

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19716

研究課題名(和文)統合失調症罹患同胞対のエクソーム解析を基盤としたリスク変異の確定

研究課題名(英文) Rare gene variations and risk of schizophrenia: whole-exome sequencing in families with affected siblings followed by targeted resequencing and a case-control study

研究代表者

保谷 智史 (HOYA, Satoshi)

新潟大学・医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50748580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の発症に大きな影響力をもつ稀なリスク変異を同定するため以下の研究を行った。まず罹患同胞対3家系の全エクソーム解析を行い、PDCD11遺伝子の2つの稀な非同義変異(D961N、V1240L)を同定した。次に患者96人において同遺伝子のコード領域をターゲットリシーケンスし、3つの稀な非同義変異(V1240L、F1835del、R1837H)を同定した。さらに症例・対照研究(1,357対1,394)を行ったが、これらの変異と統合失調症とに有意な関連を認めなかった。PDCD11遺伝子の稀な変異が統合失調症の発症に大きな影響力をもつ可能性は支持されなかった。

研究成果の概要(英文)：To identify rare variations that have strong impact on the risk of developing schizophrenia, we performed a three-stage study. In the first stage, we identified two rare missense PDCD11 variations (D961N and V1240L) using whole-exome sequencing (WES) data from three families, each with two affected siblings. In the second stage, we identified three rare non-synonymous variations (V1240L, F1835del, and R1837H) via targeted resequencing of the PDCD11 coding region in 96 patients. In the third stage, a case-control study demonstrated no significant associations between schizophrenia and four rare PDCD11 variations in a total of 1,357 patients and 1,394 controls. Our data do not support the role of rare PDCD11 variations in conferring substantial risk for schizophrenia in the Japanese population.

研究分野：精神神経科学

キーワード：統合失調症 罹患同胞対 全エクソーム解析 PDCD11遺伝子

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の病態は不明だが、遺伝率の高さから、その発症には遺伝要因の関与が大きいと考えられている (Owen et al. 2016)。統合失調症のゲノムワイド関連解析のメタ解析では、108 のリスク多型が同定された (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014)。しかし、個々のリスク多型が発症に与える影響は小さいことから、ゲノムワイド関連解析の成果を病態解明へとつなげるには大きな困難がある。ゲノム中の全エクソンをシーケンスする全エクソーム解析が実施されているが、研究開始当初、統合失調症の発症に大きな影響力をもつ稀なリスク変異は確定されていなかった (Fromer et al. 2014; Purcell et al. 2014)。

研究代表者らは、研究開始までに統合失調症罹患同胞対 3 家系の全エクソーム解析を実施し、2 家系に共通する候補リスク遺伝子として *PDCD11* 遺伝子を見出していた。すなわち、全エクソーム解析で検出された変異の内から、1) リード数 10 以上、2) 罹患同胞対が共有、3) 遺伝様式が常染色体優性または常染色体劣性、4) ミスセンス変異、5) 進化上の保存度の指標である GERP スコアが 5 を超える、6) マイナーアレル頻度が 0.01 未満の稀な変異、を満たす変異をフィルタリングしたところ、家系#1 では V1240L 変異が非罹患患者の父から、家系#2 では D961N 変異が非罹患患者の母から、罹患同胞対にそれぞれ伝達されていた (図 1、図 2)。

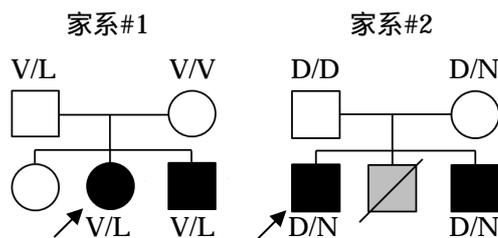


図 1 罹患同胞対・両親家系

2. 研究の目的

全エクソーム解析により同定された有力な候補遺伝子である *PDCD11* 遺伝子の稀な変異を、統合失調症の発症に大きな影響力をもつリスク変異として確定することが目的である。

3. 研究の方法

本研究は新潟大学医学部および共同研究機関の遺伝子倫理審査委員会により承認され、対象者からは書面にて研究参加の同意を得た。

(1) 候補リスク遺伝子リシーケンス

PDCD11 遺伝子内の異なる変異も統合失調症の発症に寄与する可能性がある。そこで症例 96 サンプルについて、*PDCD11* 遺伝子

のコード領域を次世代シーケンサー (Illumina MiSeq) によりリシーケンスし、稀な変異を網羅的に検索した。同定された変異のうち、GERP スコアが 5 を超え、マイナーアレル頻度が 0.01 未満の稀な非同義変異を候補リスク変異として選択した。

(2) *In silico* 解析

同定された変異の機能を予測するために *in silico* 解析を行った。具体的には、Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)、Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT; <http://sift.bii.a-star.edu.sg/index.html>)、Combined Annotation Dependent Depletion (CADD; <http://cadd.gs.washington.edu/home>)を用いた。

(3) 症例・対照研究

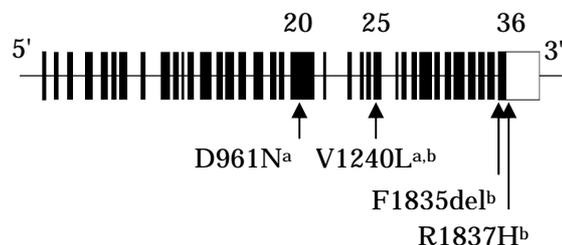
全エクソーム解析とターゲットリシーケンスにより同定された *PDCD11* 遺伝子の稀な非同義変異が、特定の家系においてだけでなく、広く統合失調症の発症リスクに関与していることを確かめるために、2 つの症例・対照サンプル (新潟、神戸) から成る計 1,357 対 1,394 サンプルを用いた関連解析を行った。タイピングには、TaqMan 法およびフラグメント解析を用いた。

フィッシャーの正確確率検定により、個々の変異についての関連解析を行った。Gene-based 解析には、sequence kernel association test (SKAT; <http://www.hsph.harvard.edu/skat/>)を用いた。EZR v1.30 (<https://cran.r-project.org/web/packages/RcmdrPlugin.EZR/index.html>)を用い、個々の変異について、ランダム効果モデルにもとづくメタ解析を行った。Gene-based メタ解析には MetaSKAT (<https://cran.r-project.org/web/packages/MetaSKAT/>)を用いた。Genetic Power Calculator (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/>)により検出力検定を行った。

4. 研究成果

(1) 候補リスク遺伝子リシーケンス

PDCD11 遺伝子のターゲットリシーケンスにより、3 つの稀な非同義変異が同定された (図 2)。



^a 全エクソーム解析で同定された変異

^b リシーケンスで同定された変異

図 2 *PDCD11* 遺伝子の稀な非同義変異

(2) *In silico* 解析 (表2)

Polyphen-2 により、D961N、V1240L、R1837H 変異は「おそらく有害」と予測された。SIFT により、D961N、F1835del、R1837H 変異は「有害」と予測された。D961N、R1837H 変異の CADD スコアは 30 を超えたが、このスコアはこれらの変異が最も有害な変異 0.1%の中に含まれることを示唆する。また、V1240L、F1835del 変異の CADD スコアは 20 を超えたが、このスコアはこれらの変異が最も有害な変異 1%の中に含まれることを示唆する。

表2 *In silico* 解析

変異	PolyPhen-2	SIFT	CADD
D961N	おそらく有害	有害	32
V1240L	おそらく有害	影響なし	27.2
F1835del		有害	22.8
R1837H	おそらく有害	有害	35

(3) 症例・対照研究

全エクソーム解析、ターゲットリシークエンスにより同定された計4つの稀な非同義変異について症例・対照研究を行ったが、有意な関連を認めなかった(表1)。

表1 症例・対照研究

変異	OR	95%CI
D961N		
新潟サンプル	0.98	0.46-2.09
神戸サンプル	0.83	0.36-1.93
プールサンプル ^a	0.91	0.52-1.60
V1240L		
新潟サンプル	0.35	0.04-3.40
神戸サンプル	0	-
プールサンプル ^a	0.2	0.03-1.17
F1835del		
新潟サンプル	NA	NA
神戸サンプル		-
合計サンプル ^b		-

R1837H

新潟サンプル	NA	NA
神戸サンプル	NA	NA

^a ランダム効果モデルにもとづくメタ解析

^b フィッシャーの正確確率検定

(4) 考察

PDCD11 遺伝子は、統合失調症の候補リスク遺伝子として有望かもしれない。*PDCD11* 遺伝子は、ゲノムワイド関連解析のメタ解析において、3番目に有意な関連を示した領域 (chr10:104423800-105165583) に含まれている (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014)。興味深いことに、ゲノムワイド関連解析により統合失調症との関連が示された座位と、統合失調症患者の全エクソーム解析により同定された *de novo* の非同義変異が存在する遺伝子とが重複することが知られている (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014)。また、*PDCD11* 遺伝子産物は NF- κ B を活性化し、Fas リガンドの転写を誘導することでアポトーシスに関与すると考えられている (Lacana et al. 1999)。さらに、死後脳研究では、統合失調症患者における NF- κ B の発現異常が報告されている (Roussos et al. 2013; Volk et al. 2015)。

F1835del 変異と R1837H 変異は罹患者においてのみ同定された。コード領域の変異を集積したデータベースである ExAC において、F1835del は東アジア人 8,654 人では認められず、R1837H は登録されていなかった。今回の症例・対照研究では、*PDCD11* 遺伝子の稀な非同義変異と統合失調症との有意な関連を認めなかったが、F1835del 変異と R1837H 変異のアレル頻度は極端に稀であるかもしれない。検出力不足による偽陰性の可能性は否定できない。仮にヘテロ接合体の相対危険度を 5 とし、リスクアレル頻度を 0.001、有病率を 0.01 とすれば、我々のサンプルサイズによる検出力は 0.8 に達するが、この仮定よりもアレル頻度が稀、あるいは相対危険度が低い変異との関連を検出するためには、サンプルサイズを拡大し追試する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

- (1) 保谷智史、渡部雄一郎、染矢俊幸. 統合失調症罹患者同胞対のエクソーム解析に基づくリスク遺伝子の同定. 新潟県医師会報 803: 9-10, 2017

[学会発表](計1件)

- (1) 保谷智史, 渡部雄一郎, 布川綾子, 金子尚史, 村竹辰之, 井上絵美子, 澁谷雅子, 井桁裕文, 江川純, 染矢俊幸. *PDCD11* 遺伝子の稀な変異と統合失調症の発症リスク: 罹患同胞対・両親3家系の全エクソーム解析. 第38回日本生物学的精神医学会. 2016年9月8日~2016年9月10日. 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保谷 智史 (HOYA, Satoshi)

新潟大学 医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号: 50748580