

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05090

研究課題名(和文) 双極性障害のゲノムコピー数変異解析に基づく分子病態解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of bipolar disorder based on copy number variation

研究代表者

久島 周(Kushima, Itaru)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：00732645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：双極性障害の発症には遺伝要因が強く関与するが、その詳細は不明であった。本研究では、本患者と健常者を対象に、精神疾患との関連が知られるゲノムコピー数変異(CNV)に着目して、全ゲノム解析を実施した。その結果、精神疾患との関連が既に報告されているCNVが双極性障害のリスクにも関与する可能性が示唆された。また、本疾患の発症メカニズムに脂質代謝などが関与する可能性も示唆された。特定のCNVを有する患者のiPS細胞を用いて、患者神経細胞を調べた結果、樹状突起やシナプスの形態学的変化を認め、神経細胞レベルの異常を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

双極性障害の発症には遺伝要因が強く関与するが、その詳細や発症メカニズムは不明であった。本研究結果から、精神疾患との関連が既に知られている様々なCNVが本疾患の発症に関与することが示唆され、双極性障害の遺伝要因の解明に繋がる成果といえる。また双極性障害の発症メカニズムとして脂質代謝異常の関与や、患者iPS細胞由来神経細胞において形態学的な異常も見出した。以上の知見は、双極性障害の病態の理解や治療法の開発に繋がる成果である。

研究成果の概要(英文)：Genetic factors have an important role for the risk of bipolar disorder (BD), but the details remained unclear. In this study, we performed a genome-wide analysis of copy number variations (CNVs), which have been implicated in other psychiatric disorders. We found that CNVs previously associated with psychiatric disorders may increase the risk for BD. Further analysis of CNV data revealed the involvement of lipid metabolism in the pathogenesis of BD. We analyzed iPS cells derived from BD patients with specific BD-associated CNVs and observed morphological abnormalities of dendrites and synapses in neurons.

研究分野：精神医学

キーワード：双極性障害 ゲノムコピー数変異

## 1. 研究開始当初の背景

双極性障害は、発症頻度が約 1%に及び、高い自殺率や長期の就労困難を引き起こす。本疾患は、1. うつ病相の時点ではうつ病との鑑別が難しく、診断と適切な治療導入が遅れること、2. 既存薬は再発予防等の治療効果が限定的であることから、診断法や新規治療薬の開発が喫緊の課題である。発症に遺伝要因が強く関与するが、その詳細は長年不明であった。しかし、近年、統合失調症や自閉スペクトラム症の発症にゲノムコピー数変異 (copy number variation: CNV) が強く関与することが明らかになった。CNV は、染色体上の 1 キロベース以上にわたるゲノム DNA が、通常 2 コピーのところ、1 コピー以下 (欠失) あるいは 3 コピー以上 (重複) となるゲノム変異を指す。双極性障害においても CNV の関与を示唆する報告があり、分子病態解明への機運が高まっていた。

## 2. 研究の目的

双極性障害の発症には遺伝要因が強く関与するが、その分子病態は未だ不明である。本研究は、統合失調症や自閉スペクトラム症との関連が既に明らかになっている CNV (特に頻度の低い稀な CNV) に着目し、双極性障害の発症リスクとの関連や病態メカニズムについて検討を行った。本研究では、既に解析済みのデータに加えて、サンプル数をさらに拡大して CNV 解析を実施したうえで、以下の 3 点の解明を目標とした。1. 精神疾患との関連が既に報告されている CNV と双極性障害の関連を明確化する。2. CNV データのバイオインフォマティクス解析から、双極性障害の病態メカニズムを明らかにする。3. 双極性障害と関連する CNV をもつ患者 iPS 細胞由来の神経細胞を調べ、病態メカニズムに関連した形態学的な異常を同定する。

## 3. 研究の方法

### 1) 双極性障害患者と健常者のゲノムサンプリング

患者は Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5) の診断基準で双極性障害の診断を受けた者、健常者は精神疾患の既往がない者を研究対象とした。末梢血あるいは唾液を採取したうえで、ゲノムを抽出して、以下のゲノム解析に使用した。

なお、本研究は、名古屋大学医学部倫理審査委員会の承認を受けたうえで、被験者からインフォームド・コンセントを得て実施した。

### 2) 全ゲノム CNV 解析

高解像度アレイ CGH (Agilent SurePrint G3 Human CGH 400k) を用いて全ゲノム CNV 解析を実施した。アレイ CGH を用いた実験は、アジレント社の解析システムを用いてプロトコールに沿って実施した。Nexus Copy Number software で CNV のコーリングと quality control (QC) を行い、頻度が 1%未満の高精度 CNV データを得た。CNV の臨床的意義は、American College of Medical Genetics (ACMG) のガイドラインの基準

に基づいて評価した。なお、同定した CNV の一部はリアルタイム PCR 法で再確認も実施した。

遺伝子セット解析では、gene ontology (GO) に登録された多数の遺伝子セット (各遺伝子セットは、共通の生物学的機能や細胞内局在を示す) を用いて、健常者 CNV と比較して患者 CNV が有意に集積する遺伝子セットを探索した。既報 (PLoS Genet. 2010 Sep 9;6(9):e1001097) のロジスティック回帰分析を用いて検討を行った。各遺伝子セットの P 値を得たうえで、多重比較の補正のため、false discovery rate (FDR, Benjamin and Hochberg 法) で  $q < 0.1$  を有意とした。

### 3) 患者由来 iPS 細胞を用いた解析

慶應義塾大学の岡野教授のグループと共同で実施した。PCDH15 欠失を有する双極性障害患者 2 名から樹立済みの iPS 細胞を解析に使用した。患者 iPS 細胞から、精神疾患における機能低下やネットワークの破綻が指摘されているグルタミン酸作動性神経細胞と GABA 作動性神経細胞をそれぞれ選択的かつ高効率に作製した。そのうえで、健常者 iPS 細胞由来の同神経細胞と比較して、患者神経細胞の形態学的異常について検討を行った。

## 4. 研究成果

高解像度アレイ CGH を用いて双極性障害患者と健常者の全ゲノム CNV 解析を実施し、既に解析済みのサンプルと合わせて、患者 1700 例と健常者 2300 例の全ゲノム CNV 解析を完了した。CNV データの QC を実施し、高精度で頻度 1%未満の CNV データ (10 キロベース以上のサイズ) を得た。患者群と健常者群で、各々 4500 個、6900 個の CNV を同定し、1 人当たりの CNV 数は 2.6 個、2.9 個であった。そのうえで、American College of Medical Genetics (ACMG) のガイドラインの基準に基づいて臨床的意義をもつ CNV、ここでは、精神疾患との関連性が既報で示唆される CNV を抽出した。その結果、双極性障害患者の約 6%、健常者の 3.5% で臨床的意義をもつ CNV を同定した。患者群で有意に頻度が高かったため ( $p = 2.8 \times 10^{-4}$ )、これらの CNV は双極性障害の発症リスクとの関連が示唆された。同定した CNV の中には、統合失調症、自閉スペクトラム症、双極性障害との関連が既に報告されている PCDH15 (N=5)、DLG2 (N=5)、CACNA1C (N=1)、NRXN1 (N=1)、DISC1 (N=2) 等の遺伝子の欠失が含まれていた。PCDH15 は、プロトカドヘリンをコードする遺伝子の 1 つで、アッシャー症候群の原因遺伝子としても報告されている。本研究では、双極性障害患者 5 名で PCDH15 欠失が同定され、既報でも複数の患者で *de novo* CNV が報告されていることから、双極性障害との関連が強く示唆された。

次に、双極性障害の発症メカニズムを明らかにするために、CNV データに基づいて遺伝子セット解析を実施した。具体的には、GO に登録された遺伝子セットを用いて、健常者 CNV と比較して患者 CNV が有意に集積する遺伝子セットを、既報 (PLoS Genet. 2010 Sep 9;6(9):e1001097) のロジスティック回帰分析に基づいた方法を用いて検討した。

解析は、欠失のみ、重複のみ、欠失+重複の3パターンに分けて実施し、患者 CNV が有意 (FDR  $q < 0.1$ ) にエンリッチした遺伝子セットを各 26 個、5 個、17 個同定した。このセットの中には、脂質代謝 (GO:0008610 lipid biosynthetic process, GO:0046467 membrane lipid biosynthetic process)、クロマチン修飾 (GO:0016569 covalent chromatin modification)、脳発達 (GO:0021953 central nervous system neuron differentiation; GO:0030902 hindbrain development) に関連したものがあり、双極性障害の病態に関与することが示唆された。脂質代謝と双極性障害の関連性は、近年報告された全ゲノム関連解析でも示唆されており、今後さらに検討する必要がある。

最後に、慶應義塾大学の岡野教授のグループと共同で、*PCDH15* 欠失を有する双極性障害患者 2 名から樹立した iPS 細胞を用いて、患者神経細胞の特徴を調べた。具体的には、グルタミン酸作動性あるいは GABA 作動性神経細胞に分化誘導したうえで、健常者の同細胞と細胞形態の比較を行った。その結果、患者由来の両神経細胞で、樹状突起の短縮やシナプス数の減少を認めた。さらに遺伝子編集技術で *PCDH15* を人工的に欠失させた健常者由来 iPS 細胞から作製した神経細胞においても、同様の形態学的な変化が観察された。これらの知見は、双極性障害のリスクに関わる *PCDH15* 欠失が細胞レベルでどのような生物学的な影響を及ぼすかを明らかにするもので、双極性障害の発症メカニズムの解明に繋がる成果といえる。将来的には、このモデル細胞を用いた解析から治療標的が同定され、新規治療薬の開発が進むことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishizuka K, Tabata H, Ito H, Kushima I, Noda M, Yoshimi A, Usami M, Watanabe K, Morikawa M, Uno Y, Okada T, Mori D, Aleksic B, Ozaki N, Nagata KI.	4. 巻 96
2. 論文標題 Possible involvement of a cell adhesion molecule, Migfilin, in brain development and pathogenesis of autism spectrum disorders.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 789-802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jnr.24194.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kimura H, Kushima I, Yohimi A, Aleksic B, Ozaki N.	4. 巻 21
2. 論文標題 Copy Number Variant in the Region of Adenosine Kinase (ADK) and Its Possible Contribution to Schizophrenia Susceptibility.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Neuropsychopharmacol.	6. 最初と最後の頁 405-409
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ijnp/pyx103.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yu Y, Lin Y, Takasaki Y, Wang C, Kimura H, Xing J, Ishizuka K, Toyama M, Kushima I, Mori D, Arioka Y, Uno Y, Shiino T, Nakamura Y, Okada T, Morikawa M, Ikeda M, Iwata N, Okahisa Y, Takaki M, Sakamoto S, Someya T, Egawa J, Usami M, Kodaira M, Yoshimi A, Oya-Ito T, Aleksic B, Ohno K, Ozaki N.	4. 巻 8
2. 論文標題 Rare loss of function mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and their contributions to schizophrenia susceptibility.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transl Psychiatry.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-017-0061-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kunisawa K, Shimizu T, Kushima I, Aleksic B, Mori D, Osanai Y, Kobayashi K, Taylor AM, Bhat MA, Hayashi A, Baba H, Ozaki N, Ikenaka K.	4. 巻 147
2. 論文標題 Dysregulation of schizophrenia-related aquaporin 3 through disruption of paranode influences neuronal viability.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 395-408.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jnc.14553.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kushima I, Arioka Y, Mori D, Ozaki N. et al.	4. 巻 24
2. 論文標題 Comparative Analyses of Copy-Number Variation in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Reveal Etiological Overlap and Biological Insights.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 2838-2856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.08.022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Takaya, Ishikawa Mitsuru, Fujimori Koki, Maeda Takuji, Kushima Itaru, Arioka Yuko, Mori Daisuke, Nakatake Yuhki, Yamagata Bun, Nio Shintaro, Kato Takahiro A., Yang Nan, Wernig Marius, Kanba Shigenobu, Mimura Masaru, Ozaki Norio, Okano Hideyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 In Vitro Modeling of the Bipolar Disorder and Schizophrenia Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells with Copy Number Variations of PCDH15 and RELN	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0403-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi S, Ninomiya K, Kushima I, et al.	4. 巻 74
2. 論文標題 Polygenic risk scores in schizophrenia with clinically significant copy number variants.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry Clin Neurosc	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12926	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Ryo, Koebis Michinori, Nagai Taku, Shimizu Kimiko, Liao Jingzhu, Wulaer Bolati, Sugaya Yuki, Nagahama Kenichiro, Uesaka Naofumi, Kushima Itaru, Mori Daisuke, Maruyama Kazuaki, Nakao Kazuki, Kurihara Hiroki, Yamada Kiyofumi, Kano Masanobu, Fukada Yoshitaka, Ozaki Norio, Aiba Atsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Comprehensive analysis of a novel mouse model of the 22q11.2 deletion syndrome: a model with the most common 3.0-Mb deletion at the human 22q11.2 locus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-0723-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sawahata Masahito, Mori Daisuke, Arioka Yuko, Kubo Hisako, Kushima Itaru, Kitagawa Kanako, Sobue Akira, Shishido Emiko, Sekiguchi Mariko, Kodama Akiko, Ikeda Ryosuke, Aleksic Branko, Kimura Hiroki, Ishizuka Kanako, Nagai Taku, Kaibuchi Kozo, Nabeshima Toshitaka, Yamada Kiyofumi, Ozaki Norio	4. 巻 74
2. 論文標題 Generation and analysis of novel Reln deleted mouse model corresponding to exonic Reln deletion in schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 318 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12993	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satterstrom F. Kyle, Kosmicki Jack A., Wang Jiebiao et al.	4. 巻 180
2. 論文標題 Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 568 ~ 584.e23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2019.12.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kushima I
2. 発表標題 A prospective cohort study of patients with 22q11.2 deletion syndrome aiming at early detection and treatment of psychiatric disorders.
3. 学会等名 CLEFT2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久島周
2. 発表標題 精神疾患のゲノム解析に基づいた病態研究
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----