

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390191

研究課題名(和文) 神経性食欲不振症を対象とした一塩基多型マーカーによるゲノムワイド関連遺伝子解析

研究課題名(英文) Identification of susceptibility genes of Anorexia Nervosa by GWAS

研究代表者

小牧 元 (Komaki, Gen)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70225564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：摂食障害、特に神経性食欲不振症(AN)は遺伝性が強いにもかかわらず、いまだにその原因遺伝子が同定されていない。そこで、ANの家族症例を対象に全エクソンをシーケンシングするエクソーム解析を実施し、その原因遺伝子の同定を試みた。その結果、家族内の罹患者に共有するアミノ酸置換を伴う複数の変異が見出され、その中でも特に神経伝達物質のレセプターをコードするこの遺伝子上に、神経性食欲不振症の原因変異が蓄積されている可能性が示唆された。さらにこの変異はこのタンパクの相互作用に影響を及ぼすことが推定された。今後はこの遺伝子ファミリーに限定した、さらなる変異の追及と、機能的な解析が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Despite the high heritability of anorexia nervosa (AN), no causative gene has yet been pinpointed in the human genome. We tried to identify the causative genes in AN families using whole exome sequencing (exome analysis). This analysis found rare variants yielded substitution of amino acid and shared with affected individuals. Moreover, AN causative variants were likely to be accumulated at receptor genes for neurotransmitter. Of these, a rare variant is expected to influence protein-protein interaction. Additional variants and functional analysis in the family genes will be prerequisite for future works.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般(含心身医学)

キーワード：心療内科学 摂食障害

1. 研究開始当初の背景

摂食障害 (Eating Disorders, ED) は食行動の重篤な障害を特徴とし、神経性食欲不振症 (AN) と神経性過食症 (bulimia nervosa, BN)、特定不能の摂食障害 (EDNOS) に分類される。AN の特徴は食事制限、絶食、過剰な運動、排出行動により正常体重の最低限の維持を拒否することである。BN はむちゃ喰いと体重増加を防ぐための代償行動を繰り返し著しい低体重は示さない。両者はやせ願望や肥満恐怖、自己評価が体型や体重の影響を過剰に受ける等の臨床像を共有する。思春期・青年期の女性に多く発症する。ED は 1990 年代から急増し、最近 10 年で AN は 3 倍、BN は 4 倍、EDNOS は 2 - 3 倍に増加した。女子高校生の 2002 年の調査で AN 0.2%、BN 2.2%、EDNOS 9.1%とされ ED は一般的な疾患である。4 - 15 年後の転帰は回復 47%、部分回復 10%、未回復 37%、死亡 7%である。回復には 5 - 10 年を要し、1-2 割程度は慢性化し、思春期・青年期の精神・身体発達や社会適応、次世代の育成に深刻な障害を与える。ED に特異的な生物学的マーカーは未だ見出されていない。そのため生物学的な発症や病態メカニズムの解明が困難である。ED、特に AN の治療法の開発は遅れており有効な治療薬はない。患者、医療者双方に負担が大きい疾患である。治療の困難さから専門の治療施設は少ない。しばしば長期間入院を繰り返し、医療経済的な負荷も大きい。病態の解明や治療法の開発が急務である。AN は Bio-Psycho-Social な疾患の典型であり、その発症には遺伝的要因の関与が大

きい。実際 AN の一卵性双生児の一致率は 55%、二卵性双生児は 7%、BN では 23%と 8%程度とされ、遺伝的要因は AN が 70%、BN が 60%程度と推定される。家系内集積性は AN の λ_s は 12~41、BN の λ_s は 4 とされる。ED、なかでも AN には遺伝的要因が大きく寄与することは明らかである。

2. 研究の目的

この原因遺伝子を探索する目的で、これまでに数例のゲノムワイド関連解析 (GWAS) が報告されているが、各遺伝子座の発症リスクは極めて低く、遺伝率のほとんどが説明できていない。この原因は病型を厳選しても複雑な遺伝学的異質性が回避できないことと考えられる。例えば、生物学的なキープロセスが共有してしまい、異なる原因であるのに同じ疾患を発症してしまう可能性が潜んでいる (Cell. 141, 210-7, 2010)。さらにこの GWAS は頻度が高い変異しか見出すことができない。一方、疾患原因変異は人類にとって有害であるため、進化の過程で淘汰されなければならない。したがって、その変異が集団中で観察されるとすれば極めて頻度が低く、この GWAS では検出不可能である。そこで我々は摂食障害原因変異を網羅的に見出すため、摂食障害発症家族を対象とした、ゲノム中の全エクソンをシーケンシングするエクソーム解析を実施することとした。すなわち、家族内の患者で共有する摂食障害原因変異を探索することで遺伝子座異質性を回避し、前述の問題を克服できると考えている。また、シーケンシングにより直

接変異を観察することで、GWAS では不可能であった頻度の低い変異を見出すことが可能となる。

3. 研究の方法

今回の研究には、制限型食欲不振症の罹患者が存在する 1 家系を対象とした。非罹患の両親、制限型食欲不振症姉妹、ならびに非罹患の兄の合計 5 名 1 家族のゲノム DNA を用い、SureSelect Human All Exon 50 Mb Kit (Agilent)にてエクソン断片のキャプチャーならびに濃縮を行った。その後、Genome Analyzer Iix (Illumina)にてシーケンシングを実施した。

得られたシーケンシングデータは Fastx-toolkit version 0.0.13 (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)にての信頼性を評価し、UCSC Genome Browser hg19 に対して、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) version 0.5.9 を用いてアライメントを行った。最終的に Genome Analysis Toolkit (GATK, version 2.2-8)にて変異の検出を行い、ANNOVAR にて各変異に対して注釈づけを行った。

また見出された変異や対象とした遺伝子のシーケンシングは PCR で得られた産物に対する通常のサンガー法により決定した。

4. 研究成果

1 家族 5 個体のエクソームシーケンシングにより合計 30,465 個の変異が観察された。これらの内、日本人集団中極めて稀で、非罹患の兄に存在せず、罹患姉

妹で共有する、タンパクに変化をもたらせることが期待できる機能性変異を 26 個見出した。これらの中で、遺伝子の中で脳が主要な発現組織である神経伝達物質のレセプターをコードする遺伝子上にある機能性変異が含まれており、まずこの変異ならびに遺伝子に着目して解析を行った。この変異はヒトから魚類まで保存されているアミノ酸のコドン上にあり、遺伝子機能上極めて重要な変異であると推察された。さらに、この変異は、6 種の変異機能予測プログラム (SIFT, Polyphen2, PhyloP, MutationTaster, LRT, GERP++) のすべてが、遺伝子機能に影響を与えると予測する、候補 26 個のうち唯一の変異であった。一方、すでにこの遺伝子がコードするタンパクは結晶構造解析がなされており、立体構造が明らかになっている。この情報を参照すると、見出した変異は、その立体構造の維持に大きく寄与するアミノ酸のコドンに相当していた。さらにこのタンパクはホモならびにヘテロ二量体を形成して機能することが知られていることから、この変異がその相互作用に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、この遺伝子の 14 個の全エクソンを制限型食欲不振症の孤発症例 95 個体を対象に通常のサンガー法によりシーケンシングした結果、この変異とは異なる集団中で極めて稀な (健常者群でのアリル頻度 : 0.3%) 機能性変異を見出した。この変異も動物種を超えて高度に保存されている変異であった。

したがって、神経伝達物質のレセプターをコードするこの遺伝子上に、神経性食欲不振症の原因変異が蓄積されている

ことが示唆された。またこの遺伝子は 4 個の遺伝子ファミリーを形成しており、それぞれのタンパクは相互作用を示すことが知られていることから、今後は、これら全遺伝子について変異を探索する必要があると考えられた。

5. 発表論文

1. Boraska V, Franklin CS, Floyd JA, Thornton LM, Huckins LM, Southam L, Rayner NW, Tachmazidou I, Klump KL, Treasure J, Lewis CM, Schmidt U, Tozzi F, Kiezebrink K, Hebebrand J, Gorwood P, Adan RA, Kas MJ, Favaro A, Santonastaso P, Fernández-Aranda F, Gratacos M, Rybakowski F, Dmitrzak-Weglarz M, Kaprio J, Keski-Rahkonen A, Raevuori A, Van Furth EF, Slof-Op 't Landt MC, Hudson JI, Reichborn-Kjennerud T, Knudsen GP, Monteleone P, Kaplan AS, Karwautz A, Hakonarson H, Berrettini WH, Guo Y, Li D, Schork NJ, **Komaki G**, **Ando T**, Inoko H, et al. A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*. 査読有 doi: 10.1038/mp.2013.187. [Epub ahead of print]
2. Tateno Y, Komiyama T, Katoh T, Munkhbat B, **Oka A**, Haida Y, Kobayashi H, Tamiya G, Inoko H. Divergence of East Asians and Europeans estimated using male- and female-specific genetic markers. *Genome Biol Evol*. 査読有 2014 Mar;6(3):466-73. doi: 10.1093/gbe/evu027.
3. Ozaki Y, Suzuki S, Shigenari A, Okudaira Y, Kikkawa E, **Oka A**, Ota M, Mitsunaga S, Kulski JK, Inoko H, Shiina T. HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 genotyping at a super-high resolution level by long range PCR and high-throughput sequencing. *Tissue Antigens*. 査読有 2014 Jan;83(1):10-6. doi: 10.1111/tan.12258.
4. **Oka A**, Mabuchi T, Ikeda S, Terui T, Haida Y, Ozawa A, Yatsu K, Kulski JK, Inoko H. IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis. *Immunogenetics*. 査読有 2013 Nov;65(11):823-8. doi: 10.1007/s00251-013-0721-x.
5. Haida Y, Ikeda S, Takagi A, Komiyama E, Mabuchi T, Ozawa A, Kulski JK, Inoko H, **Oka A**. Association analysis of the HLA-C gene in Japanese alopecia areata. *Immunogenetics*. 査読有 2013 Jul;65(7):553-7. doi: 10.1007/s00251-013-0703-z.
6. Harkensee C, **Oka A**, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y; Japan Marrow Donor Programme (JMDP). Microsatellite scanning of the immunogenome associates MAPK14 and ELTD1 with graft-versus-host disease in

- hematopoietic stem cell transplantation. Immunogenetics. 査読有 2013 Jun;65(6):417-27. doi: 10.1007/s00251-013-0691-z.
7. Mitsunaga S, Shimizu S, Okudaira Y, **Oka A**, Tanaka M, Kimura M, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Improved loop-mediated isothermal amplification for HLA-DRB1 genotyping using RecA and a restriction enzyme for enhanced amplification specificity. Immunogenetics. 査読有 2013 Jun;65(6):405-15. doi: 10.1007/s00251-013-0690-0.
 8. Matsuzaka Y, Ohkubo T, Kikuti YY, Mizutani A, Tsuda M, Aoyama Y, Kakuta K, **Oka A**, Inoko H, Sakabe K, Ishikawa S, Kulski JK, Kimura M. Association of sick building syndrome with neuropathy target esterase (NTE) activity in Japanese. Environ Toxicol. 査読有 2013 Feb 18. doi: 10.1002/tox.21839.
 9. Shibata H, Yamamoto K, Sun Z, **Oka A**, Inoko H, Arinami T, Inada T, Ujike H, Itokawa M, Tochigi M, Watanabe Y, Someya T, Kunugi H, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Fukumaki Y. Psychiatr Genet. 査読有 2013 Jun;23(3):117-23. doi: 10.1097/YPG.0b013e32835fe4f1.
 10. Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, Taira H, Kikkawa E, Shigenari A, **Oka A**, Umemura T, Joshita S, Takahashi O, Hayashi Y, Paumen M, Katsuyama Y, Mitsunaga S, Ota M, Kulski JK, Inoko H. Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. Tissue Antigens. 査読有 2012 Oct;80(4):305-16. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01941.x.
 11. Meguro A, Ideta H, Ota M, Ito N, Ideta R, Yonemoto J, Takeuchi M, Uemoto R, Nishide T, Iijima Y, Kawagoe T, Okada E, Shiota T, Hagihara Y, Oka A, Inoko H, Mizuki N. Common variants in the COL4A4 gene confer susceptibility to lattice degeneration of the retina. PLoS One. 査読有 2012;7(6):e39300. doi: 10.1371/journal.pone.0039300.
 12. Harkensee C, **Oka A**, Onizuka M, Middleton PG, Inoko H, Hirayasu K, Kashiwase K, Yabe T, Nakaoka H, Gennery AR, Ando K, Morishima Y; Japan Marrow Donor Program. Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study. Blood. 査読有 2012 Jun 28;119(26):6365-72. doi: 10.1182/blood-2012-01-406785.
 13. Nakaoka H, Cui T, Tajima A, **Oka A**, Mitsunaga S, Kashiwase K, Homma Y, Sato S, Suzuki Y, Inoko H, Inoue I. A systems genetics approach provides a bridge from discovered genetic variants to biological

- pathways in rheumatoid arthritis. PLoS One. 査読有 2011;6(9):e25389. doi: 10.1371/journal.pone.0025389.
14. Hiruma A, Ikeda S, Terui T, Ozawa M, Hashimoto T, Yasumoto S, Nakayama J, Kubota Y, Iijima M, Sueki H, Matsumoto Y, Kato M, Akasaka E, Ikoma N, Mabuchi T, Tamiya S, Matsuyama T, Ozawa A, Inoko H, **Oka A**. A novel splicing variant of CADM2 as a protective transcript of psoriasis. Biochem Biophys Res Commun. 査読有 2011 Sep 9;412(4):626-32. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.013.
 15. Mitsunaga S, Okudaira Y, Kunii N, Cui T, Hosomichi K, **Oka A**, Suzuki Y, Homma Y, Sato S, Inoue I, Inoko H. Exact break point of a 50 kb deletion 8 kb centromeric of the HLA-A locus with HLA-A*24:02: the same deletion observed in other A*24 alleles and A*23:01 allele. Immunogenetics. 査読有 2011 Aug;63(8):467-74. doi: 10.1007/s00251-011-0521-0.
 16. Riveira-Munoz E, He SM, Escaramís G, Stuart PE, Hüffmeier U, Lee C, Kirby B, **Oka A**, Giardina E, Liao W, Bergboer J, Kainu K, de Cid R, Munkhbat B, Zeeuwen PL, Armour JA, Poon A, Mabuchi T, Ozawa A, Zawirska A, Burden AD, Barker JN, Capon F, Traupe H, Sun LD, Cui Y, Yin XY, Chen G, Lim HW, Nair RP, Voorhees JJ, Tejasvi T, Pujol R, Munkhtuvshin N, Fischer J, Kere J, Schalkwijk J, Bowcock A, Kwok PY, Novelli G, Inoko H, Ryan AW, Trembath RC, Reis A, Zhang XJ, Elder JT, Estivill X. Meta-analysis confirms the LCE3C_LCE3B deletion as a risk factor for psoriasis in several ethnic groups and finds interaction with HLA-Cw6. J Invest Dermatol. 査読有 2011 May;131(5):1105-9. doi: 10.1038/jid.2010.350.
 17. **Ando T**, Tamura N, Mera T, Morita C, Takei M, Nakamoto C, Koide M, Hotta M, Naruo T, Kawai K, Nakahara T, Yamaguchi C, Nagata T, Ookuma K, Okamoto Y, Yamanaka T, Kiriike N, Ichimaru Y, Ishikawa T, **Komaki G**, The Japanese Genetic Research Group For Eating Disorders. Association of the c.385C>A (p.Pro129Thr) polymorphism of the fatty acid amide hydrolase gene with anorexia nervosa in the Japanese population. Molecular Genetics & Genomic Medicine. 査読有 Article first published online 24 FEB 2014DOI: 10.1002/mgg3.69
 18. **安藤哲也**. 摂食障害と遺伝子 臨床精神医学 42(5): 609-620, 2013
 19. **安藤哲也**. 摂食障害研究の最近の動向 心身医学 54(2): 146-153, 2014