

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461724

研究課題名(和文) 統合失調症罹患同胞対・両親の全エクソン解析に基づく稀なリスク変異の同定

研究課題名(英文) Whole-exome sequencing in three families with affected siblings

## 研究代表者

渡部 雄一郎 (Watanabe, Yuichiro)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：90401744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000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を同定することが、本研究計画の目的である。統合失調症罹患同胞対・両親3家系の全エクソン解析を実施し、各家系内で罹患同胞2人が共有する稀な短縮型(ナンセンスまたはフレームシフト)変異を15個同定した。3つの症例・対照サンプル(症例2617・対照2396)を用いた3段階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。統合失調症罹患同胞対・両親3家系の全エクソン解析により同定された稀な短縮型変異が統合失調症の発症に関与している可能性は支持されなかった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of rare inherited variations, we performed whole-exome sequencing (WES) in three families, each with two affected siblings. We also performed a three-stage follow-up case-control study in a Japanese population with a total of 2617 patients and 2396 controls. WES identified 15 rare truncating variations that were variously present in the two affected siblings in each family. In the follow-up study, four variations (NWD1 W169X, LCORL R7fsX53, CAMK2B L497fsX497, and C9orf89 Q102X) had a higher mutant allele frequency in patients compared with controls, although these associations were not significant in the combined population, which comprised the first-, second- and third-stage populations. These results do not support a contribution of the rare truncating variations identified in the three families to the genetic etiology of schizophrenia.

研究分野：精神医学

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 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 Common Disease-Common Variant 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 (Ripke et al., 2011)。日本でもゲノムワイド関連解析のフォローアップ解析によりゲノムワイド有意な関連を示す多型が同定され、これにわれわれも貢献した (Ikeda et al., 2012)。しかし、ゲノムワイド関連解析では統合失調症の遺伝要因の一部が明らかにされたにすぎず、その理由の1つとして稀な変異をカバーしていないためだと考えられている (Lee et al., 2012)。

## (2) Common Disease-Rare Variant 仮説

一方、頻度は稀だが相対危険度の高い突然変異が、ありふれた疾患の発症に寄与するという Common Disease-Rare Variant 仮説の検証は必ずしも十分になされていないが、高速シーケンサーの登場により、近年ではゲノム中のすべてのエクソンを網羅的にシーケンスする全エクソン解析の実施が可能となり、統合失調症の稀なリスク変異の探索が進められつつある。孤発例の発端者・両親トリオの全エクソン解析では、発端者においてアミノ酸置換を伴う新生 (de novo) 変異が期待値よりも多く認められた (Girard et al., 2011; Xu et al., 2012)。一方、治療抵抗性あるいは家族歴のある患者 166 人の全エクソン解析により選択された 5,155 変異の症例・対照研究 (2,617 対 1,800) では有意な関連は認められなかった (Need et al., 2012)。

## 2. 研究の目的

統合失調症の発症に大きな効果をもつ稀なリスク変異を同定することが本研究の目的である。複数の罹患者がいる家系には統合失調症の発症に大きな効果をもつ稀なリスク変異が存在する可能性が高く、このような家系を対象とした全エクソン解析により稀な候補リスク変異を同定する。症例・対照サンプルを用いた関連解析により、全エクソン解析で見出された稀な変異が統合失調症の発症リスクに大きな効果を有していることを確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) 倫理的配慮

本研究計画は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守し、新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会および各共同研究機関の倫理委員会で承認されている。対象者に対して文書を用いて研究計画の内容などについて十分な説明を行い、書面にて研究参加の同意を得た。

### (2) 対象者

#### 全エクソン解析

統合失調症罹患同胞対・両親 3 家系である。家系#1:3 人同胞の第 2 子である発端者は、統合失調症と診断されている女性である。その弟は統合失調症および軽度精神遅滞と診断され、知能指数は 54 である。両親と姉は精神疾患を有していない。

家系#2:3 人同胞の第 1 子である発端者は、統合失調症と診断されている男性である。末弟も統合失調症と診断されている。長弟の罹患状態は不明であるが、自殺している。両親は精神疾患を有していない。

家系#3:3 人同胞の第 2 子である発端者は、統合失調症と診断されている女性である。その妹は統合失調症および軽度精神遅滞と診断され、知能指数は 60 である。兄はてんかんと診断され、知能指数は測定されていないが精神遅滞を有していると推定されている。父は精神疾患を有していないが、母は双極性障害を有していると推定されている。

#### 3 段階関連解析

DSM-IV により統合失調症と診断された統合失調症患者 2617 人および対照者 2396 人である。

1 次サンプル: 患者 674 人 (男性 361 人・女性 313 人、平均年齢  $39.9 \pm 13.8$  歳) および対照者 667 人 (男性 341 人・女性 326 人、平均年齢  $38.3 \pm 10.8$  歳) である。

2 次サンプル: 患者 731 人 (男性 377 人・女性 354 人、平均年齢  $53.0 \pm 14.9$  歳) および対照者 777 人 (男性 364 人・女性 413 人、平均年齢  $53.9 \pm 18.5$  歳) である。

3 次サンプル: 患者 1212 人 (男性 627 人・女性 585 人、平均年齢  $46.0 \pm 12.9$  歳) および対照者 952 人 (男性 364 人・女性 413 人、平均年齢  $42.1 \pm 12.9$  歳) である。

### (3) 全エクソン解析

統合失調症罹患同胞対・両親 3 家系の計 12 人を対象として全エクソン解析を実施した。SureSelect Human All Exon v4 または v5 キットにより全エクソンを濃縮した後に、タグ配列を付加した上で、高速シーケンサー (Illumina HiSeq2000) を用いて、100 塩基対のペアエンド・シーケンスを行った。シーケンスリードは、Burrows-Wheeler Aligner v0.5.9 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) を用いて、ヒト参照ゲノム (UCSC hg19) にマッピングした。PCR 重複は Picard v1.78 (<http://picard.sourceforge.net/>) を用いて除去した。変異は、SAMtool v0.1.18 (<http://samtools.sourceforge.net/>) を用いてコールし、Snpeff v3.0f (<http://snpeff.sourceforge.net/>) を用いてアノテーションした。

以下のフィルタリングにより候補リスク変異を選択した。第 1 にカバーリードが 10 未満の変異を除外した。第 2 に各家系におい

て罹患同胞対が共有している変異を選択した。第3に優性または劣性モデルで伝達されている変異を選択した。第4に短縮型(ナンセンスおよびフレームシフト)変異を選択した。第5に Human Genetic Variation Database v1.41

( <http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/> ) または Ensembl Genome Browser ( <http://asia.ensembl.org/index.html> ) の 1000 ゲノム日本人データベースにおけるアレル頻度 < 0.01 の稀な変異を選択した。

選択された変異については、サンガーシーケンス法により、全エクソン解析データの確認を行った。

#### (4) 3段階関連解析

統合失調症罹患同胞対・両親3家系の全エクソン解析で同定された稀な候補リスク変異が、特定の家系のみでなく一般に統合失調症の発症リスクに大きな効果を有していることを確認するため、3つの症例・対照サンプル(症例 2617・対照 2396)を用いた3段階関連解析を行った。全エクソン解析により同定された15個の短縮型変異のなかで、13個が1次サンプルでTaqMan法によるタイピングが可能だった。1次サンプルで症例群に多く認められた4個の変異を2次サンプルでタイピングした。2次サンプルで症例群に多く認められた4個の変異を3次サンプルでタイピングした。

### 4. 研究成果

#### (1) 全エクソン解析

家系#1、家系#2、家系#3において、それぞれ約 51.1、51.1、50.3 Mb の標的領域がシーケンスされた。平均リード数は 69.4 ~ 107.1 であり、標的領域の 96.7 ~ 99.3% がリード数 10 以上でカバーされた。

家系#1、家系#2、家系#3において、それぞれ 155,642 個、163,966 個、171,889 個の変異が検出された(表1)。フィルタリングにより、家系#1、家系#2、家系#3において、それぞれ 4 個、2 個、10 個、計 16 個の候補リスク変異が選択された。

表1. フィルタリング

	家系#1	家系#2	家系#3
検出	155,642	163,966	171,889
カバーリード	97,262	106,854	117,178
罹患同胞対	43,948	49,568	55,912
伝達	7,604	9,745	11,211
優性	7,001	8,918	10,461
劣性	603	827	750
短縮型	17	21	27
ナンセンス	6	7	10
フレームシフト	11	14	17
稀	4	2	10

これら 16 個の変異のうち、15 個はサンガー

シーケンスにより確認された(表2)。

表2. 稀な短縮型変異

家系#	遺伝子	タンパク質
1	XKR9	Q183X
1	DNAAF2	P196fsX214
1	FA2H	R189X
1	NWD1	W169X
2	MYH8	L1294fsX1294
2	NCCRP1	E169fsX271
3	LCORL	R7fsX53
3	CAMK2B	L497fsX497
3	SRRM3	L70fsX73
3	OSGIN2	F539fsX547
3	C9orf89	Q102X
3	NAALAD2	S605fsX611
3	BCDIN3D	Q266X
3	ASCL4	Y15X
3	DPH1	E97fsX104

#### (2) 3段階関連解析

全エクソン解析により同定された15個の短縮型変異のなかで、13個が1次サンプルでTaqMan法によるタイピングが可能だった(表3)。症例群で多く認められた変異は4個(NWD1 遺伝子 W169X 変異、LCORL 遺伝子 R7fsX53 変異、CAMK2B 遺伝子 L497fsX497 変異、C9orf89 遺伝子 Q102X 変異)であった。

表3. 1次サンプル

変異	オッズ比
XKR9 遺伝子 Q183X 変異	0.77
DNAAF2 遺伝子 P196fsX214 変異	-
FA2H 遺伝子 R189X 変異	-
NWD1 遺伝子 W169X 変異	3.97
MYH8 遺伝子 L1294fsX1294 変異	0.99
LCORL 遺伝子 R7fsX53 変異	-
CAMK2B 遺伝子 L497fsX497 変異	2.48
SRRM3 遺伝子 L70fsX73 変異	-
C9orf89 遺伝子 Q102X 変異	-
NAALAD2 遺伝子 S605fsX611 変異	-
BCDIN3D 遺伝子 Q266X 変異	-
ASCL4 遺伝子 Y15X 変異	-
DPH1 遺伝子 E97fsX104 変異	0.99

1次サンプルで症例群に多く認められた4個の変異を2次サンプルでタイピングしたところ、いずれも症例群に多く認められた(表4)。これら4個の変異を3次サンプルでタイピングした。しかし、統合失調症との関連は全サンプルにおいても有意ではなかった。

表4. 全サンプル

	オッズ比	95%信頼区間
NWD1 遺伝子 W169X 変異		
1次	3.97	0.44-35.5
2次	2.13	0.39-11.6
3次	1.97	0.38-10.1

全	2.38	0.85-6.69
LCORL 遺伝子 R7fsX53 変異		
1 次	-	-
2 次	3.19	0.33-30.7
3 次	-	-
全	3.67	0.41-32.9
CAMK2B 遺 伝 子 L497fsX497 変異		
1 次	2.48	0.48-12.8
2 次	2.13	0.39-11.6
3 次	0.40	0.04-4.42
全	1.54	0.56-4.25
C9orf89 遺伝子 Q102X 変異		
1 次	-	-
2 次	3.19	0.33-30.7
3 次	1.18	0.20-7.06
全	2.44	0.65-9.22

### (3) 考察

#### CAMK2B 遺伝子

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMKII) は、シナプス可塑性において重要な役割を果たしている (Hell, 2014; Robison, 2014)。死後脳研究では、統合失調症患者の前頭前皮質における CAMK2B mRNA の増加が報告されている (Novak et al., 2006)。Camk2b ノックアウトマウスは、協調運動障害、不安関連行動の減少などを示す (van Woerden et al., 2009; Borgesius et al., 2011; Bachstetter et al., 2014)。これらは必ずしも統合失調症様の行動障害とは言えないが、CAMK2B 発現の上昇と低下のいずれもが統合失調症の病態に関与しているかもしれない。

#### NWD1 遺伝子、LCORL 遺伝子、C9orf89 遺伝子

NWD1 mRNA およびタンパク質濃度は前立腺がんの進行度と関連していた (Correa et al., 2014)。LCORL 遺伝子は精子形成に関与していることが示唆されている (Kunieda et al., 2003)。ゲノムワイド関連解析により、LCORL 遺伝子は成人の身長と関連していることが示された (Okada et al., 2010)。C9orf89 遺伝子がコードする BinCARD は、Bcl10 誘発性の NF- $\kappa$ B 活性化と Bcl10 リン酸化を阻害した (Woo et al., 2004)。しかし、脳内における NWD1、LCORL、BinCARD の機能は不明である。

#### 本研究の限界

3 段階関連解析のサンプル数 (症例 2617・対照 2396) は比較的大きいが、稀な変異と統合失調症との関連を検出するには不十分かもしれない。

### (4) 結論

統合失調症罹患同胞対・両親 3 家系の全エクソン解析により同定された稀な短縮型変異が統合失調症の発症に関与している可

能性は支持されなかった。

### 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)

Watanabe Y, Nunokawa A, Shibuya M, Ikeda M, Hishimoto A, Kondo K, Egawa J, Kaneko N, Muratake T, Saito T, Okazaki S, Shimasaki A, Igeta H, Inoue E, Hoya S, Sugai T, Sora I, Iwata N, Someya T. Rare truncating variations and risk of schizophrenia: Whole-exome sequencing in three families with affected siblings and a three-stage follow-up study in a Japanese population. *Psychiatry Res.* 2016 30;235:13-8. doi: 10.1016/j.psychres.2015.12.011. PubMed PMID: 26706132. 査読あり

#### [学会発表](計 0 件)

#### [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

渡部 雄一郎 (WATANABE, Yuichiro)  
新潟大学・医歯学総合病院・特任教授  
研究者番号: 90401744

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

#### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: