

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791203

研究課題名(和文) 統合失調症多発罹患家系の全エクソン解析に基づくリスク変異の同定

研究課題名(英文) Search for genetic variations conferring risk of schizophrenia by exome sequencing in a Japanese multiplex pedigree

研究代表者

布川 綾子 (NUNOKAWA, Ayako)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：90584607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の発症に大きな効果をもつ稀なリスク変異の同定を目指して、統合失調症多発罹患家系の全エクソン解析を実施した。統合失調症多発罹患家系内でDNAサンプルの収集が可能であった15人のなかで、罹患者2人と非罹患者1人について、全エクソン解析を行った。検出された302,005個の変異をフィルタリングし、機能的と予測された新規ミスセンス変異7個を候補リスク変異として選択した。直接シーケンシングにより存在が確認された4個の変異の中で、UNC13B遺伝子V1525M変異が、最も良く疾患と共分離していた。本研究により、UNC13B遺伝子V1525M変異は、統合失調症のリスク変異である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify rare penetrant risk variations for schizophrenia, we performed exome sequencing in a Japanese multiplex schizophrenia pedigree. We obtained DNA from six affected, eight unaffected and one unknown affection status individuals in the pedigree. A total of 302,005 sequence variations were called in the exome sequencing of two affected and one unaffected individuals. We selected seven putatively functional missense variations as candidate risk variations for schizophrenia. Among four variations confirmed by Sanger sequencing, V1525M variation in the UNC13B gene was most strongly cosegregated with schizophrenia in the pedigree. These results suggest that the UNC13B V1525M variation is a potential risk variant for schizophrenia.

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

1. 研究開始当初の背景

(1) common disease-common variant

(CD-CV) 仮説

統合失調症のようなありふれた疾患の感受性多型は、家系が異なっても共通しており、頻度は高く相対危険度は低いと考えられている。この CD-CV 仮説に基づいて大規模ゲノムワイド関連解析が実施され、いくつかの疾患感受性多型が同定されてきたが (Ripke et al., 2011)、統合失調症の遺伝要因の一部が明らかにされたにすぎない。

(2) common disease-rare variant

(CD-RV) 仮説

一方、コピー数多様性と統合失調症との関連が報告され (Stefansson et al., 2008)、頻度はまれだが相対危険度の高い変異がありふれた疾患の発症に寄与するという CD-RV 仮説が注目されるようになった。しかし、必ずしも十分な検証はなされておらず、さらなる研究が必要とされている。

(3) 統合失調症多発罹患大家系の連鎖解析

応募者らのグループは、統合失調症多発罹患大家系について、マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド連鎖解析を行い、2つの陽性領域 (3番染色体長腕および4番染色体長腕) を見出した (Kaneko et al., 2007)。陽性領域をさらに絞り込むため、高密度塩基多型アレイ (Illumina HumanOmni1-Quad BeadChip) によるタイピングを既に終えており、現在解析を行っている。

(4) 陽性領域内の候補遺伝子解析

陽性領域内の 3q13.3 に存在するドパミン D3 受容体遺伝子について、多発罹患大家系サンプルを用いたエクソン・シーケンスにより検索された変異を含め関連解析を行ったが、統合失調症との有意な関連は認められなかった (Nunokawa et al., 2010)。このような個々の候補遺伝子のエクソン・シーケンスでは統合失調症の発症に大きな効果をもつ頻度のまれなりスク変異を網羅的に探索することができないことから、ゲノム中のすべてのエクソンをシーケンスする全エクソン解析の実施が必要である。

(5) 全エクソン解析

最近では高速シーケンサーの実用化に伴い、全エクソン解析が実施されるようになり、統合失調症の発症に大きな効果をもつ頻度のまれなりスク変異の同定が可能となってきた。統合失調症の発症者と両親からなるトリオサンプルの全エクソン解析では、アミノ酸置換を伴う新生 (de novo) 変異が発症者で多く認められた (Girard et al., 2011; Xu et al., 2011)。しかし、統合失調症多発罹患大家系における全エクソン解析の報告はこれまでなされていない。

2. 研究の目的

統合失調症多発罹患大家系における全エクソン解析により、統合失調症の発症に大きな効果をもつ頻度のまれなりスク変異を同定することが、本研究の目的である。

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、罹患状態不明者1人) である。

(3) 全エクソン解析

罹患者2人 (-10 および -2) および非罹患者1人 (-1) の全エクソン解析をタカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンターで実施した。

具体的には、SureSelect Human All Exon V4 Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) を用いて作成したライブラリについて、HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) で1レーンのペアエンドシーケンスを行った。取得されたリードは Burrows-Wheeler Aligner v0.5.9

(<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) を用いてヒト参照ゲノム (UCSC hg19) にマップした。SAMtool v0.1.16

(<http://samtools.sourceforge.net/>) により検出された変異のアノテーションには、UCSC hg19 refGene. txt. gz および UCSC hg19 snp 135. txt. gz

(<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg19/database/>) を用いた。

(4) フィルタリング

第1に、dbSNP (135) に登録されている変異を除外した。第2に、非コード領域の変異と同義変異を除外した。第3に、罹患者2人 (-10 および -2) に共通して認められ非罹患者1人 (-1) には認められなかった変異を選択した。第4に、挿入と欠失を除外した。第5に、PolyPhen-2

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) により probably damaging と機能予測された変異を選択した。

(5) 直接シーケンス

フィルタリングにより選択された候補リスク変異について、15人の DNA サンプルを 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて直接シーケンスした。

4. 研究成果

(1) 全エクソン解析

3人で計302,00個の変異がコールされ、III-10は172,921個、IV-1は181,410個、IV-2は166,943個であった。

(2) フィルタリング

第1に、dbSNP (135) に登録されている変異を除外した(残58,172個)。第2に、非コード領域の変異と同義変異を除外した(残1,793個)。第3に、罹患者2人(-10および-2)に共通して認められ、非罹患者1人(-1)には認められなかった変異を選択した(残62個)。第4に、挿入と欠失を除外した(残19個)。第5に、PolyPhen-2によりprobably damagingと機能予測された変異を選択した(残7個)。

(3) 直接シーケンス

これら7個の新規ミスセンス変異を家系内の15人で直接シーケンスしたところ、4個は存在が確認された。すなわち、*CD28* (CD28 molecule) 遺伝子 R219C 変異、*SNTA1* (syntrophin, alpha 1) 遺伝子 R500C 変異、*UNC13B* (unc-13 homolog B (C. elegans)) 遺伝子 V1525M 変異、*GRAMD2* (GRAM domain containing 2) 遺伝子 E297Q 変異である。

これら4個の新規ミスセンス変異の中で、*UNC13B* 遺伝子 V1525M 変異は、罹患者6人中5人に認められた一方、非罹患者8人と罹患状態不明者1人には認められず、最も良く疾患と共分離していた。

(4) 考察

本研究では、統合失調症多発罹患者家系の全エクソン解析に基づいて選択された新規ミスセンス変異の中で、*UNC13B* 遺伝子 V1525M 変異が疾患とほぼ共分離していた。したがって、*UNC13B* 遺伝子 V1525M 変異は、統合失調症の有力な候補リスク変異であることが示された。

UNC13B 遺伝子がコードする Munc-2 は、前シナプスにおける神経伝達物質の開口放出に関与している (Südhof, 2012)。V1525M 変異は、in silico 解析により機能的変異と予測されており、この変異が、シナプス伝達に障害を惹き起こすことによって、統合失調症の発症に大きな効果をもつ可能性を示唆している。

UNC13B 遺伝子内の異なる変異も統合失調症の発症に寄与するアレル異質性の可能性があるため、統合失調症発症者100サンプルについて、*UNC13B* 遺伝子のタンパク質コード領域のリシーケンスを進めている。

興味深いことに、自閉症スペクトラム障害 (Autism Spectrum Disorders, ASD) の全エクソン解析では、*UNC13B* 遺伝子の異なる新規ミスセンス変異 (S590R) が候補リスク変異として報告されている (Bi et al., 2012)。*UNC13B* 遺伝子の V1525M 変異と S590R 変異は、

それぞれ統合失調症と ASD に固有のリスク変異なのか、あるいは共通のリスク変異なのかを、大規模関連解析で検証する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12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。

Liu, J., Numata, S., Ikeda, M., Watanabe, Y., Zheng, X., Luo, X., Kinoshita, M., Nunokawa, A., Someya, T., Ohmori, T., Bei, J., Chong, S., Lee, J., Li, Z., Liu, J., Iwata, N., Shi, Y., *Li, M., *Su, B. An evaluation of association between a novel hippocampal biology related SNP (rs7294919) and schizophrenia. *PLoS One* 8: e80696, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0080696. 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。
Ikeda, M., Aleksic, B., Yamada, K., Iwayama-Shigeno, Y., Matsuo, K., Numata, S., Watanabe, Y., Ohnuma, T., Kaneko, T., Fukuo, Y., Okochi, T., Toyota, T., Hattori, E., Shimodera, S., Itakura, M., Nunokawa, A., Shibata, N., Tanaka, H., Yoneda, H., Arai, H., Someya, T., Ohmori, T., Yoshikawa, T., Ozaki, N., *Iwata, N. Genetic evidence for association between NOTCH4 and schizophrenia supported by a GWAS follow-up study in a Japanese population. *Molecular Psychiatry* 18: 636-638, 2013. doi: 10.1038/mp.2012.74. 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., Nunokawa, A., Someya, T. Association of the *BDNF* C270T polymorphism with schizophrenia: Updated meta-analysis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 67: 123-125, 2013. doi: 10.1111/pcn.12018. 査読有。
*Watanabe, Y., Kaneko, N., Nunokawa, A., Shibuya, M., Egawa, J., Someya, T. Oxytocin receptor (*OXR*) 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 2013.6.24. 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.

<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 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.

<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.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布川 綾子 (NUNOKAWA, Ayako)

新潟大学・医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：90584607