

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月9日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591263

研究課題名（和文）次世代型超高速シーケンサーによる精神疾患の稀少変異仮説へのアプローチ

研究課題名（英文） Approach to the rare variation hypothesis of the psychiatric disorder by a next generation type ultra high-speed sequencer

研究代表者

黒滝 直弘 (KUROTAKI NAOHIRO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：20423634

研究成果の概要（和文）：代表的精神疾患である統合失調症(SCZ)と双極性障害(BPD)の原因となりうる新たな疾患感受性遺伝子を探索するためにホモ接合マッピングと次世代型シーケンサーによるシーケンス解析を行った。その結果、直接疾患の発症機序に関わる遺伝子の同定には至らなかったものの、特にSCZにおいては疾患の遺伝的異種性が極めて高いことが判明した。遺伝子座は染色体1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 21番を同定した。それらの領域にマップされる遺伝子は200個であり、方法論は妥当であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We performed the molecular analysis of psychiatric diseases including schizophrenia and bipolar disorders. In this analysis, several novel loci were detected. Possible loci were chromosomes 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, and 21. Interestingly, just one locus had been reported. Their region concluded more than 200 genes. Also, we show that SCZ is highly heterogeneous.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：遺伝子、マイクロアレイ、精神疾患、稀少変異仮説、ホモ接合マッピング、Runs of homozygosity

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

ありふれた病気 (common disease) の中でも、社会的喪失の膨大な躁うつ病、統合失調症の遺伝学解析に結果に再現性を欠くことがある。

昨今、ゲノムDNA内で、ホモ接合領域が大きいほど、単一遺伝子病のみならず、高血圧や高脂血症などのありふれた病気 (common

disease) でさえリスクが増加することが相次いで報告された (McQuillan et al., 2008)。自閉性障害でも同様の所見が示唆された (Morrow et al., 2008)。これらの事実から、申請者は精神疾患においてもゲノム内のホモ接合領域を探索することが重要であるとの結論に至った。さらに疾患感受性遺伝子が存在するとあろうと予想される創始者 (founder) から引き継いだ同祖性のホモ接

合領域 (IBD, identical by descent) を求める方法を新たに考えた。いとこ婚を両親に持つ患者への上述の DNA マイクロアレイを用いたホモ接合マッピングによる統合失調症の遺伝解析を行った上でその遺伝子座に存在する遺伝子を次世代超高速シーケンサーによる解析を行う計画とした。

2. 研究の目的

正確な DNA マイクロアレイによるホモ接合マッピングの後、新規統合失調症の遺伝子座の領域をシーケンスキャプチャーと次世代超高速シーケンサーで変異解析を行い、Common disease-rare variant 説に基づく確実な原因遺伝子を探索し、疾患の発症メカニズムに基づく治療の開発への貢献を目指す。一方、統合失調症の患者を追加するとともに解析となる対象疾患を双極性障害まで拡大し、隠れマルコフモデルを用いた方法で、ホモ接合マッピングを行い、有意なホモ接合領域の同定に至る。これらの結果から新たな治療方法の構築を目指す。

3. 研究の方法

研究は、症例の採集と、DNA マイクロアレイによるホモ接合マッピング、シーケンス解析から構成される。既に収集している両親がいとこ婚の統合失調症患者 11 名に加え双極性障害の患者 10 名の収集を行う。マイクロアレイによるホモ接合マッピングを改良した方法で解析を行い、領域を決定する。その後のシーケンスキャプチャーと次世代超高速シーケンサーによる解析は外部に委託する。その結果を申請者が解析し、疾患感受性遺伝子を同定したりゲノム病の可能性を検討する。本研究は長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の承認の元で実施される (許可番号 0702280108)。対象は長崎大学付属病院精神神経科および長崎県内の関連病院に入院中または通院中の躁うつ病、統合失調症に罹患する患者である。それぞれの疾患について両親がいとこ婚の計 20 家系の集約を目標とする。経験豊富な 2 人以上の精神科医によって DSM-IV-TR および ICD-10 の診断基準に基づき厳密に診断され、研究の目的や方法についてインフォームドコンセントを得る。対象者から約 10ml の採血を行い、フェノール法で DNA を抽出する。DNA マイクロアレイは Affymetrix 社の Affymetrix Genome-Wide Human SNP Assay 5.0 を使用する。Affymetrix GeneChip® Scanner でデータを読み取り、ホモ接合となっている領域 (同祖性領域) を特定する。Affymetrix GeneChip® Scanner は、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (21 世紀 COE) にあるものを使用する。次世代超高速シーケンサーによる解析は本学にはシーケンスキャプチャーおよびシ

ーケンサー自体がない。この必要機器一式をそろえるのに必要な費用は約 1 億円であり、さらに 1 解析あたり試薬、消耗品が約 110 万円必要となる。外部委託費用では 1 解析あたり約 80 万円で可能であり、設備投資も不要である。本研究では統合失調症患者 3 名の解析をもって初期データとする。

4. 研究成果

いとこ婚を両親に持つとホモ接合マッピングで得られる ROH (Runs of Homozygosity) が比較的同定しやすく、その中に含まれる劣性変異、が疾患に関与性があるのではないかと考えた。本研究では 2.1Mb 以上の ROH の中における劣性変異を見つけることにした。この過程において、この ROH の中に IBD (identical by descent) が含まれており、この影響が疾患に関与するのではないかと想定した。両親をいとこ婚に持つ 9 名の統合失調症の患者さん (3 名の男性と 6 名は女性)、年齢は 31 歳から 56 歳までの患者さんを収集した。診断は DSM-IV-TR と SCID によって妄想型統合失調症である。長崎大学ヒトゲノム解析倫理委員会承認を得た後、書面で同意を得た。9 名のうち、2 人は同胞である。私達は、非近親婚の 92 名の健常者の解析も行なった。末梢血より DNA を採集し、本研究に用いた。更に、HapMap3 GTP の International HapMap Project のデータを解析し、我々の非近親婚の方の ROH を比較した。マイクロアレイは、Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array を用いて行なった。ジェノタイプの結果から、Partek genomics suite 6.5 を用いて ROH の抽出を行った。更に 92 人の非近親婚者のデータと 91 人の HapMap3 JPT のデータを 9 名の統合失調症の患者さんのデータと加えて解析した。いとこ婚を両親に持つと、非近親婚者に比較して ROH の合計はより大きく、また ROH の数はより少ない傾向にある事が分る。このデータから、私達は 9 名の患者のうち、少なくとも 3 人が重なっている ROH、即ち少なくとも 3 人で共通する ROH は、疾患感受性となりうる劣性変異があるのではないかと仮定した。その結果、染色体 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 21 番にこれまで報告していなかった遺伝子座を発見する事が出来た。但し、染色体 5 番だけはこれまで報告があった遺伝子座である。また、2 人の同胞で重なった共通部分と他の罹患患者で重なった部分を検討すると、染色体 1, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 19, 21 が、可能性のある遺伝子座として同定された。これらはいずれもかつて報告が無かったものである。サンプルの妥当性について、私達が採取した 92 人の非近親婚、健常者のデータは、Hapmap のデータと比べて差異が無くデータとしては的確である事が証明された。解析した統合

失調症の症例は9名と多くはないが、私達の Strategy は、相応に情報量が含まれている事が証明された。たかだか9名の統合失調症患者ではあるが、共通した遺伝子座は極めて少ない。即ち、統合失調症の遺伝的異種性が想像以上に大きい事が見て取れた。この結果は、第35回日本精神病理・精神療学会で発表した。

遺伝子座の領域は50Mbに及びマップされる遺伝子は200余りであった。これらのエキソーム解析を行い、生データを入力し、様々なプログラムで解析を試みているところである。

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15件)

①Ono S, Imamura A, Tasaki S, Kurotaki N, Ozawa H, Yoshiura K, Okazaki Y, Failure to confirm CNVs as of aetiological significance in twin pairs discordant for schizophrenia, *Twin Res Hum Genet* 13(5): 455-460, 2010. (IF: 1,994)

②Nishihara K, Kinoshita H, Kurotaki N, Ozawa H, Imamura A, Could subclinical hypothyroidism cause periodic catatonia with delusional misidentification syndrome? *Psychiatry Clin Neurosci* 64(3): 338, 2010. (IF: 1,326)

③Ono S, Yoshiura K, Kurotaki N, Kikuchi T, Niikawa N, Kinoshita A, Mutation and copy number analysis in paroxysmal kinesigenic dyskinesia families, *Mov Disord* 26(4): 761-763, doi: 10.1002/mds.23475, Epub 2011 Feb 10, 2011. (IF: 4,014)

④Kubo T, Horai S, Ozawa H, Kurotaki N, Case of undiagnosed catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia presenting with ventricular fibrillation after administration of succinylcholine during anesthesia for modified electroconvulsive therapy, *Psychiatry Clin Neurosci* 65(4):397, 2011. (IF: 1,326)

⑤Kurotaki N, Tasaki S, Mishima H, Ono S, Imamura A, Kikuchi T, Nishida N, Tokunaga K, Yoshiura K, Ozawa H, Identification of novel schizophrenia loci by homozygosity mapping using DNA microarray analysis, *PLoS one* 6(5):e20589, 2011. (IF: 4,411) Kurotaki N, Nobata H, Nonaka S, Nishihara

⑥K, Ozawa H, Three cases of schizophrenia showing improvement after switching to blonanserin, *Psychiatry Clin Neurosci*, 65(4):396-397, 2011. (IF: 1,326)

⑦Yoneda Y, Saitsu H, Touyama M, Makita Y, Miyamoto A, Hamada K, Kurotaki N, Tomita H, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ogata K, Naritomi K, Matsumoto N, Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features, *J Hum Genet*, 57(3), 207-11, Feb 2 2012. (IF: 2.496)

⑧Ono S, Yoshiura KI, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N, Kurotaki N, Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions, *J Hum Genet*, 57(5), 338-41, Mar 8 2012.

⑨Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N, Kurotaki N, Mutations in PRRT2 responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions, *J Hum Genet*, Jun 57(6), 399, No abstract available, Jun, 2012.

⑩Nakano T, Ono S, Yamaguchi J, Sugimoto R, Yamaguchi N, Morimoto Y, Kubo T, Ozawa H, Kurotaki N. Modified electroconvulsive therapy for the treatment of refractory schizophrenia-like psychosis associated with Huntington's disease. *J Neurol*. 260(1):312-4, Jan, 2013.

⑪黒滝直弘, 三嶋博之, 田崎信也, 菊池妙子, 西田奈央, 徳永勝士, 吉浦孝一郎, 小澤寛樹, DNAマイクロアレイを用いた統合失調症のホモ接合マッピング, *精神薬療研究年報* 42: 31-32, 2010.

⑫黒滝直弘, 私の論文から Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome, *九州神経精神医学* 56(3,4): 190-197, 2010.

⑬森本芳郎, 久保達哉, 黒滝直弘, 小澤寛樹, わたしのカルテから 内因性精神病を疑われた大脳皮質基底核変性症の2例, 九州神経精神医学 57(3,4) : 172-174, 2011.

⑭今村明, 小野慎治, 辻田高弘, 橋田あおい, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 岡崎祐史士, 一卵性双生児精神疾患不一致例によるコピー数解析, 日本生物学的精神医学会誌 23(1) : 23-28, 2012.

⑮木下裕久, 太田保之, 中根秀之, 一ノ瀬仁志, 黒滝直弘, 小澤寛樹, 【災害と精神医学】 雲仙・普賢岳噴火災害被災住民の長期経過後の精神的問題 被災後13年後調査より, 臨床精神医学 41(9) : 1293-1298, 2012.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)
該当なし

○取得状況 (計0件)
該当なし

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒滝 直弘 (KUROTAKI NAOHIRO)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号 : 22591263

(2) 研究分担者

小澤 寛樹 (OZAWA HIROKI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 50260766

今村 明 (IMAMURA AKIRA)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 : 40325642

(3) 連携研究者

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA KOUICHIROU)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 00304931

三嶋 博之 (MISHIMA HIROYUKI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 10513319