

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870519

研究課題名(和文)全ゲノムシーケンスを用いた統合失調症一卵性双生児不一致例のゲノム解析

研究課題名(英文) Exome sequencing for monozygotic twins discordant for neuropsychiatric conditions.

研究代表者

小野 慎治 (ONO, Shinji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：70418820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症および自閉症スペクトラム障害一卵性双生児不一致例において、それらの相違箇所を全エクソームシーケンスで検出することで疾患原因遺伝子を同定しようとした。今回我々は自閉症スペクトラム障害と統合失調症一卵性双生児不一致例合わせて5ペアを解析し、それぞれのペア間で相違点を検出し潜在的候補遺伝子を同定することが出来た。しかしながら、これら潜在的候補遺伝子が実際に疾患の発症に関与しているかどうかは不明な点が残っており、今後エクソーム解析に用いた検体と他の多数の罹患者検体を用いて検証を行っていく。

研究成果の概要(英文)：To identify candidate genes for psychiatric conditions such as schizophrenia and autism spectrum disorder, we performed exome sequencing in 5 pairs of monozygotic twins discordant for schizophrenia and autism spectrum disorder. Several potential candidate genes for psychiatric conditions were emerged from the results of exome sequencing, however, we haven't validated those results using Sanger sequencing or any other methods. So it is still unclear whether these potential candidates could involve the development of psychiatric conditions. In the near future, we will validate our results of exome sequencing.

研究分野：精神分子遺伝学

キーワード：臨床精神分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や自閉症に代表される神経発達障害は疾患罹患率が高く common disease の側面がありながら、罹患してからの社会生活が困難となることや、生殖適正年齢に既に発症している例が多いことなどから、労働力の低下や出生率の低下に関与するなどの理由から社会的にも大きな問題となる疾患である。疾患原因因子として環境要因の他、遺伝的関与が寄与する割合が大きい疾患であることは、家系内発症例が多いことや双生児研究、養子研究などから明らかであるものの、明確な原因については未だ不明な点が多い。近年、統合失調症の遺伝解析が全世界で様々な解析方法で行われており、その結果、common disease でありながら common variant を持っている訳ではなく、多くの rare variants が疾患の原因になっていることが解明されつつある。実際にスコットランドの多発家系で同定された Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) 遺伝子はその遺伝子の機能から統合失調症の病態解明に大きな一助を与えている。

最近の報告では、自閉症、統合失調症、双極性障害などの神経発達障害群は临床上異なる特徴をもつ疾患であるが、原因遺伝子はオーバーラップしているものも多く、同じ病態を持つ可能性も示唆されている。遺伝解析によって疾患の原因を求めることは、神経発達障害の病態解明、ひいてはその病態から導かれる治療法の開発にもつながり、古典的な薬物療法や対症療法が中心の現在の神経発達障害の治療に道筋を与えることが期待される。

2. 研究の目的

統合失調症および自閉症一卵性双生児不一致例において、それぞれの双生児間ゲノムを比較する。ommon disease multiple rare variants 説に基づいて、共通する variants を抽出する作業は行わず、それぞれの双生児間で異なる塩基置換があれば、それらを候補遺伝子としてみなす。双生児間のゲノム差異を検出する方法として今回は全エクソンシーケンスを行う。その結果、候補遺伝子が明らかになれば、将来的にはその遺伝子機能が神経の分化や伸長、神経の保護にどのように作用しているかを解析することによって、これまで分からなかった治療の標的を同定することが可能となると考えている。

3. 研究の方法

統合失調症および自閉症一卵性双生児不一致例を複数ペア収集し、罹患者、非罹患者それぞれから末梢血を 7~10ml 採取し、DNA を抽出する。健常両親の血液採取が可能であれば、両親からも血液を採取し同様に DNA を抽出する。抽出された DNA を用いて大規模並列シーケンスを行う。得られた情報を双生児間、もしくは両親と双生児罹患者で比較し候補

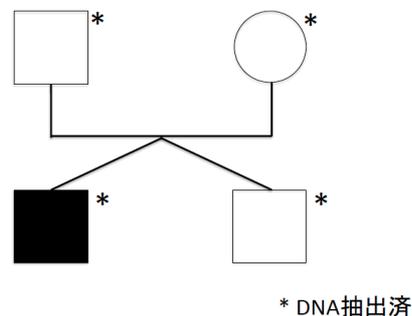
遺伝子を検出する。これらが実際に正しい結果なのかどうか確認を行う必要があるが、これまで確認の方法として直接シーケンスを行うのが常だったが、この方法では完全にヘテロとなっているものしか検出出来ないため、今回は直接シーケンス法に加えて他の方法でも確認作業を行っていく。

4. 研究成果

当初の予定としては、統合失調症一卵性双生児不一致ペアの全ゲノム解析を行うことであったが、複数ペアの全エクソン解析に変更した。その理由として、第一に現在の解析技術では膨大な偽陽性塩基置換が検出されることが明らかであり、全ゲノム解析から検出された不一致双生児ペア間での相違点を他の方法で確認することはコスト面で超過してしまうこと。第二に、これまで全エクソンシーケンスでのデータを確認するために直接シーケンス法による検証を行っていたが、方法を追加する必要があることを認識したためであった。次世代シーケンサーで得られた結果を検証するためこれまで我々が行っていたキャピラリーシーケンサーは視覚的判断を必要とし、定量性には適さない可能性がある。我々が過去に行っていた統合失調症ではないが他の精神疾患の一卵性双生児不一致ペアにおける全エクソン解析において複数の相違箇所を同定したが、いずれも depth は 100 前後であり、100 のうち 10%前後で異なる塩基が示されていた。これら相違箇所は全てキャピラリーシーケンスで検証したが、どの相違箇所もキャピラリーシーケンスでは相違点は確認出来ず、双生児間で一致するという結果となっていた。それらの理由により今回は統合失調症一卵性双生児不一致ペア 4 組と自閉症スペクトラム障害一卵性双生児不一致例ペアおよびその両親について全エクソン解析を行った。

- (1) 自閉症スペクトラム障害一卵性双生児不一致例ペアおよびその両親の解析

図 1 解析を行った家系図



解析方法として、健常両親の検体があったた

め(図1)、健常両親と罹患者を比較し、de novo 変異をまず検出した(図2)。それら相違箇所が非罹患者双生児にもみられるかどうか確認した。

図2 解析の戦略

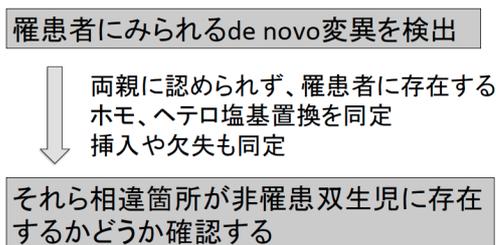


図3 全エキソン解析の結果

遺伝子名	場所	種類	検体
遺伝子1	chr1:266xxxx	ヘテロ変異	罹患者のみ
遺伝子2	chr1:460xxxx	ヘテロ変異	罹患者のみ
遺伝子3	chr7:168xxxx	欠失	罹患者のみ
遺伝子4	chr10:963xxxx	ヘテロ変異	罹患者のみ
遺伝子5	chr10:126xxxxx7	ヘテロ変異	双生児間で一致
	chr10:126xxxxx3	欠失	双生児間で一致
	chr10:126xxxxx9	ヘテロ変異	罹患者のみ
遺伝子6	chr14:68xxxx3	ヘテロ変異	罹患者のみ
	chr14:68xxxx7	ヘテロ変異	罹患者のみ

全エキソン解析の結果から6つの候補遺伝子が浮かび上がった(図3)。遺伝子5と6はコンパウンドヘテロ変異の可能性もあり、これら2つの遺伝子はより候補としての可能性が高いと考えている。いずれにせよ、これら結果は前述したように他の方法での検証が必要であるが今年度中は実現出来なかった。

以下は統合失調症一卵性双生児不一致ペアに関する結果である。いずれの双生児も10年以上の不一致歴があり、単に発症時期がずれているだけではないということが分かっている。

(2) 統合失調症一卵性双生児不一致例ペア1 両親の検体が得られず、双生児間を比較した。35箇所25遺伝子に双生児間相違箇所が検出された。内訳としては挿入8、欠失8、一塩基置換が19箇所であった。

(3) 統合失調症一卵性双生児不一致例ペア2 63箇所29遺伝子に双生児間相違箇所が検出された。CACNA1B 遺伝子というこれまで統合失調症をはじめ、双極性障害でも原因遺伝子として知られている遺伝子内に相違箇所が認められた。内訳としては挿入13、欠失7、一塩基置換が43箇所であった。

(4) 統合失調症一卵性双生児不一致例ペア3 21箇所19遺伝子に双生児間相違箇所が検出された。内訳としては挿入6、欠失2、一塩基置換が13箇所であった。

(5) 統合失調症一卵性双生児不一致例ペア4 29箇所20遺伝子に双生児間相違箇所が検出された。内訳としては挿入6、欠失3、一塩基置換が20箇所であった。

これらの相違箇所はすべて偽陽性かどうかの検証をしておらず、今後行っていく必要があるが、今年度中は実現が適わなかった。また、並行して両親の検体を収集し解析することで候補領域を絞ることが出来るため、可能であれば両親の検体収集に努める。検証の結果、実際に相違箇所がみられたとして、それが病因としての意義をもつかどうかは更なる検証が必要であり、数百単位の罹患者検体を用いて検証した遺伝子内に同一もしくは他の箇所の塩基置換があるかどうかの検証をおこなうとともに、培養細胞に変異を導入し神経分化や伸長に関するタンパク質ネットワークに関する機能解析を行って蓋然性を検証していき、統合失調症発症にどのように関与しているのか調べていく予定である。

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4件)

1. Ono S, Domschke K, Deckert J. Genomic structural variation in affective, anxiety, and stress-related disorders. *J Neural Transm*. 2015 Jan;122(1):69-78.

doi:10.1007/s00702-014-1309-9. (査読あり)

2. Uhal BD, Nguyen H, Dang M, Gopallawa I, Jiang J, Dang V, Ono S, Morimoto K. Abrogation of ER stress-induced apoptosis of alveolar epithelial cells by angiotensin 1-7. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Jul 1;305(1):L33-41. doi:10.1152/ajplung.00001.2013. (査読あり)

3. 黒滝直弘, 小野慎治, 杉本流, 今村明, 木下裕久, 小澤寛樹. 家系内発症例の解析による統合失調症の異種性について. *臨床精神病理* 34(1):128-129. 2013. (査読なし)

4. 黒滝直弘, 小野慎治, 小澤寛樹, 吉浦孝一郎. 発作性運動誘発性舞踏アテトーゼの分子メカニズム. *神経内科* 79(6):719-725. 2013. (査読なし)

[学会発表](計1件)

森本芳郎, 小野慎治, 森貴俊, 黒滝直弘, 吉浦孝一郎, 小澤寛樹. Panic 障害多発家系

例に対する Exome 解析. 第 59 回日本人類遺
伝学会. 2014 年 11 月 21 日. タワーホール船
堀. 東京都, 江戸川区

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 慎治 (ONO Shinji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・
助教

研究者番号 : 70418820