

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461721

研究課題名(和文) ARMSと発達障害特性を中間表現型とした統合失調症大家系の遺伝子解析

研究課題名(英文) Genetic analysis of a large family with schizophrenia adopting ARMS and developmental disorder traits as intermediate phenotypes

研究代表者

今村 明 (IMAMURA, Akira)

長崎大学・病院(医学系)・教授

研究者番号：40325642

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)：本研究で我々は、統合失調症のrare-risk variantを同定することを目標として、統合失調症の多発大家系を対象として、遺伝学的解析を行った。統合失調症多発大家系に属する10名に全エクソン解析を行った。同定された2つの候補遺伝子に関して、統合失調症288名、健常者419名のtarget sequencingを行った。その結果、候補遺伝子はGene Aだけに絞られた。Crispr-cas9にて作成した遺伝子改変マウス(Gene Aのノックインマウス)の行動解析を行った。行動解析の結果、遺伝子改変マウスは活動性が低いまたは運動機能が減衰している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：With the purpose of identifying rare risk variants for schizophrenia, we conducted a genetic analysis of a large family including many individuals with schizophrenia. Whole-exome analysis was performed in 10 individuals from this family. Target sequencing of two identified candidate genes was also performed in 288 individuals with schizophrenia and 419 healthy controls, narrowing the candidate gene pool to only gene A. In a behavioral analysis conducted using Gene A knock-in mice created using Crispr-cas9 technology, the genetically modified mice exhibited decreased activity or attenuated motor function.

研究分野：精神科遺伝学

キーワード：統合失調症 大家系 ARMS 発達障害 自閉スペクトラム症

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は幻覚・妄想等の陽性症状や無意・自閉等の陰性症状を呈し、慢性に経過する精神疾患である。人口の約1%が罹患すると報告されている common な疾患であるにも関わらず、その病態生理に関しては依然として不明である。複数の双子研究や家族研究から、統合失調症の発症への遺伝的リスクの重要性が示唆されている。統合失調症を含む精神疾患は一般的に多因子疾患と考えられており、

Genome-wide-association-study (GWAS) による統合失調症の common risk loci が相次いで報告されている。一方で、次世代型シーケンサーによる遺伝子解析は疾患の罹患リスクを大幅に上昇させる rare-risk variants の同定の有効な method となりうるが、統合失調症における rare-risk variants を同定したという報告は少ない。本研究では、統合失調症の多発家系を次世代型シーケンサーを用いて遺伝学的解析を行い、統合失調症の rare-risk variant を同定することを目指した。

### 2. 研究の目的

統合失調症多発家系に関して次世代型シーケンサーを用いて遺伝学的解析を行い、統合失調症の病態に寄与する rare-risk variant を同定する。

### 3. 研究の方法

#### (検体収集)

統合失調症多発家系から 10 名の採血を行なった(Figure1a)。また、統合失調症患者 288 名、健常者 419 名から採血を行い、QIAamp DNA Midi kit を用いて DNA を抽出した。研究参加者には主治医以外の医師が研究説明を行い、書面にてインフォームドコンセントをえた。検体収集においては長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認をえた。

#### (全エクソン解析)

統合失調症多発家系の 10 名の全エクソン解析を行った。Agilent SureSelect Exome Target Enrichment System v5 を用いてライブラリを作成し、HiSeq 2500 (Illumina) にて解析した。Genome Analysis Toolkit (GATK) を用いてアラインメントを行い、GATK Haplotype Caller を用いて SNV/indel の検出を行った。検出された SNV/indel に関して ANNOVAR software を用いてアノテーションを行い、候補変異の選定を行った。

#### (多検体解析)

多発家系より同定された候補遺伝子に関して、統合失調症：288 名、健常者 419 名の target sequencing を行った。SeqCap EZ

Library SR にてライブラリ作成し、HiSeq 2500 (Illumina) にて解析した。

(Gene-based rare variant association tests)  
候補遺伝子における希少変異の関連解析を Efficient and Parallelizable Association Container Toolbox を用いて行った。

#### (遺伝子改変マウス作成)

Crispr-cas9 システムを用いて統合失調症多発家系で同定された変異 A を C57BLN マウスに導入した。

#### (行動解析)

Crispr-cas9 にて作成した遺伝子改変マウスの行動解析を行った。解析はオープンフィールド試験、Y 字迷路試験、社会探索行動試験、ローターロッド試験の 4 項目を行った。

### 4. 研究成果

#### (全エクソン解析)

統合失調症多発家系 10 名の全エクソン解析を行った。患者特異的変異は変異 A ならびに変異 B の 2 つのみであった。そのため、この 2 つの変異が本家系の病的候補変異と考えられた。

#### (多検体解析)

統合失調症患者 288 名、健常者 419 名の target sequencing を行い上記変異のアレル頻度を解析した。変異 A は統合失調症患者・健常者共に見られない novel な変異であった。一方で、変異 B は統合失調症患者には見られず健常者群で 2 名に確認された。この結果から変異 B は polymorphism であると考えられた。

(Gene-based rare variant association tests)

本家系の候補遺伝子である遺伝子 A, B ならびに比較対象として選定した 3 つの遺伝子 (KDM6A, KMT2D, NSD1) の希少変異のデータを元に Gene-based rare variant association tests を行った。解析には CMC, Madsen-Browning, SKAT-0 の 3 つのプログラムを用いた。3 つのプログラム全てにおいて、遺伝子 A は B と比較し低い P 値を示し、比較対象を含めた全ての遺伝子でもっとも低い P 値を示した。多検体解析の結果と総合すると、本家系の原因遺伝子は変異 A と考えられた。

#### (遺伝子改変マウス作成)

本家系にて同定された遺伝子 A の変異の機能を解析するため、Crispr-cas9 システムを用いて統合失調症多発家系で同定された変異を C57BLN マウスに導入し、遺伝子 A

改変マウスを作成した。遺伝子改変マウスは生後4ヶ月頃から中枢神経系の異常兆候であるHind-limb clasp signを示した。脳の形態学的異常をHematoxylin-eosin染色にて確認したところ、小脳髄質の海綿状編成やプルキンエ細胞の核形態異常が見られた。遺伝子Aの脳における発現を免疫染色にて解析行ったところ、小脳プルキンエ細胞をはじめとした脳神経細胞での発現が確認された。

#### (行動解析)

作成したモデルマウスの行動解析を行ったところ、オープンフィールドにおける移動活動量の平均値は、WTが3596.7cmであったのに対して遺伝子A改変マウスは3184.0cmと短く、新奇場面での活動性が低い傾向がみられた。Y字迷路ではWTのアームへの侵入回数が34回に対して、遺伝子A改変マウスのアームへの侵入回数は26回と少なく、活動性が低い傾向がみられた。社会的探索行動テストの結果、刺激マウスへの探索時間には遺伝子型間の差は見られなかった。ロータロッドテストの結果、Trial 1ではWTのロータロッドから落ちるまでの潜時が77secであったのに対して、遺伝子A改変マウスの潜時は38secとWTに比べて短く、落下するのが早かった。Trial 2になると、WTが103sec、遺伝子A改変マウスが95secと遺伝子型間での差はみられなくなった。以上の結果より、学習や社会性に異常はみられなかったものの、全体として、WTに比べて遺伝子A改変マウスの活動性が低いまたは運動機能が減衰している可能性が示された。しかしながら、解析を行った頭数(WT:6頭、遺伝子A改変マウス:6頭)では優れた結果ではなかった。

#### (考察)

統合失調症の多発大家系の全エクソンシーケンス解析により、病因変異と考えられる変異を同定した。遺伝子Aはヒストン修飾複合体を形成し、発生過程において重要な役割を持つことが報告されている。また、近年統合失調症を含む神経発達障害の病態におけるヒストン修飾因子の重要性が繰り返し報告されている。現段階では遺伝子Aの変異が脳機能に影響を与えるメカニズムの同定にはいたっていないが、今後解析を続けることにより統合失調症の病態解明につながるのみならず、新たな治療標的の同定につながる可能性はあると考える。このように本研究は医療行政上大変有意義であり、国民の保健・精神医療に多大なる貢献ができると考えられる。

#### 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19件)

Morimoto Y, Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Yoshida S, Kinoshita A, Mishima H, Yamaguchi N, Mori T, Imamura A, Ozawa H, Kurotaki N, Ziegler C, Domschke K, Deckert J, Umekage T, Tochigi M, Kaiya H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T, Yoshiura Ki, Ono S. Whole-exome sequencing and gene-based rare variant association tests suggest that PLA2G4E might be a risk gene for panic disorder. *Transl Psychiatry*. 2018 Feb 2;8(1)41. 査読有  
doi 10.1038/s41398-017-0088-0

今村 明、森本 芳郎、黒滝 直弘、金替 伸治、山本 直毅、船本 優子、田山 達之、山口 尚宏、小澤 寛樹、統合失調症と自閉スペクトラム症の遺伝子、精神科 32 258-264 2018 査読なし

今村 明、金替 伸治、山本 直毅、船本 優子、田山 達之、山口 尚宏、黒滝 直弘、小澤 寛樹、精神科薬物療法 pros and cons 子どものうつ病に対する支援と薬物療法 当診療部における薬物療法の工夫、臨床精神薬理 (1343-3474)21 巻1号 103-106、2018 査読なし

Nishi A, Numata S, Tajima A, Zhu X, Ito K, Saito A, Kato Y, Kinoshita M, Shimodera S, Ono S, Ochi S, Imamura A, Kurotaki N, Ueno SI, Iwata N, Fukui K, Imoto I, Kamiya A, Ohmori T. De novo non-synonymous TBL1XR1 mutation alters Wnt signaling activity. *Sci Rep*. 2017 Jun 6;7(1)2887. 査読有  
doi 10.1038/s41598-017-02792-z

Morimoto Y, Ono S, Imamura A, Okazaki Y, Kinoshita A, Mishima H, Nakane H, Ozawa H, Yoshiura Ki, Kurotaki N. Deep sequencing reveals variations in somatic cell mosaic mutations between monozygotic twins with discordant psychiatric disease. *Hum Genome Var*. 2017 Jul 27;417032. 査読有  
doi 10.1038/hgv.2017.32

Yamada S, Imamura A, Honda S, Iwanaga R, Shibuya K, Winnie D, Ozawa H, Characteristics of Inattention and Hyperactivity, Perception of General Health, and Reading Literacy of Japanese Adolescents: Results from a Large-scale Community Sample, *Acta medica Nagasakiensia*, 61(2), 71-79; 2017. 査読有

今村 明、金替 伸治、山本 直毅、船本 優子、田山 達之、山口 尚宏、黒滝 直弘、小澤 寛樹、精神病リスク状態(at-risk mental state)の概説 小児科 (0037-4121)58巻7号 679-686 2017 査読なし

今村 明、金替 伸治、山本 直毅、船本 優子、田山 達之、山口 尚宏、黒滝 直弘、小澤 寛樹、【新・発達障害支援～小児科医へのメッセージ】成人期に向けた支援 大人の発達障害(発達症)、小児科診療 (0386-9806)80巻7号 879-884 2017 査読なし

近藤 達郎、今村 明、森藤 香奈子、中根 秀之、森内 浩幸、【精神医学症候群(第2版)-発達障害・統合失調症・双極性障害・抑うつ障害-】神経発達症群/神経発達障害群 遺伝的要因による神経発達障害 染色体異常 Down 症候群、日本臨床 (0047-1852)別冊精神医学症候群 I 134-138 2017 査読なし

今村 明、金替 伸治、山本 直毅、船本 優子、田山 達之、山口 尚宏、黒滝 直弘、小澤 寛樹、【ADHD をめぐる最近の動向】ADHD を持つ成人の治療と支援、精神医学 (0488-1281)59巻3号 209-216 2017 査読なし

今村 明、金替 伸治、田山 達之、黒滝 直弘、小澤 寛樹、【発達障害 Update】大人の発達症(発達障害)、チャイルドヘルス (1344-3151)19巻5号 357-360 2016 査読なし

今村 明、金替 伸治、山本 直毅、船本 優子、田山 達之、山口 尚宏、黒滝 直弘、小澤 寛樹、児童思春期医師の立場から、アスペクト 43巻 48-53 2016 査読なし

今村 明、金替 伸治、田山 達之、黒滝 直弘、小澤 寛樹、大人の発達症(発達障害) チャイルドヘルス 19巻 45-49 2016 査読なし

今村 明、精神科レクチャー1 ARMS について、日本小児心身医学会雑誌、子どもの心とからだ 25巻 415-416 2016 査読なし

酒井 武仁、藤丸 浩輔、今村 明、岡崎 祐士、【精神科臨床評価マニュアル[2016年版]】(第1章)精神科臨床評価 全般 Minor Physical Anomalies(MPAs)、臨床精神

医学 (0300-032X)44巻増刊 111-116 2016 査読なし

黒滝 直弘、久保 達也、今村 明、木下 裕久、山口 尚宏、小野 慎治、小澤 寛樹、【精神神経疾患のゲノム研究失われた遺伝率の謎を求めて】神経疾患の原因解明にみる成功が精神疾患では起こっているのかわからないのか、臨床精神医学 (0300-032X)44巻10号 1333-1339 2015 査読なし

松坂 雄亮、吉田 真太郎、田中 大三、三宅 通、木下 裕久、井手 みのり、梶原 美穂、福田 和久、黒滝 直弘、今村 明、小澤 寛樹、長崎大学病院精神科リエゾンチームの活動報告、九州神経精神医学 (0023-6144)61巻2号 104-110 2015 査読なし

福田 和久、船本 優子、生塩 詞子、井川 掌、井上 統夫、金子 賢一、田中 克己、岩永 竜一郎、木下 裕久、黒滝 直弘、今村 明、中根 秀之、小澤 寛樹、長崎大学病院性同一性障害外来における受診者の特徴、GID(性同一性障害)学会雑誌 (1883-5228)7巻1号 27-33 2014 査読なし

今村 明、成人の発達障害を支援する II 精神科外来での診断と支援、精神科臨床サービス 14巻 395-401 2014 査読なし

〔学会発表〕(6件)

今村 明、金替 伸治、山本 直毅、船本 優子、田山 達之、山口 尚宏、黒滝 直弘、小澤 寛樹、成人期 ADHD 発症のエピジェネティクス仮説、An epigenetic hypothesis for the onset of adult ADHD、児童期の ADHD と成人期の ADHD の連続性について、14. 児童期の ADHD と成人期の ADHD の連続性について、第113回日本精神神経学会学術総会シンポジウム、2017(愛知県名古屋市)

今村 明、発達障害(発達症)の「障害」について、委員会シンポジウム9、発達症のスティグマ、第113回日本精神神経学会学術総会、54 2017(愛知県名古屋市)

Yamada S, Honda S, Imamura A, Iwanaga R, Ozawa H. ADHD and the perceived reading weakness in Japanese adolescents (junior high school students). 3rd Asian Congress on ADHD. 2016 .Singapore

Kanako Morifuji, Hideyuki Nakane, Tatsuro Kondoh, Akira Imamura. The

relationship between the social  
competence of children and adults with  
Down ' s syndrome and caregivers ' burden.  
International Congress of Human Genetics  
2016 Kyoto Japan

今村 明、臨床場面での成人 ADHD の診断  
について、第 25 回日本臨床精神神経薬理学  
会 2015(東京都新宿区)

今村 明、触法発達障害者の対応 外来の  
症例を中心に、第 110 回日本精神神経学会総  
会 2014 (神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 2 件)

今村 明 他、星和書店、日常診療におけ  
る精神療法 10 分間で何が出来るか(共著)  
207-220 2016

今村 明、星和書店、おとなの発達症のた  
めの医療系支援のヒント、2014、総ページ数  
221

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特記事項なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

今村 明 (IMAMURA, Akira)  
長崎大学・病院 (医学系)・教授  
研究者番号 : 40325642

### (2)研究分担者

吉浦 孝一郎 (YOSHIURA, Koichiro)  
長崎大学・原爆後障害医療研究所・教授  
研究者番号 : 00304931

黒滝 直弘 (KUROTAKI, Naohiro)  
長崎大学・医歯薬総合研究科 (医学系)・准  
教授  
研究者番号 : 20423634

小澤 寛樹 (OZAWA, Hiroki)  
長崎大学・医歯薬総合研究科 (医学系)・教  
授  
研究者番号 : 50260766