

令和元年6月23日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10185

研究課題名(和文) 統合失調症発端者・両親のエクソーム解析に基づくリスク遺伝子確定と死後脳発現解析

研究課題名(英文) Search for schizophrenia risk gene based on whole-exome sequencing of parent-affected offspring trios, and gene expression analysis of postmortem brains

研究代表者

渡部 雄一郎 (Watanabe, Yuichiro)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90401744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症発端者・両親トリオのエクソーム解析に基づいてリスク遺伝子を確定し、死後脳研究によりリスク遺伝子の脳内発現異常を明らかにすることが本研究の目的である。2トリオのエクソーム解析では、両家系に共通する候補リスク変異としてFBX018遺伝子の稀なフレームシフト変異を同定した。患者96人を対象とした同遺伝子コード領域のシーケンスでは、3個の稀な非同義変異を検出した。しかし、関連解析(1,376対1,496)では、これらの変異と統合失調症との有意な関連は認められなかった。FBX018遺伝子の稀な変異が統合失調症の病因に関与することを示す根拠は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では統合失調症のリスク遺伝子を同定するには至らなかった。その主な理由として、サンプル数が十分でないことがあげられる。今後は自施設でのサンプル収集をさらに進めるとともに、多施設共同研究を拡大し、日本人は遺伝的な均質性が高いという利点をいかした優れた研究デザインを組むことで、統合失調症の発症に大きな効果をもつリスク遺伝子を確定できるものと予想される。

研究成果の概要(英文)：Aim: Rare variations are suggested to play a role in the genetic etiology of schizophrenia, and to further investigate their role, we performed a three-stage study. Methods: First, we performed whole-exome sequencing (WES) of two parent-affected offspring trios. Second, we sequenced the FBX018 coding region in 96 patients. Third, we tested rare non-synonymous FBX018 variations for association with schizophrenia in 1,376 patients and 1,496 controls. Results: A rare frameshift variation (L116fsX) in the FBX018 gene was recurrently identified by WES in both trios. Sequencing FBX018 coding regions, we detected three rare non-synonymous variations (V15L, L116fsX and V1006I). However, these rare FBX018 variations were not significantly associated with and schizophrenia in the case-control study. Conclusion: Our present study does not provide evidence for the contribution of rare non-synonymous FBX018 variations to the genetic etiology of schizophrenia in the Japanese population.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

白人の大規模症例・対照サンプル (36,989 対 113,075) を用いた統合失調症のゲノムワイド関連解析のメタ解析では、108 のリスク座位が同定されている (Ripke et al., 2014)。しかし、個々のリスク座位が統合失調症の発症に与える影響は小さいことから、ゲノムワイド関連解析の成果を病態解明へとつなげるには大きな困難がある。

統合失調症の病態を解明するための分子基盤を得るには、頻度は稀であっても統合失調症の発症に大きな効果をもつリスク変異を同定することが重要である。最近では、高速シーケンサーの登場によって統合失調症のエクソーム解析が実施されるようになってきた。発端者・両親 623 トリオのエクソーム解析では、de novo 非同義変異がグルタミン酸系シナプス後タンパク質をコードする遺伝子に多く認められることなどが示された (Fromer et al., 2014)。症例・対照サンプル (2,536 対 2,543) のエクソーム解析では、多重検定の補正後も有意な関連を示す変異や遺伝子は同定されなかった (Purcell et al., 2014)。白人を対象としたこれら大規模なエクソーム解析にもかかわらず、統合失調症リスク変異の確定には至っていなかった。

## 2. 研究の目的

1) 発端者・両親トリオのエクソーム解析、2) 候補リスク遺伝子シーケンス、3) 大規模関連解析という3つのアプローチを組み合わせることにより、統合失調症の発症に大きな効果をもつリスク遺伝子を確定することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 発端者・両親トリオのエクソーム解析

発端者・両親 2 トリオを対象としてエクソーム解析を行った。SureSelect Human All Exon V5 Kit を用いてエクソーム・ライブラリを作成し、HiSeq2000 によりシーケンスした。シーケンス・リードから、cutadapt v1.21 を用いてアダプター・シーケンスを、FASTX-Toolkit v0.0.13 を用いて低品質リードを除去した。cmpfastq\_pe を用いてペア・エンド・シーケンス・リードを抽出し、Burrows-Wheeler Aligner v0.5.9 を用いて参照ヒトゲノム (UCSC hg19) にマッピングした。Picard v1.93 を用いて PCR 重複を除去した。Genome Analysis Toolkit v1.6-9 を用いて変異をコールし、Snpeff v3.6c を用いて注釈付けした。

以下のフィルタリングにより候補リスク変異を絞り込んだ。1) リード数が 10 以上の変異、2) 発端者でコールされた変異、3) Snpeff により高い効果をもつとされた変異、4) Human Genetic Variation Database v1.41 でアレル頻度が 0.01 未満の変異、5) 常染色体顕性、常染色体潜性、X 連鎖、または de novo の伝達様式に従う変異。選択された候補リスク変異は、3130x1 Genetic Analyzer を用いたサンガー法により、その存在を確認した。

### (2) 候補リスク遺伝子シーケンス

統合失調症患者 96 人 (男性 52 人・女性 44 人、平均年齢  $37.8 \pm 11.6$  歳) を対象として、FBX018 遺伝子コード領域をサンガー法によってシーケンスした。

### (3) 大規模関連解析

新潟サンプルおよび神戸サンプル (計 1,378 対 1,496) を用いて、発端者・両親トリオのエクソーム解析と候補リスク遺伝子シーケンスにより同定された非同義変異と統合失調症との関連解析を行った。新潟サンプルは、統合失調症患者 639 人 (男性 342 人・女性 297 人、平均年齢  $40.1 \pm 13.8$  歳) および対照者 674 人 (男性 343 人・女性 331 人、平均年齢  $38.3 \pm 10.9$  歳) からなる。神戸サンプルは、統合失調症患者 739 (男性 402 人・女性 337 人、平均年齢  $53.0 \pm 14.9$  歳) および対照者 822 人 (男性 377 人・女性 445 人、平均年齢  $52.7 \pm 18.5$  歳) からなる。なお、変異の遺伝型は TaqMan 法により決定した。

### (4) 倫理的配慮

本研究計画は新潟大学および共同研究機関の遺伝子倫理審査委員会で承認されており、対象者からは書面にて研究参加の同意を得た。

### (5) 統計解析

Hardy-Weinberg 平衡はカイ二乗適合度検定を用いて調べた。アレルの関連は、Fisher の正確検定を用いて調べた。EZR v1.30 を用いてランダム効果モデルのメタ解析を行った。検出力は、危険率を 0.05、罹患率を 0.01 と仮定して、Genetic Power Calculator を用いて推定した。

## 4. 研究成果

### (1) 発端者・両親トリオのエクソーム解析

トリオ#1 では計 181,809 個、トリオ#2 では計 183,325 個の変異がコールされた (表 1)。両トリオともに 9 個の稀なフレームシフト変異またはナンセンス変異が、候補リスク変異として



新潟	632	9	0	0.0072	662	8	0	0.0060	1.18	0.45-3.06
神戸	728	11	0	0.0074	809	13	0	0.0079	0.94	0.42-2.11
メタ解析									1.03	0.56-1.91
L116fsX										
新潟	630	8	0	0.0063	665	8	1	0.0074	0.84	0.33-2.15
神戸	736	3	0	0.0020	815	7	0	0.0043	0.48	0.12-1.84
メタ解析									0.70	0.33-1.51
V1006I										
新潟	625	12	0	0.0094	652	21	0	0.0156	0.60	0.29-1.22
神戸	729	10	0	0.0068	807	15	0	0.0092	0.74	0.33-1.65
メタ解析									0.66	0.39-1.12

本研究のサンプルサイズ(1,378対1,496)は比較的大きいものの、FBX018 遺伝子の稀な変異と統合失調症との関連を検出するには十分でない可能性がある。顕性モデル、ヘテロ接合体の相対危険率を2.0、リスクアレル頻度を0.005と仮定すると、本研究のサンプルサイズの検出力は0.6であった。

#### (4) 結論

本研究では、FBX018 遺伝子の稀な変異が統合失調症の病因に関与することを示す根拠は得られなかった。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計1件)

1. Hoya S, Watanabe Y, Hishimoto A, Nunokawa A, Inoue E, Igeta H, Otsuka I, Shibuya M, Egawa J, Sora I, Someya T. Rare *FBX018* variations and risk of schizophrenia: Whole-exome sequencing in two parent-affected offspring trios followed by resequencing and case-control studies. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2017; 71: 562-568. doi: 10.1111/pcn.12526.

##### 〔学会発表〕(計2件)

1. Watanabe Y, Hoya S, Hishimoto A, Nunokawa A, Inoue E, Igeta H, Otsuka I, Shibuya M, Sora I, Someya T. Rare *FBX018* variations and risk of schizophrenia. WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry. 2018.
2. 布川綾子, 保谷智史, 渡部雄一郎, 井上絵美子, 井桁裕文, 澁谷雅子, 江川純, 染矢俊幸. *FBX018* 遺伝子の稀な変異と統合失調症のリスク. 第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本精神神経薬理学会合同年会. 2017.

##### 〔図書〕(計0件)

##### 〔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:  
 国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:

取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。