

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591669

研究課題名(和文)統合失調症多発罹患家系において見出された稀もしくは長大なコピー数多型の関連研究。

研究課題名(英文)Copy number variations and risk of schizophrenia: an analysis in a multiplex pedigree and a following case-control study

研究代表者

金子 尚史(Kaneko, Naoshi)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40515657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の発症に稀もしくは長大なコピー数多型(CNV)が関連していることが示唆されている。統合失調症多発罹患家系で見いだされた1q21.2(505 kb)と16q11.2(1,180 kb)の二つの500kbを超えるCNVについて、患者646人および対照674人からなる症例・対照サンプルにおいて関連を検討した。家系内では両者とも欠失(コピー数：1)が罹患者と非罹患者の両方に認められた。症例・対照サンプルでは両方のCNVでコピー数に有意差は見られなかった。また症例サンプルにおいてどちらも比較的頻度の高いCNVであった。今回解析した二つのCNVは統合失調症の発症に関連しないと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is a severe neuropsychiatric disorder with complex genetic etiology. Recent studies have revealed that rare or large (>500kb or >1Mb) copy number variations (CNVs) associated with schizophrenia. In a previous study, we have conducted a genome-wide CNV screening in a Japanese multiplex pedigree and have found two large (>500kb) CNVs (1q21.2; 505 kb and 16q11.2; 1,180 kb) in this pedigree. Here, we identified copy numbers of these two CNVs in the multiplex pedigree using real-time polymerase chain reaction method. We found deletions (one copy) of both CNVs in affected and unaffected individuals. Next, we assayed these CNVs in 646 schizophrenia individuals and 674 control individuals. However, there were no significant association between the CNVs and schizophrenia. Also these CNVs are common in our Japanese control samples.

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：統合失調症 コピー数多型 関連研究 多発罹患家系

1. 研究開始当初の背景

(1) 統合失調症の遺伝要因

統合失調症は、複数の遺伝的要因と環境的要因が相互に影響して発症する複雑疾患と考えられており、遺伝率が0.80、罹患者の同胞の相対罹患危険度sが10と遺伝的要因の関与が大きい (Cardno and Gottesman, 2000; Riley and Kendler, 2004)。

(2) 統合失調症とコピー数多型

近年 1kbp 以上の領域にわたる、遺伝子を含むコピー数の個体差であるコピー数多型 (copy number variation: CNV) と神経発達障害を含む多くの疾患との関連が報告されており、統合失調症との関連も注目されている (Cantor and Geschwind, 2008; Cook Jr and Scherer, 2008)。

統合失調症と CNV との関連については、1q21.1、3q29、15q11.2、15q13.3、16q2、17p12、22q11.2 の欠失や 16p13.1、16p11 の重複などいくつかの座位が指摘されている (Mulle et al, 2010, Glessner et al, 2010; Ikeda et al, 2010; Kirov et al, 2009; Need et al, 2009; International Schizophrenia Consortium (ISC), 2008; Shi et al, 2008; Stefansson et al, 2008; Walsh et al, 2008; Xu et al, 2008)。また、統合失調症罹患者における稀な CNV の頻度の増加 (ISC, 2008; Walsh et al, 2008)、長大な (>1Mb もしくは >500kb) CNV 頻度の増加 (Kirov et al, 2009; ISC, 2008) の報告がある。

(3) 多発罹患者家系の CNV 解析

われわれは、統合失調症多発罹患者家系におけるマイクロアレイを用いた CNV の網羅的検索によって、19q12 に罹患者 6 名中 5 名、罹患者状態不明 1 名中 1 名が完全欠失 (コピー数 0) している CNV を見出した。この CNV の領域は CNVR7606\_full (Conrad et al, 2010) の領域に一致していた。それ以外の領域では、CNV と疾患との連鎖は見られなかった。この CNV の頻度を症例 627 名と対照 620 名で比較したが、コピー数頻度およびコピー数 0 の頻度ともに両者で有意差は見られなかった。

一方で、CNVR7606\_full の解析の過程で、解析に用いたマイクロアレイによる CNV の検索ではコピー数の変化は検出できるものの、正確なコピー数が判定できない可能性があることが判明した。

そこで、家系内におけるコピー数の変化が見られた CNV のうち、稀もしくは長大な CNV について、リアルタイム PCR による CNV の範囲およびコピー数の確定を行い、それらの CNV の中で疾患と連鎖もしくは連鎖を示唆する CNV について、症例 対照研究を行う。さらに関連が見出された CNV 内に存在する疾患感受性候補遺伝子について、タグ SNP を用いた関連解析を行う。

2. 研究の目的

3. 研究の方法

(1) 倫理的配慮

本研究計画は新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会の承認を得ており、対象者には研究について十分な説明を行い書面による同意を得た。

(2) 対象

統合失調症多発罹患者家系内で DNA サンプルの収集が可能であったのは、15 人 (罹患者 6 人、非罹患者 8 人、罹患者状態不明者 1 人) である。

症例・対照サンプルは、患者 646 人および対照者 674 人からなる。

(3) CNV 解析

DNA マイクロアレイにより統合失調症多発罹患者家系で検出された 500 kb を超える長大な CNV は、1q21.2 (505 kb) と 16q11.2 (1,180 kb) である。これらの CNV について、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法によりコピー数を判定した (Watanabe et al., 2010)。なお各サンプルを 2 回アッセイし、結果が不一致だった場合には、さらに追加のアッセイを実施した。

統合失調症多発罹患者家系サンプルについては、1q21.2 と 16q11.2 の CNV 領域を可能な限りカバーできるよう、それぞれ 4 つ

(Hs03160707\_cn、Hs03160937\_cn、Hs03201894\_cn、Hs04205095\_cn) と 9 つ (Hs04453321\_cn、Hs03930434\_cn、Hs04458059\_cn、Hs03928963\_cn、Hs04456107\_cn、Hs04458754\_cn、Hs03945278\_cn、Hs03921771\_cn、Hs03940287\_cn) のプローブを用いてアッセイした。

症例・対照サンプルについては、1q21.2 と 16q11.2 の CNV を、それぞれ Hs03160707\_cn と Hs03940287\_cn を用いてアッセイした。

4. 研究成果

(1) 1q21.2

統合失調症多発罹患者家系サンプルについて、罹患者 6 人中 1 人、非罹患者 8 人中 3 人が欠失 (コピー数が 1) を保有していた。

症例・対照サンプルについては、統合失調症との有意な関連は認められなかった (表 1)。

表 1. 症例・対照サンプルにおける 1q21.2 のコピー数

サンプル	コピー数				
	0	1	2	3	4
症例	21	164	442	9	0
対照	15	196	441	15	1

(2) 16q11.2

統合失調症多発罹患者家系サンプルについて、罹患者 6 人中 2 人、非罹患者 8 人中 3 人が欠失 (コピー数が 1) を保有していた。

症例・対照サンプルについては、統合失調症との有意な関連は認められなかった(表2)。

表 2. 症例・対照サンプルにおける 16q11.2 のコピー数

サンプル	コピー数				
	1	2	3	4	5
症例	161	352	110	3	2
対照	122	467	73	4	1

### (3) 考察

統合失調症と CNV との関連が繰り返し報告されており、また統合失調症罹患患者において、稀もしくは長大な CNV 頻度の増加が指摘されている。近年においてもスウェーデン国内で収集された比較的均一な人口集団のサンプルで統合失調症罹患患者の1個体あたりの平均 CNV 数の増加、頻度の低い CNV および 500kb を超える CNV の増加が報告されている (Szatkiewicz et al, 2014)。頻度が低く相対危険度の高い CNV は多発罹患家系の発症に寄与している可能性が高いと考えられ、その多発罹患家系と同一国内で収集された比較的遺伝的異種性の低い日本人の症例・対照サンプルにおいても結果が再現できる可能性が高いと考えられた。本研究では、コピー数の精度を高めるために、すべてのサンプルにおいて2回の解析を行い、結果が一致しない場合には再度解析を行ってコピー数を決定した。

しかし、今回の研究で解析した 1q21.2 および 16q11.2 の領域に見いだされた2つの500kbを超えて CNV については、家系内において罹患患者と非罹患患者との間で分離しなかった。また症例・対照サンプルでは、対照群において2コピー以外のコピー数を有する割合が 34.0% および 30.0% と高く、また、症例群と対照群でコピー数に有意差は見られなかった。本研究で解析した多発罹患家系においては500kbを超えて CNV は統合失調症の発症に寄与しておらず、また家系内において見いだされた 1q21.2 および 16q11.2 の領域の CNV は日本人において普遍的な CNV であり、統合失調症の発症リスクには寄与していないと考えられた。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

Watanabe, Y., Hishimoto, A., Shibuya, M., Nunokawa, A., Kaneko, N., Igeta, Egawa, J., Mouri, K., Sora, I., Someya, T. A rare *MIR138-2* gene variation is associated with schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatry Research* 215: 801-802, 2014. doi: 10.1016/j.psychres.2013.12.029. 査読有  
Shibuya, M., Watanabe, Y., Nunokawa, A., Egawa, J., Kaneko, N., Igeta, H.,

Someya, T. Interleukin 1 beta gene and risk of schizophrenia: detailed case-control and family-based studies and an updated meta-analysis. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 29: 31-37, 2014. DOI: 10.1002/hup.2365. 査読有

Okazaki, S., Watanabe, Y., Hishimoto, A., Sasada, T., Mouri, K., Shiroya, K., Eguchi, N., Ratta-Apha, W., Otsuka, I., Nunokawa, A., Kaneko, N., Shibuya, M., Someya, T., Shirakawa, O., Sora, I. Association analysis of putative cis-acting polymorphisms of interleukin-19 gene with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 50: 151-156, 2014. doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.12.006. 査読有

Watanabe, Y., Iijima, Y., Egawa, J., Nunokawa, A., Kaneko, N., Arinami, T., Ujike, H., Inada, T., Iwata, N., Kunugi, H., Itokawa, M., Sasaki, T., Ozaki, N., Hashimoto, R., Shibuya, M., Igeta, H., Someya, T. Replication in a Japanese population that a *MIR30E* gene variation is associated with schizophrenia. *Schizophrenia Research* 150: 596-597, 2013. doi: 10.1016/j.schres.2013.08.028. 査読有  
Egawa, J., Nunokawa, A., Shibuya, M., Watanabe, Y., Kaneko, N., Igeta, H., Someya, T. Resequencing and association analysis of *MIR137* with schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 67: 277-279, 2013. doi: 10.1111/pcn.12047. 査読有

Watanabe, Y., Kaneko, N., Nunokawa, A., Shibuya, M., Egawa, J., Someya, T. Oxytocin receptor (*OXTR*) gene and risk of schizophrenia: Case-control and family-based analyses and meta-analysis in a Japanese population. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 66: 622, 2012. doi: 10.1111/j.1440-1819.2012.02396.x. 査読有

Watanabe, Y., Nunokawa, A., Kaneko, N., Shibuya, M., Egawa, J., Someya, T. Supportive evidence for the association between the Gln2Pro polymorphism in the *SIGMAR1* gene and schizophrenia in the Japanese population: A case-control study and an updated meta-analysis. *Schizophrenia Research* 141: 279-280, 2012. doi: 10.1016/j.schres.2012.06.043. 査読有  
Watanabe, Y., Nunokawa, A., Kaneko, N.,

Shibuya, M., Egawa, J., Fukui, N., Someya, T. Case-control study and meta-analysis of Ser311Cys polymorphism in the *DRD2* gene demonstrate lack of association with risk of for schizophrenia in the Japanese population. *Genetics and Molecular Research* 11: 1142-1145, 2012. DOI: 10.4238/2012.April.27.13. 査読有

Watanabe, Y., Egawa, J., Iijima, Y., Nunokawa, A., Kaneko, N., Shibuya, M., Arinami, T., Ujike, H., Inada, T., Iwata, N., Tochigi, M., Kunugi, H., Itokawa, M., Ozaki, N., Hashimoto, R., Someya, T. A two-stage case-control association study between the tryptophan hydroxylase 2 (*TPH2*) gene and schizophrenia in a Japanese population. *Schizophrenia Research* 137: 264-266, 2012. doi: 10.1016/j.schres.2012.01.034. 査読有

[学会発表](計5件)

<11th World Congress of Biological Psychiatry 2013.6.25. Kyoto> Watanabe Y, Nunokawa A, Kaneko N, Shibuya M, Egawa J, Someya T: Supportive evidence for the association between the Gln2Pro polymorphism in the sigma non-opioid intracellular receptor 1 gene and schizophrenia in the Japanese population.

<11th World Congress of Biological Psychiatry 2013.6.24. Kyoto> Nunokawa A, Watanabe Y, Egawa J, Kaneko N, Shibuya M, Someya T: Case-control association study between the tryptophan hydroxylase 2 (*TPH2*) gene and schizophrenia in a Japanese population.

<第34回日本生物学的精神医学会 2012.9.30.神戸> 井桁裕文, 渡部雄一郎, 金子尚史, 布川綾子, 澁谷雅子, 江川純, 染矢俊幸: オキシトシン受容体遺伝子と統合失調症の関連解析.

<11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry and 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry 2012.9.30-10.1. Kobe> Watanabe Y, Nunokawa A, Kaneko N, Shibuya M, Egawa J, Fukui N, Igeta H, Someya T: Case-control study and meta-analysis did not confirm an association between *DRD2* Ser311Cys and schizophrenia in the Japanese population.

<11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry and 55th Annual Meeting of the Japanese

Society for Neurochemistry 2012.9.30-10.1. Kobe> Nunokawa A, Watanabe Y, Kaneko N, Shibuya M, Igeta H, Someya T: A case-control study and meta-analysis of association between a common copy number variation of the glutathione S-transferase mu 1 (*GSTM1*) gene and schizophrenia.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 尚史 (KANeko, Naoshi)

新潟大学・医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号: 40515657