

平成30年 5月21日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860360

研究課題名(和文) 依存性薬物感受性・依存症脆弱性個人差におけるゲノムワイドコピー数多型・変異解析

研究課題名(英文) Genome-wide association analyses of copy number variations in sensitivity to addictive substances and vulnerability to dependence

研究代表者

西澤 大輔 (NISHIZAWA, Daisuke)

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員

研究者番号：80450584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：下顎形成外科手術時にオピオイド鎮痛薬を投与された症例に対して、コピー数変異・多型(Copy Number Variations: CNVs)とオピオイド感受性の指標となる術後24時間のオピオイド鎮痛薬投与量及び術前のフェンタニルの鎮痛効果との網羅的関連解析を行ったところ、前者に関しては、5番染色体におけるCHSY3及びHINT1、並びに1番染色体におけるAGBL4、C1orf165、及びELAVL4の遺伝子領域間のCNVが、後者に関しては、1番染色体におけるFAM5B及びSEC16B、並びに3番染色体におけるGBE1及びCADM2の遺伝子領域間のCNVが、有力候補CNVとして同定された。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive analyses were conducted in subjects who underwent painful cosmetic orthognathic surgery involving opioid administration to investigate associations between copy number variations (CNVs) throughout the human genome and postoperative 24-h opioid requirements or preoperative analgesic effects of fentanyl as indices of opioid sensitivity. As a result, CNVs around the gene regions of the CHSY3 and HINT1 on chromosome 5 and the AGBL4, C1orf165, and ELAVL4 on chromosome 1 were identified as the best candidates for postoperative 24-h opioid requirements. In addition, CNVs around the gene regions of the FAM5B and SEC16B on chromosome 1 and the GBE1 and ADM2 on chromosome 3 were identified as the best candidates for preoperative analgesic effects of fentanyl.

研究分野：分子精神医学

キーワード：薬物依存 薬物感受性 薬物感受性・依存症脆弱性個人差の遺伝要因 コピー数多型・変異 ゲノムワイド関連解析

1. 研究開始当初の背景

覚せい剤、大麻、コカイン、アヘン類(オピオイド)などの違法性の薬物は我が国のみならず世界各国で広く乱用され、アルコール、ニコチン等の薬物も含め、いずれもその報酬効果により依存症の成因となり得る。報酬効果に関与する神経伝達系としてはドーパミン系以外に、オピオイド系も重要であることが明らかになっている。中でもモルヒネ等のオピオイド物質は強力な鎮痛薬としても広く利用されているが、一方でその報酬・依存作用により用法・用量によっては依存症の原因となり得ることが知られている。従って、オピオイド感受性の個人差に関係する遺伝要因は、薬物依存症を含め物質依存症脆弱性の個人差にも寄与する可能性があると考えられる。実際、研究代表者はこれまで、オピオイド鎮痛薬感受性との関連が示されたミューオピオイド受容体における機能的な A118G 多型に関して()、アルコール依存症脆弱性と有意に関連することを見出している()。また、研究代表者はこれまで、主に美容整形目的で下顎形成術を受ける健康な患者を対象とし、世界初のオピオイド鎮痛薬感受性に対する探索的なゲノムワイド関連解析研究(Genome-wide association study: GWAS)において、一塩基多型 rs2952768 を含む 2q33.3-2q34 領域の連鎖不平衡ブロック内の遺伝子多型が、術後オピオイド鎮痛薬必要量と有意に関連することを見出した(図1)。さらにこの多型は、物質依存症患者及び他集団の健康者においても、依存重症度の指標及びパーソナリティ質問紙における報酬依存スコアと関連を示すなど、オピオイド感受性への寄与においてこれまで知られる限りにおいて最有力の候補多型と考えられた(、特許庁, PCT 出願 PCT12-0037、特許庁, 特願 2011-217104、朝日新聞報道 2012年11月等各種報道)。

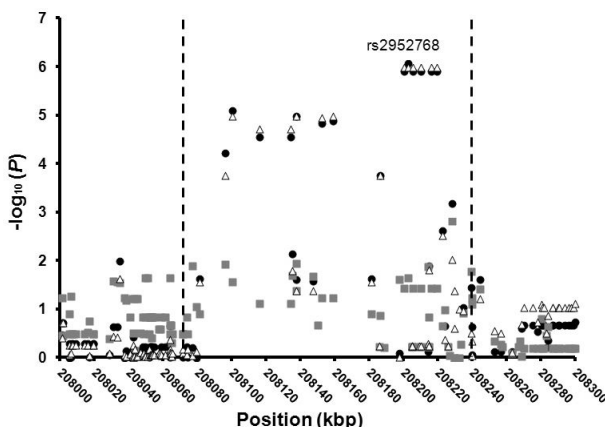


図1. GWASにおいて術後鎮痛との強い関連が示された rs2952768 多型

2. 研究の目的

ヒトゲノム上には一塩基多型以外にもコピー数変異・多型(Copy Number Variation: CNV)に代表される、1kbp 以上な

どの比較的領域の広い構造多型の存在が知られており、これらの疾患のリスク及び薬物感受性への寄与を示す研究成果も近年多数報告されている。精神疾患においても、自閉症スペクトラム障害(Autism Spectrum Disorders: ASD)及び統合失調症を中心に報告がなされているが、各疾患関連 CNV はいくつかの精神疾患にまたがって関連することも知られており、実際には薬物依存症のような精神疾患等も同様に発症のリスクに関与する遺伝子または発症に至るまでの中間表現型等を共有している可能性も考えられる。一方、その他の CNV の寄与も考えられるが、これらはいずれもほとんど明らかになっていない。

そこで本研究においては、このような CNV を対象として依存性薬物感受性・依存症脆弱性に寄与する構造変異または構造多型の包括的な探索・検証を行い、良い候補の Variation が認められた場合、その個人差の原因となるメカニズム解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 対象サンプルの収集・選定及び全ゲノムジェノタイピング実験準備

本研究に用いる下記のサンプルに関して、高密度アレイまたは qPCR 等を用いて CNV 判定を行う。

- () 下顎形成外科手術・開腹手術時にオピオイド鎮痛薬を投与された 15-60 歳の患者 (合計約 300 例)
- () アルコール依存症・覚せい剤(メタンフェタミン)依存症・摂食障害・タバコ服用者(ニコチン依存尺度データ付随)などの各患者 (合計約 1900 例)
- () 健康者 (合計約 900 例)

() ~ () のサンプルは全て研究代表者の所属研究室で収集され()、利用可能である。() の下顎形成外科手術のサンプルに関しては、術後 24 時間内鎮痛薬投与必要量、手術終了 3 時間後と 24 時間後の痛みの強さの尺度の測定値等の臨床データも付随する。また、これとは別に、術中鎮痛として() のフェンタニルとは異なりレミフェンタニルを用いたサンプルも研究代表者の所属研究室では保管しているので、そちらのサンプルも必要に応じて(2)において得られた結果の再現性検証のための解析に用いる。

() の下顎形成外科手術サンプルにおいては、臨床データを吟味し、術後鎮痛薬必要量が平均値より 1 SD (標準偏差) 以上の差を示すなど、オピオイド高感受性またはオピオイド低感受性であることが示唆される群にサンプルを分類し、全ゲノム CNV 解析用のデータとする。

(2) ジェノタイピング・関連解析及び追加解析

(1)において選定されたサンプルに対して、

Human1M-Duo BeadChip 等の高密度アレイを用いた網羅的遺伝子多型判定を行い、いずれかのオピオイド感受性群のみに認められるような新規 CNV またはデータベース上に登録済みの CNV を同定する。比較的頻度の高い CNV に対しては、common な一塩基多型などの場合と同様に、鎮痛薬・疼痛感受性の指標となる臨床データを用いて関連解析（個別多型・ハプロタイプ等）を行うことにより、オピオイド感受性に関連する有力な候補 CNV が包括的に同定されると考えられる。

高密度アレイにおいては詳細な境界領域及び具体的なコピー数の同定などが困難な CNV に関しては、必要に応じて qPCR を行ってそれらの詳細なデータを得る。また、場合によっては、一塩基多型を含めた連鎖不平衡解析などを行うことにより、CNV と連鎖するマーカー多型の存在を確認する。

同定された CNV に関しては、() () の両サンプル間において、コピー数の多寡またはその有無に関する関連解析を行う。関連解析において有意な関連が見出された CNV に関しては、文献検索及びリアルタイム定量 PCR (qPCR) による追加解析等を含めた詳細な検討を行い、最有力候補構造多型・変異 (最も causative と考えられる CNV 及びその遺伝子) を同定する。

4. 研究成果

(1) 術中鎮痛として上記 () のフェンタニルとは異なりレミフェンタニルを用いたサンプルに関しては、継続的に収集を進め、最終年度末までに合計約 410 例程度となった。また、下顎形成外科手術サンプルにおいては、オピオイド感受性の指標として、術後 24 時間のオピオイド鎮痛薬投与量、術前のフェンタニル投与前後における冷水誘発疼痛試験結果としての疼痛感知潜時 (秒) の差、すなわち術前のフェンタニルの鎮痛効果、などを選択し、CNV との関連解析を行った。これらの指標に関しては、生データの量的変数に対する解析以外に、術後鎮痛薬必要量が平均値より 1 SD 以上の差を示すなど、オピオイド高感受性またはオピオイド低感受性であることが示唆されるサンプル分類群の、質的変数に対する解析も行った。

(2) 上記 () のサンプルに対して、Human1M-Duo BeadChip 等の高密度アレイを用いた網羅的遺伝子多型判定を行った後、CNV の検出を行った。() の合計 354 サンプルの全ゲノムジェノタイプングデータに関して、Call frequency 0.95、及び Cluster sep 0.1 等の条件を満たす一塩基多型 (SNP) をゲノム解析用の GenomeStudio のソフトウェアを用いて絞り込み、それらを対象とし、GenomeStudio 以外に CNV 解析に特化した cnvPartition 及び PLINK Input Report Plug-in 等の特殊なソフトウェアを用いて、

デフォルトの設定により、ゲノム上における CNV 領域の検出を行った。その結果、同定されたのはコピー数が 0、1、2、3、4、についてそれぞれ合計 399、431、8796、1150、67、の個数の CNV 領域であった。

これらの領域に対して、量的変数の解析として、同定された CNV とオピオイド感受性の指標となる術後 24 時間のオピオイド鎮痛薬投与量との関連解析を行ったところ、多数の領域が $P < 0.05$ の検定結果となり、有意な関連が示されたが、多重検定補正を行った場合にも有意な関連を示す領域は無かった。なお、最も強い関連を示したものは、5 番染色体における *CHSY3* 及び *HINT1* の遺伝子領域間の CNV であった ([CNV 保有者における対数変換後表現型値] = 3.213、[CNV 非保有者における対数変換後表現型値] = 1.126、[最低 P 値] = 0.004)。また、術前状態でのオピオイド感受性の指標となる術前のフェンタニルの鎮痛効果に関して、同様に、同定された CNV との関連解析を行ったところ、多数の領域が $P < 0.05$ の検定結果となり、有意な関連が示されたが、多重検定補正を行った場合にも有意な関連を示す領域は無かった。なお、最も強い関連を示したものは、1 番染色体における *FAM5B* 及び *SEC16B* の遺伝子領域間の CNV であった ([CNV 保有者における対数変換後表現型平均値] = 27.41、[CNV 非保有者における対数変換後表現型平均値] = 2.407、[最低 P 値] = 0.0006)。

一方、質的変数の解析として、同定された CNV と術後 24 時間のオピオイド鎮痛薬投与量との関連解析を行ったところ、多数の領域が $P < 0.05$ の検定結果となり、有意な関連が示されたが、多重検定補正を行った場合にも有意な関連を示す領域は無かった。なお、最も強い関連を示したものは、1 番染色体における *AGBL4*、*C1orf165*、及び *ELAVL4* の遺伝子領域間の CNV であった ([オピオイド高感受性群対象 CNV 保有症例数] = 14、[オピオイド低感受性群対象 CNV 保有症例数] = 2、[最低 P 値] = 0.00094；[オピオイド高感受性群対象 CNV 保有症例数] = 12、[オピオイド低感受性群対象 CNV 保有症例数] = 1、[最低 P 値] = 0.00098)。同様に、同定された CNV と術前のフェンタニルの鎮痛効果との関連解析を行ったところ、多数の領域が $P < 0.05$ の検定結果となり、有意な関連が示されたが、多重検定補正を行った場合にも有意な関連を示す領域は無かった。なお、最も強い関連を示したものは、3 番染色体における *GBE1* 及び *CADM2* の遺伝子領域間の CNV であった ([オピオイド高感受性群対象 CNV 保有症例数] = 7、[オピオイド低感受性群対象 CNV 保有症例数] = 1、[最低 P 値] = 0.01352)。

< 引用文献 >

Hayashida M, Nagashima M, Satoh Y, Katoh R, Tagami M, Ide S, Kasai S, Nishizawa D, Ogai Y, Hasegawa J, Komatsu H, Sora

I, Fukuda K, Koga H, Hanaoka K, Ikeda K (2008) Analgesic requirements after major abdominal surgery are associated with *OPRM1* gene polymorphism genotype and haplotype. *Pharmacogenomics* 9(11):1605-1616.

Nishizawa D, Han W, Hasegawa J, Ishida T, Numata Y, Sato T, Kawai A, Ikeda K (2006) Association of mu-opioid receptor gene polymorphism A118G with alcohol dependence in a Japanese population. *Neuropsychobiology* 53:137-141.

Nishizawa D, Fukuda K, Kasai S, Hasegawa J, Aoki Y, Nishi A, Saita N, Koukita Y, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Higuchi S, Ujike H, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara K, Itokawa M, Koga M, Arinami T, Kaneko Y, Hayashida M, Ikeda K (2014) Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. *Mol Psychiatry* 19:55-62. (doi: 10.1038/mp.2012.164)

Fukuda K, Hayashida M, Ide S, Saita N, Kokita Y, Kasai S, Nishizawa D, Ogai Y, Hasegawa J, Nagashima M, Tagami M, Komatsu H, Sora I, Koga H, Kaneko Y, Ikeda K (2009) Association between *OPRM1* gene polymorphisms and fentanyl sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery. *Pain* 147:194-201.

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23件)

Takahashi K*, Nishizawa D*, Kasai S, Koukita Y, Fukuda K, Ichinohe T, Ikeda K (2018) Genome-wide association study identifies polymorphisms associated with the analgesic effect of fentanyl in the preoperative cold pressor-induced pain test. *J Pharmacol Sci* 136(3):107-113. (doi: 10.1016/j.jphs.2018.02.002) (*: These authors contributed equally to this study.) (査読有)

Nishizawa D, Mieda T, Tsujita M, Nakagawa H, Yamaguchi S, Kasai S, Hasegawa J, Fukuda K, Kitamura A, Hayashida M, Ikeda K (2018) Genome-wide scan identifies candidate loci related

to remifentanyl requirements during laparoscopic-assisted colectomy. *Pharmacogenomics* 19(2):113-127. (doi: 10.2217/pgs-2017-0109) (査読有)

Amano K*, Nishizawa D*, Mieda T, Tsujita M, Kitamura A, Hasegawa J, Inada E, Hayashida M, Ikeda K (2016) Opposite associations between the rs3845446 single-nucleotide polymorphism of the *CACNA1E* gene and postoperative pain-related phenotypes in gastrointestinal surgery versus previously reported orthognathic surgery. *J Pain* 17(10):1126-1134. (*: These authors contributed equally to this study.) (doi: 10.1016/j.jpain.2016.07.001) (査読有)

Mieda T*, Nishizawa D*, Nakagawa H, Tsujita M, Imanishi H, Terao K, Yoshikawa H, Itoh K, Amano K, Tashiro J, Ishii T, Ariyama J, Yamaguchi S, Kasai S, Hasegawa J, Ikeda K, Kitamura A, Hayashida M (2016) Genome-wide association study identifies candidate loci associated with postoperative fentanyl requirements after laparoscopic-assisted colectomy. *Pharmacogenomics* 17(2):133-145. (*: These authors contributed equally to this study.) (doi: 10.2217/pgs.15.151) (査読有)

Nishizawa D, Kasai S, Hasegawa J, Sato N, Yamada H, Tanioka F, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Ujike H, Ozaki N, Inada T, Iwata N, Sora I, Iyo M, Yamada M, Kondo N, Won MJ, Naruse N, Uehara-Aoyama K, Itokawa M, Ohi K, Hashimoto R, Tanisawa K, Arai T, Mori S, Sawabe M, Naka-Mieno M, Yamada Y, Yamada M, Sato N, Muramatsu M, Tanaka M, Irukayama-Tomobe Y, Saito YC, Sakurai T, Hayashida M, Sugimura H, Ikeda K (2015) Associations between the orexin (hypocretin) receptor 2 gene polymorphism Val308Ile and nicotine dependence in genome-wide and subsequent association studies. *Mol Brain* 8:50. (doi:10.1186/s13041-015-0142-x) (査読有)

Nishizawa D*, Kasai S, Hasegawa J, Sato N, Tanioka F, Sugimura H, Ikeda K, Dobashi Y* (2015) Association between *AKT1* gene polymorphism rs2498794 and smoking-related traits with reference to cancer susceptibility. *BioMed Res*

Int 2015: 316829. (*: These authors contributed equally to this study.) (doi: 10.1155/2015/316829) (査読有)

〔学会発表〕(計 19 件)

Nishizawa D, Yoshida K, Ichinomiya T, Ichinohe T, Hayashida M, Fukuda K, Ikeda K (2016) Prediction formulas for individual opioid analgesic requirements based on genetic polymorphism analyses. The International Narcotics Research Conference 2016, Bath, UK [2016/07/14].

西澤大輔 (2016) オピオイド感受性関連遺伝子多型の同定とその臨床応用. 日本ペインクリニック学会第 50 回大会, 横浜 [2016/07/08].

Nishizawa D, Ikeda K (2015) Genome-wide association study identifies a potent locus associated with human opioid sensitivity. 4th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, Taipei, Taiwan [2015/11/22].

西澤大輔, 池田和隆 (2015) ゲノムワイド関連解析(GWAS)によるオピオイド感受性関連遺伝子多型の同定とその臨床応用. 第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会, 東京 [2015/09/26].

〔図書〕(計 14 件)

西澤大輔, 福田謙一, 林田眞和, 池田和隆 (2017) 遺伝子多型に基づいた個別鎮痛法の開発. ペインクリニック 38:S203-S210.

西澤大輔, 福田謙一, 林田眞和, 池田和隆 (2016) オピオイド感受性遺伝子の個体差について. Locomotive Pain Frontier Vol. 5 No.2:14-18.

Nishizawa D, Ikeda K (2016) Chapter 3: Pharmacology and pathophysiology. In: Addiction Medicine (Second Edition), pp52-53. 【分担執筆】 UK: OXFORD UNIVERSITY PRESS.

Nishizawa D, Ikeda K (2016) Genome-wide association studies and human opioid sensitivity. In: The Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse. Volume 1(VR Preedy, Ed), pp909-921. 【分担執筆】 Waltham: Academic Press.

西澤大輔, 福田謙一, 林田眞和, 池田和隆 (2015) 痛みの遺伝子多型についての基礎研究と臨床研究. 麻酔 64 増刊

号:S177-S184.

西澤大輔, 池田和隆 (2015) 物質依存症と遺伝子多型. 日本臨床 73(9) :1465-1472.

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 1 件)

名称: Method for evaluating drug sensitivity and susceptibility to diseases by analyzing gene for protein capable of binding to cyclic-amp-responsive sequence
発明者: Ikeda K, Nishizawa D, Fukuda K
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類: 特許
番号: 9,727,691
取得年月日: 平成 29 年 8 月 8 日
国内外の別: 国外

〔その他〕
ホームページ等
公益財団法人東京都医学総合研究所「依存性薬物プロジェクトホームページ」
<http://www.igakuken.or.jp/abuse/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
西澤 大輔 (NISHIZAWA, Daisuke)
公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・主席研究員
研究者番号: 80450584

(4) 研究協力者
池田 和隆 (IKEDA, Kazutaka)