E-05	3.95	9.9E-01	0.01	4.80E-08
rs10038113*	25938099	T	C	1.43E-03	-3.19	2.43E-03	-3.03	2.75E-05	4.19	4.0E-01	-0.83	7.90E-08
rs7447989	25950789	A	G	1.44E-01	-1.46	5.21E-03	-2.79	3.29E-05	4.15	6.4E-01	0.46	1.03E-05
rs6894838	25980703	T	C	5.05E-04	-3.48	2.49E-02	-2.24	1.61E-02	-2.41	5.6E-03	-2.77	9.06E-07
rs12518194	25987318	A	G	1.32E-05	4.36	1.01E-03	3.29	9.33E-03	-2.60	1.7E-02	-2.37	1.07E-09
rs4701260	25994662	A	G	1.03E-01	1.63	1.16E-02	2.52	1.67E-04	3.76	1.8E-02	2.36	6.79E-06
rs4307059	26003460	T	C	1.07E-05	4.40	2.22E-04	3.69	1.16E-02	-2.52	1.6E-02	-2.40	2.07E-10
rs4327572	26008578	T	C	2.20E-05	-4.24	2.03E-03	-3.09	7.34E-03	-2.68	1.5E-02	-2.42	2.71E-09
rs12514304	26092874	T	G	7.57E-02	1.78	2.59E-03	3.01	3.35E-03	2.93	7.4E-01	-0.32	4.14E-05
rs10072518	26100560	T	C	1.23E-01	-1.54	9.41E-04	-3.31	4.40E-03	2.85	2.5E-01	1.14	1.29E-05

\* : C A R T コホート中の r s 7 7 0 4 9 0 9 および r s 1 0 0 3 8 1 1 3 に関する分析は、帰属データに基づいた。

10

20

## 【 0 1 7 0 】

遺伝子型が同定されたマーカーに加えて、全ゲノムインピューテーションは、ディスカバリーコホートの複合解析で A S D s との示唆的関連性を有する複数の遺伝子座を同定した。下記表は、P 値  $< 1 \times 10^{-5}$  を有する遺伝子型が同定されたマーカーおよび帰属されたマーカーを記載する ( 5 p 1 4 . 1 領域を除外する )。A 1 および A 2 は、それぞれ対立遺伝子 1 および対立遺伝子 2 を意味し、下記対立遺伝子頻度は、A G R E 親もしくは A C C 対照被験者における対立遺伝子 1 に基づいて計算する。

## 【 0 1 7 1 】

【表18】

Table 12.

SNP	Chr	位置	マーカータイプ <sup>1</sup>	遺伝子座	隣接 gene	SNP-gene distance	A1	A2	A1_Freq (親 AGRE)	P (AGRE)	A1_Freq (ACC ポーラー)	P (ACC)	オッズ比	P (統合)
rs3755827	3	62335411	genotyped	3p14.2	FEZF2	1181T	C	0.87	7.47E-04	0.86	6.73E-04	1.27	3.54E-06	
rs2248535	3	110169600	imputed	3q13.13	MORC1	0G	A	0.39	1.08E-03	0.43	8.75E-04	0.86	6.28E-06	
rs9395885	6	53853436	imputed	6p12.1	LRRC1	0T	C	0.08	2.34E-02	0.10	1.57E-05	0.70	4.97E-06	
rs9349687	6	53868708	imputed	6p12.1	LRRC1	0A	T	0.08	3.33E-02	0.10	2.17E-05	0.70	9.69E-06	
rs9349688	6	53870051	genotyped	6p12.1	LRRC1	0A	G	0.91	3.62E-02	0.90	1.49E-05	1.43	8.08E-06	
rs9384952	6	116066757	genotyped	6q22.1	FRK	302629T	C	0.59	2.00E-02	0.58	4.66E-05	1.20	9.41E-06	10
rs4877463	9	90419466	imputed	9q22.1	LOC286238	32448T	C	0.33	5.30E-04	0.35	2.43E-03	0.86	9.18E-06	
rs7966486	12	89991354	imputed	12q21.33	KERA	15092G	T	0.13	3.21E-02	0.13	1.82E-05	1.31	8.12E-06	
rs10774538	12	118888180	genotyped	12q24.23	CCDC64	23851T	C	0.13	1.20E-02	0.12	5.59E-05	1.29	6.22E-06	
rs9521337	13	108823637	imputed	13q33.3	MYO16	165281T	G	0.13	1.58E-02	0.14	2.97E-05	0.75	5.07E-06	
rs943767	13	108828552	imputed	13q33.3	MYO16	170196G	T	0.13	2.05E-02	0.14	4.09E-05	0.75	8.76E-06	
rs7996916	13	108855628	imputed	13q33.3	MYO16	197272A	C	0.12	2.17E-03	0.15	4.23E-04	0.79	6.03E-06	
rs1328250	13	108856632	imputed	13q33.3	MYO16	198276T	C	0.12	2.17E-03	0.14	4.74E-04	0.79	6.67E-06	
rs9521354	13	108865125	genotyped	13q33.3	MYO16	206769A	C	0.87	7.25E-04	0.86	1.16E-03	1.25	5.79E-06	
rs9521355	13	108865183	genotyped	13q33.3	MYO16	206827T	C	0.13	1.37E-03	0.14	8.00E-04	0.86	7.11E-06	
rs1328244	13	108881899	genotyped	13q33.3	MYO16	223543T	C	0.92	8.71E-05	0.90	9.57E-04	1.31	8.22E-07	
rs12897470	14	39895590	imputed	14q21.1	FBXO33	924135G	A	0.50	7.07E-04	0.49	4.21E-04	1.17	2.17E-06	
rs12100820	14	39899940	imputed	14q21.1	FBXO33	928485T	A	0.50	7.07E-04	0.49	4.45E-04	1.17	2.29E-06	
rs12586354	14	39900960	imputed	14q21.1	FBXO33	929505A	T	0.47	2.06E-03	0.46	5.04E-05	1.20	8.99E-07	
rs7143615	14	39901688	imputed	14q21.1	FBXO33	930233C	G	0.50	7.07E-04	0.49	4.81E-04	1.17	2.45E-06	
rs7147817	14	39901754	genotyped	14q21.1	FBXO33	930299A	G	0.46	7.33E-04	0.46	4.11E-05	1.20	2.75E-07	
rs17783432	14	76141161	genotyped	14q24.3	ESRRB	104200T	G	0.15	4.90E-02	0.15	1.07E-05	0.73	9.35E-06	
rs4480786	16	8412290	imputed	16p13.2	C16orf68	210738G	A	0.42	5.01E-03	0.40	2.99E-04	1.18	9.86E-06	
rs7206043	16	8412954	imputed	16p13.2	C16orf68	210074G	A	0.41	2.47E-03	0.39	4.42E-04	1.19	2.62E-06	
rs7206246	16	8413011	imputed	16p13.2	C16orf68	210017T	A	0.41	3.50E-03	0.39	1.72E-04	1.19	4.32E-06	
rs9932538	16	19116070	genotyped	16p12.3	SYT17	0A	G	0.84	4.87E-02	0.83	4.13E-08	1.47	1.94E-07	
rs6131030	20	44241393	genotyped	20q13.12	CDH22	0A	G	0.42	1.21E-03	0.41	8.15E-04	0.86	6.46E-06	20

【0172】

30

5 p 1 4 . 1 領域のさらに綿密な調査によって、 $1 \times 10^{-7}$  より低い P 値を有する、遺伝子型が同定された S N P s および帰属 S N P s はすべて、約 1 0 0 k b 連鎖不均衡 ( L D ) ブロック内にあることがわかり、このことは、これらの S N P s が同じ変異体を標識することを示唆する。図 2 および 3 を参照。 L D ブロックは、 C D H 1 0 ( カドヘリン 1 0 ) と C D H 9 ( カドヘリン 9 ) との間の 2 . 2 M b 遺伝子間領域内に位置する ( 図 1 B 、 1 C ) 。 C D H 1 0 と C D H 9 とはどちらも、カドヘリンスープラファミリー由来のタイプ I I の古典的なカドヘリンをコードし、これらはカルシウム依存性細胞 - 細胞接着に関与する貫膜タンパク質である。 2 . 2 M b 遺伝子間領域内で、構造変異体を含む他の種類の変異体を探索するために、本発明者らは、シグナル強度データに関して P e n n C N V ソフトウェア<sup>2</sup> を使用し、前記領域内の 5 つの C N V 座位を同定した ( 図 4 ) 。これら C N V s はすべて本発明者らの研究において対照被験者中に存在し、 5 つの C N V s のうちの 3 つは、健常な個体をアノテートするゲノム変異体についてのデータベースにおいても報告され ( 図 5 ) 、このことは、前記領域における希少 C N V s は、 A S D s の原因変異体である可能性が低いことを示唆する。本発明者らは、次に、最も重要な S N P s を有する約 1 0 0 k b の L D ブロックに焦点を置き、他の転写産物または機能的要素が前記ブロック内に位置するかどうかを決定した。 U C S C ゲノム・プラウザ・アノテーションを調べることによって、本発明者らは、 L D ブロックと重複する、予測される遺伝子、予測される転写開始部位、スプライスされたヒト E S T 配列、公知のミクロ R N A 遺伝子もしくは予測されるミクロ R N A 標的を同定しなかった ( 図 6 ) 。しかし、本発明者らは、 L D ブロックが、全ヒトゲノム中、上位 0 . 0 2 6 % の最も保存された要素としてラ 40

50

ンク付けされる 849bp 要素を含む、複数の高度に保存されたゲノム要素を含むことに留意する (LODスコア = 3, 480、PhastCons<sup>2 3</sup>による、図1B)。大きな安定遺伝子デザートが典型的には、発現もしくは転写に関与する遺伝子の調節要素を含むという先の報告と一致して<sup>2 4</sup>、本発明者らは、これらの標識SNPsが、CDH10 もしくはCDH9のいずれかの発現および作用を調節する機能的変異体の関連性をとらえると仮定した。

【0173】

CDH10 および CDH9 は非神経組織において低レベルで発現されるので (図7 および8)、本発明者らは、インサイチュハイブリダイゼーションによってヒト胎児脳におけるこれらのmRNA分布を評価した (補充法)。CDH9 は均一に低レベルの発現を示したが、前頭皮質において濃縮の著しいパターンがCDH10 について観察された (図1D)。これらの結果は、ヒト胎児脳<sup>2 5</sup>において高レベルのCDH10、および発生中のマウス脳<sup>2 6</sup>の前皮質板におけるCDH10 mRNA の顕著な濃縮と一致した。本発明者らは、次に、遺伝子型が同定された被験者からの93のヒト大脳皮質組織における遺伝子発現をプロファイルするSNP Expressデータベース<sup>2 7</sup>を調べたが、表8中のSNPsはどれも、CDH9 (rs4307059についてP = 0.92) またはCDH10 (rs4307059についてP = 0.86) のいずれかについての発現レベルと関連しなかった (図1E)。小さな試料サイズは微細な効果のサイズを検出するために十分な能力を有さない可能性があるが、前記原因変異体は、発生中の脳においてのみ遺伝子発現を調節するか、または前記原因変異体は、8q24上の遺伝子間領域において報告される変異体と同様に、様々な癌に関与する<sup>2 8</sup>、<sup>2 9</sup>未同定の機能的要素を標的とすることも可能である。

【0174】

最近の遺伝学研究は、希少ASD患者で潜在的に破壊される、NRXN1 (ニューレキシン1)<sup>3 0</sup>、<sup>3 1</sup>、CNTNAP2 (コンタクチン関連タンパク質様2)<sup>3 2</sup>~<sup>3 4</sup> およびPCDH10 (プロトカドヘリン10)<sup>3 5</sup>を含むいくつかの神経細胞接着遺伝子を同定した。カドヘリンは、発生中の脳における細胞接着およびシナプス複合性の生成に関与する貫膜タンパク質の大きな群である<sup>3 6</sup>。上記情報を考慮して、本発明者らは、いくつかの他のカドヘリン遺伝子が、合したディスカバリーコホートの上位1,000の最も重要なSNPsによっても標識されたことに留意する (表13)。加えて、CACNA1C、CNTNAP2、GRIK2、NRXN1 およびNLGN4X を含むいくつかの顕著なASD候補遺伝子座<sup>1</sup>の周囲のSNPsも、関連性の示唆的証拠を示す (表14)。細胞接着分子が、遺伝子ファミリーとして、ASDsと関連するかどうかを調べるために、本発明者らは、2経路に基づく関連法を適用した (補充法)。まず、本発明者らは、ディスカバリーコホートにおける各遺伝子について、Simes補正されたP値の分布を調べ、25の関連するカドヘリン遺伝子が、他の全ての遺伝子よりもASDsとより有意な関連性を示し (P = 0.02)、一方、25のカドヘリン遺伝子を8のニューレキシンファミリー遺伝子 (NRXN1~NRXN3、CNTNAP1~CNTNAP5) と組み合わせた場合に、より強力な濃縮シグナル (P = 0.004) が得られたことを見いだした。第2に、本発明者らは、ケースコントロールデータセットについてホルマール経路関連性方法を用いてACCコホートを分析した<sup>3 7</sup>。本発明者らは、カドヘリン遺伝子のセットがASDsと関連し (置換P = 0.02)、一方、複合カドヘリン/ニューレキシン遺伝子はさらに有意な関連性を示す (置換P = 0.002) ことを確認した。したがって、本発明者らの経路分析は、神経細胞接着分子がまとめてASDsの病因に関与する可能性があることを示唆する。

【0175】

表13

ディスカバリーコホートの複合解析で上位1000の最も重要なSNPのうち、カドヘリンおよびプロトカドヘリン内/付近の遺伝子型が同定されたSNPs (CDH9 / CDH10以外) についての関連性結果。A1およびA2は、それぞれ対立遺伝子1および対

10

20

30

40

50

立遺伝子 2 を意味し、下記対立遺伝子頻度は、A G R E 親もしくは A C C 対象被験者における対立遺伝子 1 に基づいて計算する。

【 0 1 7 6 】

【表 1 9】

SNP	Chr	位置	隣接遺伝子	SNP-遺伝子距離	A1	A2	A1_Freq (親 AGRE)	P (AGRE)	A1_Freq (ACC コトローラ)	P (ACC)	オッズ比 (ACC)	P (統合)
rs3775330	4	30337382	PCDH7	0	A	G	0.8639	0.084181	0.8731	0.001745	0.82	0.000765
rs2879041	4	33041141	PCDH7	2283622	T	G	0.91786	0.818546	0.90831	1.18E-05	1.48	0.001058
rs17547161	4	133152254	PCDH70	1137666	A	G	0.90241	0.056483	0.897	0.001865	0.81	0.000521
rs3857321	5	21926009	CDH12	0	A	G	0.8037	0.000854	0.7827	0.07409	1.10	0.000537
rs6452027	5	21937473	CDH12	0	T	C	0.8033	0.00075	0.7798	0.07461	1.10	0.000496
rs13162273	5	21953276	CDH12	0	A	C	0.7956	0.002102	0.7808	5.06E-02	1.11	0.000645
rs2026410	10	56015517	PCDH15	0	T	C	0.1772	0.252904	0.1699	0.000258	1.23	0.000793
rs11647166	16	60923063	CDH8	295526	A	G	0.05486	0.235271	0.06127	0.000449	0.69	0.001033
rs318203	16	62807919	CDH11	730265	A	G	0.8875	0.275189	0.9021	0.000135	0.77	0.000587
rs11862535	16	82218967	CDH13	0	A	G	0.4485	0.013527	0.4397	0.01603	1.11	0.000845
rs11564334	18	23735780	CDH2	49153	A	G	0.6663	0.012173	0.6715	0.01791	0.90	0.000858
rs8098920	18	23755999	CDH2	28934	A	G	0.4773	0.010397	0.4623	0.02113	1.11	0.000883
rs11083238	18	23777488	CDH2	7445	T	C	0.4965	0.015573	0.5134	0.009464	0.89	0.000587
rs11564410	18	23888092	CDH2	0	A	G	0.2794	0.027227	0.2572	0.009571	1.14	9.79E-04
rs9965582	18	23951510	CDH2	0	A	G	0.2533	0.001612	0.2795	0.08672	0.92	0.000999
rs7505845	18	62637464	CDH19	215268	A	G	0.2194	0.063983	0.2254	0.000639	0.83	0.000262
rs6131030	20	44241393	CDH22	0	A	G	0.4199	0.001213	0.4106	0.000815	0.86	6.46E-06
rs1321001	20	44250143	CDH22	0	T	G	0.8437	0.011272	0.8483	0.01366	0.86	0.000623

【 0 1 7 7 】

表 1 4

連鎖研究、細胞発生研究および候補遺伝子関連性研究ですでに関連づけられている顕著な A D S 遺伝子座内もしくはその周囲の遺伝子型が同定された S N P s についてのトップ関連性結果 ( $P < 0.01$ )。8 の「有望な」遺伝子および 18 の「起こり得る」遺伝子を含む、潜在的な A S D 遺伝子座のこのリストは、最近の総説からコンパイルした (16)。

【 0 1 7 8 】

( a ) 常染色体上の A S D 候補遺伝子座内もしくはその周りの重要な S N P s を以下にまとめる：

10

20

30

【表 20-1】

SNP	隣接遺伝子	SNP-遺伝子距離	A1	A2	A1_freq (AGRE)	P (AGRE)	A1_freq (ACC)	P (ACC)	オッズ比 (ACC)	P (統合)
rs10495983	<i>NRXN1</i>	67954	T	C	0.1195	0.00256896	0.1166	0.02217	0.85	0.000307
rs11889255	<i>NRXN1</i>	57977	T	G	0.1214	0.005084097	0.1177	0.01489	0.84	0.000351
rs10495985	<i>NRXN1</i>	54727	T	C	0.8826	0.002420425	0.8865	0.01763	1.19	0.000231
rs11891766	<i>NRXN1</i>	21019	A	G	0.1198	0.00887239	0.1164	0.0137	0.83	0.000511
rs7604754	<i>NRXN1</i>	0	T	C	0.1068	0.071860611	0.1067	0.004754	0.80	0.001402
rs17494917	<i>NRXN1</i>	0	A	G	0.8646	0.048899829	0.8596	0.02106	1.17	0.003311
rs2078232	<i>NRXN1</i>	0	A	C	0.1127	0.15840894	0.1151	3.38E-05	0.72	0.000104
rs970896	<i>NRXN1</i>	0	A	C	0.2396	0.295821428	0.2527	0.004915	0.86	0.007117
rs10490237	<i>NRXN1</i>	0	T	G	0.8647	0.324748158	0.8617	0.000414	1.28	0.001556
rs4467312	<i>NRXN1</i>	0	T	C	0.7206	0.652554154	0.7424	0.000738	0.85	0.006898
rs10183349	<i>NRXN1</i>	0	T	C	0.68	0.350503564	0.655	0.000185	1.20	0.001043
rs858937	<i>NRXN1</i>	0	T	C	0.8834	0.008496761	0.8762	0.1482	1.11	0.005816
rs12616608	<i>NRXN1</i>	562234	A	G	0.832	0.007517517	0.8447	0.2179	0.93	0.008474
rs2953300	<i>NRXN1</i>	592699	T	C	0.186	0.007090926	0.1645	0.007533	1.17	0.00024
rs952893	<i>NRXN1</i>	616553	A	G	0.8207	0.001659334	0.8348	0.4157	0.95	0.008184
rs6758434	<i>NRXN1</i>	641162	A	C	0.7981	0.002289891	0.8089	0.04787	0.90	0.000645
rs7569104	<i>NRXN1</i>	646423	T	C	0.1899	0.002935112	0.1811	0.02541	1.13	0.000392
rs4146703	<i>NRXN1</i>	650079	A	G	0.7934	0.005581081	0.8029	0.07404	0.91	0.001986
rs6714367	<i>NRXN1</i>	654680	T	C	0.8305	0.001250982	0.8446	0.07318	0.90	0.000686
rs1028145	<i>NRXN1</i>	668368	T	G	0.8584	8.24332E-05	0.8632	0.8058	0.98	0.005797
rs4971757	<i>NRXN1</i>	675074	A	G	0.8664	0.000594437	0.8677	0.4011	0.95	0.004341
rs4353689	<i>NRXN1</i>	675652	A	C	0.1269	0.001190066	0.1253	0.2783	1.07	0.003733
rs2354387	<i>NRXN1</i>	681044	T	C	0.8232	0.003188074	0.822	0.1675	0.92	0.003508
rs1516194	<i>NRXN1</i>	684059	T	G	0.1665	0.010675669	0.1681	0.1203	1.09	0.005382
rs11125373	<i>NRXN1</i>	686489	A	G	0.2044	0.00480634	0.2079	0.1145	1.09	0.002923
rs10202118	<i>NRXN1</i>	690650	T	C	0.7537	0.054147244	0.763	0.02912	0.89	0.004811
rs6712068	<i>NRXN1</i>	824642	A	G	0.7824	0.169636846	0.7752	0.006414	1.16	0.004445

【0179】

10

20

30

【表 20 - 2】

rs4971785	<i>NRXN1</i>	1006007	T	C	0.4665	0.015101492	0.4403	0.05213	1.09	0.002889
rs75775	<i>OXTR</i>	9432	T	G	0.1317	0.167462647	0.1247	0.004034	1.20	0.003116
rs4839797	<i>GRIK2</i>	0	T	C	0.09385	0.026019454	0.1	0.04654	0.86	0.003978
rs2782908	<i>GRIK2</i>	0	A	G	0.653	0.217719853	0.6495	0.006077	1.14	0.005692
rs9390897	<i>GRJK2</i>	758634	A	G	0.6799	0.758075774	0.6897	7.32E-05	0.83	0.008647
rs1367645	<i>GRIK2</i>	774787	A	G	0.94168	0.137809694	0.93105	0.01327	1.27	0.006152
rs2205681	<i>GRIK2</i>	1041317	A	G	0.91407	0.005932629	0.91248	0.1318	1.13	0.003976
rs522447	<i>GRJK2</i>	1094701	A	G	0.90591	0.005951226	0.90131	0.03858	1.18	0.001039
rs513091	<i>GRIK2</i>	1111819	A	C	0.1209	0.000834405	0.1227	0.03655	0.86	0.00023
rs9404359	<i>GRJK2</i>	1270169	T	C	0.07665	0.008650422	0.07922	0.1336	0.88	0.005231
rs2399931	<i>GRIK2</i>	1276273	A	G	0.92518	0.004135609	0.92239	0.1228	1.14	0.002864
rs1155126	<i>GRIK2</i>	1283682	T	G	0.8461	0.011702895	0.8359	0.08919	1.11	0.004154
rs10264684	<i>CNTNAP2</i>	0	T	C	0.1193	0.070182264	0.1145	0.04229	1.15	0.008385
rs17170932	<i>CNTNAP2</i>	0	T	C	0.7957	0.063198268	0.7759	0.05066	1.11	0.008989
rs11971331	<i>EN2</i>	63597	A	G	0.7906	0.032859445	0.8115	0.07177	0.90	0.007274
rs2785079	<i>PTEN</i>	53854	A	G	0.1792	0.037645042	0.1944	0.01999	0.87	0.002503
rs1855970	<i>PTEN</i>	94189	T	G	0.8555	0.003603458	0.851	0.02425	1.16	0.000437
rs2108636	<i>CACNA1C</i>	2823	T	G	0.2367	0.003731608	0.2493	0.1541	0.93	0.00351
rs7972947	<i>CACNA1C</i>	0	A	C	0.2038	0.019070685	0.2189	0.1204	0.92	0.008154
rs4765898	<i>CACNA1C</i>	0	A	G	0.6734	0.039253592	0.6479	0.002878	1.15	0.000505
rs2238034	<i>CACNA1C</i>	0	T	C	0.7613	0.056032717	0.7385	0.01058	1.14	0.002094
rs2370419	<i>CACNA1C</i>	0	A	G	0.07443	0.133075953	0.06006	0.002356	1.30	0.00161
rs4076021	<i>GABRB3</i>	229543	T	C	0.90824	0.297545791	0.8989	0.007551	1.24	0.009643
rs751994	<i>GABRB3</i>	0	T	C	0.2965	0.023734212	0.2907	0.1227	1.08	0.009754
rs1863455	<i>GABRB3</i>	0	T	C	0.8874	0.009559274	0.8865	0.1976	0.92	0.008815
rs11652097	<i>ITGB3</i>	14491	T	C	0.3902	0.127124429	0.3989	0.007181	0.88	0.003525
rs2056131	<i>ITGB3</i>	0	T	C	0.3152	0.229719758	0.3022	0.008369	1.13	0.007625
rs10514919	<i>ITGB3</i>	0	T	G	0.2525	0.024986625	0.2477	0.08547	0.91	0.006991
rs999323	<i>ITGB3</i>	0	A	G	0.6944	0.085578978	0.6883	0.03919	1.11	0.009361

10

20

30

【0180】

(b) 染色体 X 上の A S D 候補遺伝子座内もしくはその周りの重要な S N P s を以下にまとめる :

【表 21】

SNP	隣接遺伝子	SNP-遺伝子距離	A1	A2	A1_freq (AGRE)	P (AGRE)	A1_freq (ACC)	P (ACC)	オッズ比 (ACC)	P (統合)
rs11798405	<i>NLGN4X</i>	877282	A	G	0.907172	0.006729	0.90051	1.10E-05	1.66	8.96E-07
rs878252	<i>NLGN4X</i>	221323	T	C	0.480405	0.030916	0.4949	0.004555	0.85	0.000584
rs11094994	<i>NLGN4X</i>	0	T	C	0.262923	0.021081	0.2533	0.002878	0.81	0.000274
rs4826722	<i>NLGN4X</i>	100865	A	G	0.234249	0.012679	0.2364	0.1762	0.91	0.009322
rs4826723	<i>NLGN4X</i>	115449	T	C	0.235548	0.01695	0.2372	0.1188	0.90	0.007383
rs5951989	<i>FMRI</i>	411643	T	C	0.780632	0.15267	0.7903	0.004058	1.24	0.002813

40

【0181】

結論として、ヨーロッパ系の 10,000 人を超える対象の合した試料において、本発明者らは、A S D に対する感受性と関連する C D H 10 ~ C D H 9 の間の遺伝子間領域において、共通の遺伝的変異を特定した。C D H 10 および C D H 9 の潜在的な役割に加えて、経路に基づく関連分析は、A S D に関する感受性の付与における他の神経細胞接着分子を支持する。A S D の遺伝的複雑性および拡大研究には非常に大きな患者コホートが必要であることを強調することとは別に、本発明者らの研究は、A S D の複雑な遺伝的構造

50

を究明する多大な努力の一部として、共通の感受性対立遺伝子を同定するゲノムワイド関連法の適用に成功する。

#### 【0182】

##### 実施例ⅠⅠⅠ

自閉症およびA S Dの治療のために有効な治療薬を同定するためのスクリーニングアップセイ

本明細書の前記情報を、自閉症もしくは自閉症スペクトラム障害の発現に関して増大した感受性を診断するため、および治療的介入のために、患者に対して臨床的に適用することができる。本発明の好適な実施形態は、本明細書で記載する情報を患者に適用することを含む。マイクロアレイを含む診断用組成物、および方法は、自閉症もしくはA S Dの発現についての感受性を評価するために患者から得られた核酸において本明細書に記載する遺伝子発現を同定するために設計することができる。これは、患者が診療所に到着した後に行うことができ、患者から採血し、そして本明細書に記載した診断法を用いて、医師は実施例Ⅰに記載するようにC N Vを検出することができるか、または実施例ⅠⅠに記載するように染色体5のC D H 1 0およびC D H 9領域におけるS N Pを検出することができる。患者試料から得られる情報は、選択的に評価前に増幅することができ、自閉症またはA S Dを発現する感受性が増加もしくは低下した患者を診断するために用いられる。本発明の診断法を実施するためのキットも本発明で提供する。このようなキットは、本発明で提供される少なくとも1つのS N Pおよび前記患者試料を評価するために必要な試薬を含むマイクロアレイを含む。

10

#### 【0183】

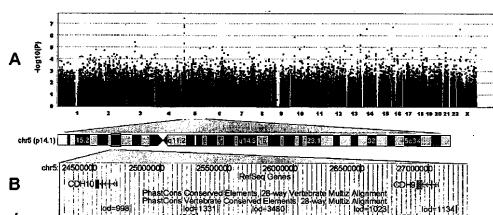
自閉症/A S Dに関する遺伝子の同一性および患者結果は、どの変異体が存在するかを示し、A S D発現の危険性が変わったものを同定する。本明細書において提供する情報によって、従来可能であったよりも疾患進行の早い時期に治療的介入が可能になる。本明細書において前述のように、C H D 1 0およびC H D 9は、この神経疾患の治療のために有効な新規治療薬開発の新規標的を提供する。

20

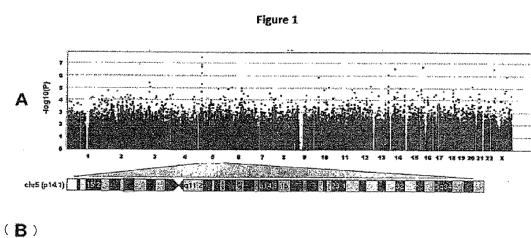
#### 【0184】

本発明のある好適な実施形態を記載し、具体例を示したが、本発明はかかる実施形態に限定されることを意図しない。以下の実施例に記載される本発明の範囲および趣旨から逸脱することなく、様々な変更を加えることができる。

30

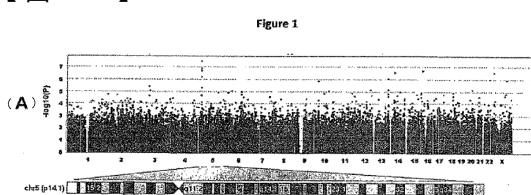


【図 1 A】



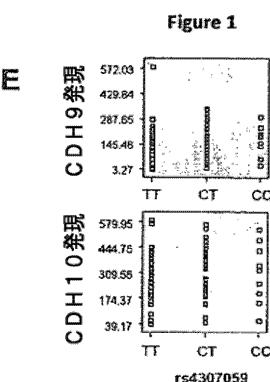
(B)

【図 1 B】



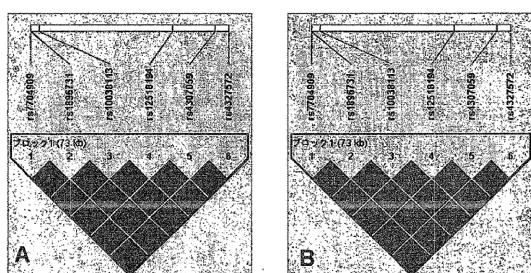
B

【図 1 E】



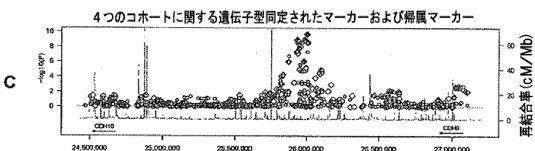
【図 2】

Figure 2

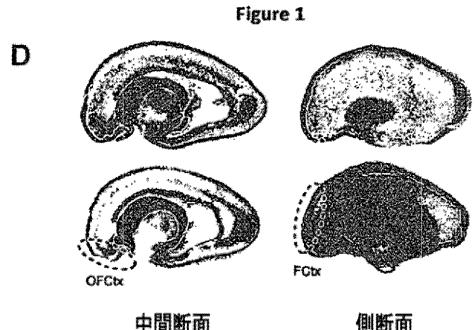


【図 1 C】

Figure 1

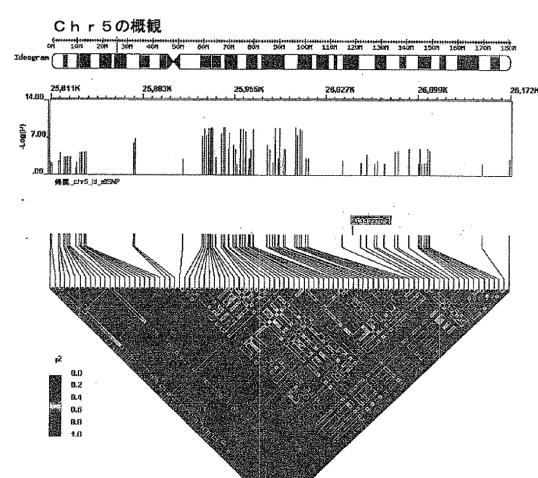


【図 1 D】



【図 3】

Figure 3

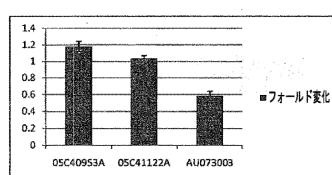


## 【図4 A】

Figure 4 (A)

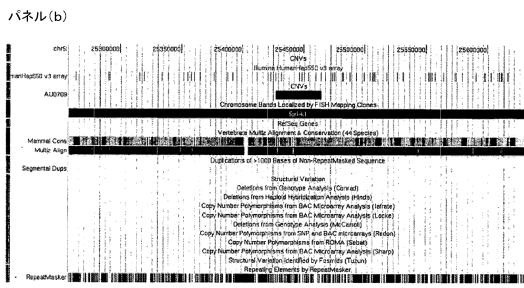


CNVはすでにHapMapサブプロジェクトで記載されている(Reodon)。  
本発明者は、MLPAアッセイを用いて実験的検証を試みた。  
(代表的シリーズを以下に図示し、エラーバーは標準誤差を示す)。



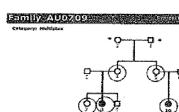
## 【図4 B】

Figure 4 (B)

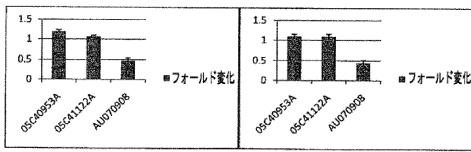


範囲: chr5: 25426837~25464318。本発明者は、QPCRとMLPAとの両方向によってCNVを検証した。

QPCR結果: CNVは1家族だけで検出される(赤円: 被験者は欠失を保有する; 星印: DNA入手不可)

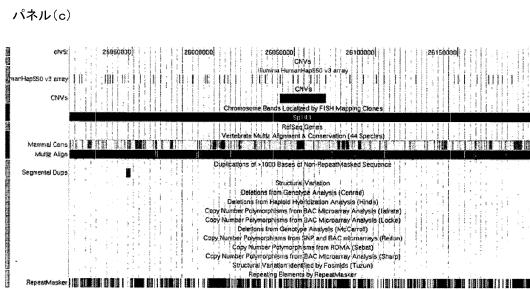


MLPA結果(2つのプローブを使用し、どちらもCNVを検証し、代表的なシリーズを図示する)。



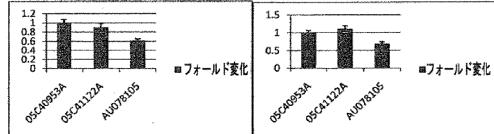
## 【図4 C】

Figure 4 (C)



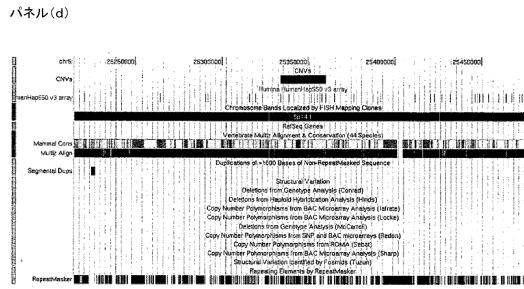
領域: chr5: 26041000~26069708

このCNVはMLPAによって検証される(2つのプローブを使用し、どちらもCNVを検証し、代表的なシリーズを図示する)。



## 【図4 D】

Figure 4 (D)

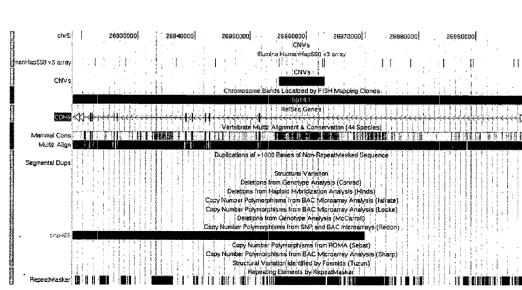


領域: chr5: 25333737~25360219

このCNVは2人の関連する被験者(AU0915301, AU0915202)から検出される。本発明者は、3人の被験者に対してTaqMan QPCRによって実験的検証を試みたが、全CNV定値は1~8から3~8までの非常に大きな変動があり(この家族中の4人の被験者のCNVは、2, 3~2, 7の間であった)、このことは、潜在的な分析誤差を示す。それでも、2人の関連する被験者において検出されるので、本発明者は前記CNV情報をここに記載したが、これは検証できなかったことを警告する。

【図4E】

Figure 4 (E)

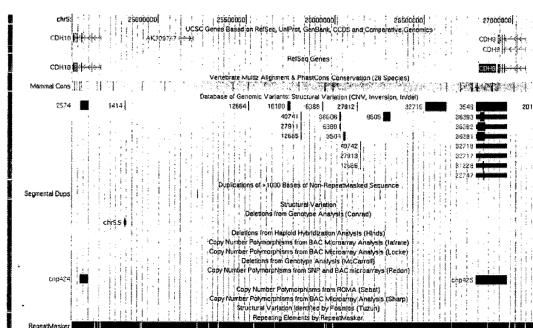


領域: chr5:26955104~26963260

CNVはHappyMapプロジェクトにおいてすでに記載されている(Reedonら)。

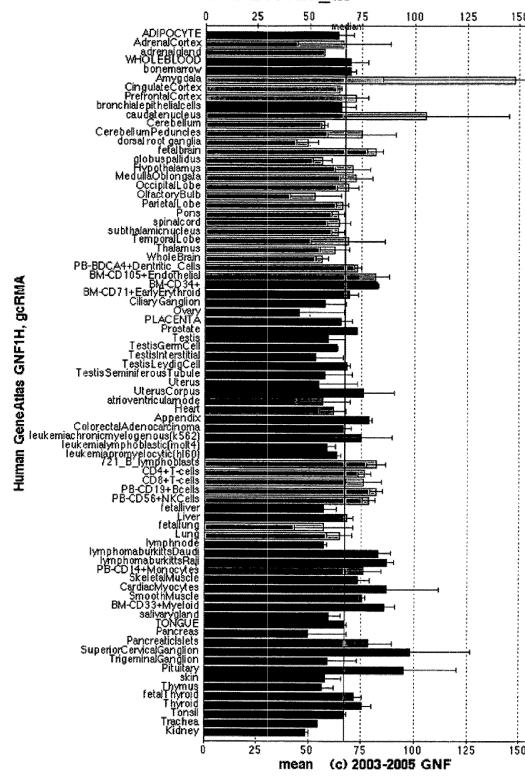
〔 5 〕

**Figure 5**



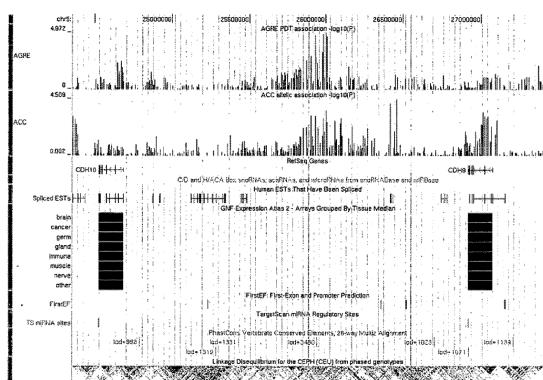
【図7】

Figure 7  
**CDH9 207729\_at**



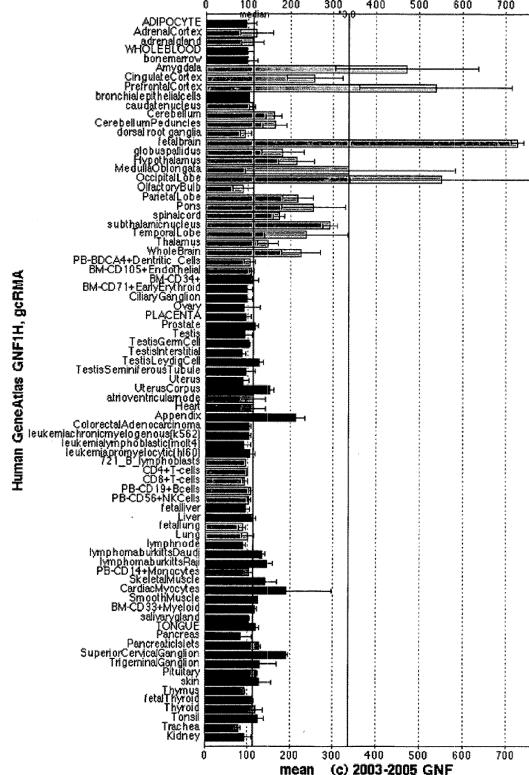
【図6】

Figure 6



【圖 8】

Figure 8  
CDH10 220115 s at



---

フロントページの続き

- (72)発明者 グレスナー、ジョセフ  
アメリカ合衆国、08012 ニュージャージー州、ターナーズビル、221 グリーンツリー  
ロード
- (72)発明者 ブラッドフィールド、ジョナサン  
アメリカ合衆国、19103 ペンシルバニア州、フィラデルフィア、266 サウス 23アーヴィング  
ストリート
- (72)発明者 グラント、ストルアン  
アメリカ合衆国、19104 ペンシルバニア州、フィラデルフィア、3604 ハミルトン ストリート
- (72)発明者 ザング、ハイタオ  
アメリカ合衆国、19104 ペンシルバニア州、フィラデルフィア、4415 スブルース ストリート、アパートメント 1エフ
- (72)発明者 ワング、カイ  
アメリカ合衆国、19446 ペンシルバニア州、ランズデール、2531 クレストライン ドライブ

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 松田 芳子

審判官 高堀 栄二

(56)参考文献 NATURE GENETICS, 2007年, Vol. 39, NO. 3, p. 319 - 328  
SCIENCE, 2007年, Vol. 316, p. 445 - 449  
PLoS ONE, 2007年, Vol. 2, No. 12, e1262

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N 15/00-15/90

C12Q 1/68

CAPLus / MEDLINE / BIOSIS / EMBASE (STN)