

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22390223

研究課題名（和文）

統合失調症発症に関与するゲノムコピー数多型の解析

研究課題名（英文）

Genome-wide analysis of copy number variants in schizophrenia

研究代表者

尾崎 紀夫 (OZAKI NORIO)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40281480

研究成果の概要（和文）：日本人統合失調症を対象に高解像度ゲノムコピー数変異（CNV）解析を実施した。既報の大規模 CNV に加え、発症に関与しうる新規の小規模 CNV を同定した。小規模 CNV はリンパ芽球様細胞株で遺伝子発現に与える影響を確認した。*VIPR2* 重複の関連解析を実施したが、関連は認めなかった。本研究は高解像度 CNV 解析と遺伝子発現解析を組み合わせ、統合失調症の遺伝学的理解に新たな知見をもたらした。

研究成果の概要（英文）：We have performed high resolution genome wide copy number (CNV) screening of Japanese schizophrenic patients. Besides the known large CNVs that are previously reported to be associated with schizophrenia, we found novel variations. Smaller CNVs were followed up using lymphoblastoid cell lines (LCL) in order to measure expressional impact. No association between *VIPR2* duplication and schizophrenia was identified. In conclusion, our study demonstrated that combination of high resolution CNV screening and transcriptomics is useful method for investigating genetic susceptibility to schizophrenia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、ゲノム、コピー数多型、神経発達、CNV

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は一般人口における発症頻度が約1%と common disease であり、また思春期青年期に発症するが、治療に対する反応性が不良の例も多いが、その病因・病態が不明で、結果的に根本的な予防・治療策の探索が困難となっている。

統合失調症の疫学研究から、発症には遺伝要因が強く関与することが示唆されており、

本疾患の病因・病態を探索すべくゲノム解析がなされてきた。我々も、統合失調症のゲノム解析において、頻度の高い疾患(common disease)は、発症に対する影響が弱い多数の頻度の高い遺伝子変異(common variant)によって発症に至るとする common disease common variant (CD-CV)仮説に則り、日本人統合失調症の全ゲノム関連解析(GWAS)を行ったが、頻度の高い single nucleotide

polymorphism (SNP)が病因論的な意義を持つことは確認できなかった。

統合失調症など遺伝率(heritability)が高い疾患において、GWASによる遺伝因子同定が成功していない”Missing Heritability”の要因として、common variant は発症に与える効果が小さく、サンプル数が極めて大きな GWAS でなければ有意な関連が検出出来ないことが挙げられる。さらに、遺伝統計学的に有意な所見が得られたとしても、影響の小さな common variant を生物学的に意義づけることは困難である。

以上を踏まえて、common disease は、発症に対する影響が強い少数の頻度の低い遺伝子変異(rare variant)によって発症に至るとする common disease rare variant(CD-RV) 仮説に則ったゲノム解析を実施する本研究を着想するに至った。例えば、1 番染色体を含む転座を有する統合失調症の多発家系 (DISC1 家系)、22 番染色体を欠失する velocardiofacial syndrome は CD-RV 仮説を支持する例である。

さらに、ゲノム配列を解読する技術が急激に進歩し、大規模サンプルを現実的なコストでシーケンスすることが可能になってきたことや、これまで解析が困難であった染色体の構造異常を全ゲノムで比較的容易に、かつ正確に解析する技術 (array CGH) が利用できるようになったことも CD-RV 仮説に則る検証を進めることが出来るに至った要因である。

以上、遺伝子解析技術の進歩、大規模なサンプル収集も進み、CD-RV 仮説に基づいた統合失調症の遺伝解析が世界的に始まりつつあった。

また、これまでも統合失調症の研究で CNV に焦点をあて、SNP アレイを用いて解析したものがあつたが、1) DNA を制限酵素で断片化したのち、増幅することによるアーチファクトが生じる危険、2) CNV が起こりやすい segmental duplication を含む領域のプロンプが少なく、3) CNV を予測するアルゴリズムの不完全性などの問題が指摘されている。現時点で CNV を高い信頼性を持って解析できるのは array CGH であり、本課題では array CGH を用い、信頼性の高いデータに基づいた解析を行うことにした。

2. 研究の目的

日本人統合失調症の発症に関わる稀な CNV を、array CGH により全ゲノムで探索した。さらに、同定した CNV と統合失調症との関連解析、遺伝子発現への影響、臨床表現型の検討を実施し、同定された CNV の病因・病態への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

1) CNV のスクリーニング解析

日本人統合失調症患者 1000 名、健常者 800 名を対象として、稀な CNV のスクリーニングを行った。解析は NimbleGen array CGH (aCGH; 720k) を用い、全ゲノムを対象に実施した。なお、aCGH のデータ処理では FASST segmentation を用いた。

2) 統合失調症患者群、健常者群間での CNV 数の比較

統合失調症患者群は、健常者群に比べて病的意義のある稀な大規模 CNV の総数が多いといとの報告がある。我々は日本人統合失調症患者の全ゲノム CNV データを用いて当該所見の確認を行った。

3) スクリーニングで同定された CNV の確認および詳細な解析

スクリーニングで同定した稀な CNV の中から、患者群に特異的に見られ、これまでに統合失調症との関連が報告された遺伝子、または神経発達に深く関与する遺伝子に存在する CNV を選択した。所見の確認とその詳細な構造解析を行う目的で、さらに高解像度の array CGH で再解析を行った。

4) 同定された CNV の遺伝子発現に与える影響の解析

CNV が同定された統合失調症患者から末梢血サンプルを収集し、CNV の機能解析を行った。解析には、リンパ球を不活化後、リンパ芽球様細胞株を樹立し、検体として使用することで、治療薬や併発する身体疾患などによる非特異的な状態依存性因子の影響を最小化したサンプルを用いた。これらの細胞株から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法を用いた解析を行い、CNV によって遺伝子の発現に与える影響を検証した。

5) 単一家系内での CNV の分離解析

(segregation analysis)

同定された CNV が患者を含む家系内で疾患と共分離するか検討し、CNV と統合失調症の因果関係の明確化を試みた。先行研究から 1 つの CNV から多様な表現型 (精神疾患) が生じることが示唆されており、本解析から CNV の多面発現性 (pleiotropy) も検討した。

4. 研究成果

1) 稀な大規模 CNV の探索結果

統合失調症の発症に関与する既報の大規模 CNV を多数同定した。その中には、1q21.1 欠失、2p16.3 欠失、3q29 欠失、7q36.3 重複、16p13.11 重複、16p11.2 重複、22q11.21 欠失が含まれる。これら大規模 CNV は神経発達に関与する遺伝子を複数含んでいる。高解像度の array CGH で再確認を行い、大規模 CNV の

多くが segmental duplication に近接する領域で起こっていることを確認した。また病的意義を有する大規模 CNV の総数は、患者群が健常者群に比べて有意に多いことを確認し、先行研究と一致する結果をえた。

2) 稀な小規模 CNV の探索結果

小規模 CNV も神経発達関連遺伝子で多数同定し、その多くは新規のものであった。その中には *CACNA1C*、*ASTN2*、*CHRNA7*、*ARHGAP10*、*VIPR2* の CNV も含まれていた。エキソン領域に重なり、遺伝子発現に機能的な影響を与えることが想定された。

3) 稀な小規模 CNV の遺伝子発現解析の結果と統合失調症との関連解析結果

CACNA1C は近年の遺伝子解析から、統合失調症や双極性障害の発症脆弱性に関与することが示されたことから、本遺伝子の欠失に着目した。*CACNA1C* の欠失はサンガー法を用いて塩基対レベルで範囲を決定し、遺伝子機能に与える影響を確認した。リンパ芽球様細胞株を材料とした発現比較解析から、*CACNA1C* の CNV (エキソン 44~47 の欠失 1 例) を有する患者では、他の統合失調症患者や健常者群と比較して *CACNA1C* 遺伝子の発現低下が認められた。また、*ARHGAP10* の CNV (エキソン 11~13 欠失 1 例とエキソン 16~19 欠失 1 例)、*CDK5RAP1* の CNV (エキソン 2~5 の欠失 2 例) を有する患者では、他の統合失調症患者や健常者と比較してそれぞれ *ARHGAP10* 遺伝子、*CDK5RAP1* 遺伝子の発現低下が認められた。

近年、*VIPR2* 重複と本疾患の遺伝統計学的な関連が報告されており、患者群 531 名、健常者群 711 名のサンプルで関連解析を実施したが、有意な関連は確認できなかった。

4) 稀な大規模 CNV の関連解析結果と多面発現性解析結果

22q11.21 欠失は、ケース・コントロール関連解析で本疾患と有意な関連を示した。22q11.21 欠失患者の臨床表現型として知的障害、先天性心疾患、特異な顔貌を高率に認めたが、一方で患者ごとのばらつきが大きいことも確認した。

さらに、予備的な解析として、22q11.2 欠失を有する 5 名の統合失調症患者を対象に全ゲノムシーケンシング解析を実施した。1 人当たり約 4,000,000 個の変異が見つかるため、発症に関与する変異を同定するためにはフィルタリングが重要となる。Ingenuity Variant Analysis (IVA) software を使い、dbSNP に登録された変異や 1000 Genomes Project/NHLBI ESP で頻度 0.1% 以上の変異は除外、さらに synonymous variants も除外し、second hit 変異の候補を稀で機能的な変異

(ミスセンス、ノンセンス変異など) に絞った。IVA を用いたパスウェイ解析の結果、Actin Cytoskeleton Signaling、Protein Kinase A Signaling の関与を示唆する結果を得た。さらに 22q11.2 領域の遺伝子で 3 個の新規ミスセンス変異を同定した。これら稀な変異は 22q11.21 欠失を有する患者の表現型のばらつきに関与すると想定される。

5) 稀な大規模 CNV の家系解析結果

家系解析は 16p13.11 重複、15q11.2-15q13.11 重複について実施したが、ともに両親のいずれか一方に由来していた。16p13.11 重複を有する患者の父親は精神疾患の既往を確認できず、CNV の浸透率が必ずしも高くないことを示す結果であった。なお、*de novo* CNV は本研究では同定できなかった。

以上、本研究から統合失調症の発症に関与する多数の CNV を同定することに成功し、病因・病態への関与を明らかにした。

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 24 件)

1) Tanaka S, Syu A, Ishiguro H, Inada T, Horiuchi Y, Ishikawa M, Koga M, Noguchi E, Ozaki N, Someya T, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T, DPP6 as a candidate gene for neuroleptic-induced tardive dyskinesia, *Pharmacogenomics J*, 査読有、13(1)、2013、27-34
DOI:10.1038/tpj.2011.36

2) Horiuchi Y, Iida S, Koga M, Ishiguro H, Iijima Y, Inada T, Watanabe Y, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Tochigi M, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T, Association of SNPs linked to increased expression of SLC1A1 with schizophrenia, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 査読有、159B(1)、2012、30-37
DOI:10.1002/ajmg.b.31249

3) Kishi T, Fukuo Y, Okochi T, Kawashima K, Kitajima T, Inada T, Ozaki N, Musso GM, Kane JM, Correll CU, Iwata N, Serotonin 6 receptor gene and schizophrenia: case-control study and meta-analysis, *Hum Psychopharmacol*, 査読有、27(1)、2012、63-69

4) Kitazawa M, Ohnuma T, Takebayashi Y, Shibata N, Baba H, Ohi K, Yasuda Y, Nakamura Y, Aleksic B, Yoshimi A, Okochi T, Ikeda M, Naitoh H, Hashimoto R, Iwata

N, Ozaki N, Takeda M, Arai H、No associations found between the genes situated at 6p22.1, HIST1H2BJ, PRSS16, and PGBD1 in Japanese patients diagnosed with schizophrenia、Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet、査読有、159B(4)、2012、456-464
DOI: 10.1002/ajmg.b.32049

5) Koide T, Banno M, Aleksic B, Yamashita S, Kikuchi T, Kohmura K, Adachi Y, Kawano N, Kushima I, Nakamura Y, Okada T, Ikeda M, Ohi K, Yasuda Y, Hashimoto R, Inada T, Ujike H, Iidaka T, Suzuki M, Takeda M, Iwata N, Ozaki N、Common Variants in MAGI2 Gene Are Associated with Increased Risk for Cognitive Impairment in Schizophrenic Patients、PLoS One、査読有、7(5)、2012、e36836
DOI: 10.1371/journal.pone.0036836

6) Kushima I, Nakamura Y, Aleksic B, Ikeda M, Ito Y, Shiino T, Okochi T, Fukuo Y, Ujike H, Suzuki M, Inada T, Hashimoto R, Takeda M, Kaibuchi K, Iwata N, Ozaki N、Resequencing and Association Analysis of the KALRN and EPHB1 Genes And Their Contribution to Schizophrenia Susceptibility、Schizophr Bull、査読有、38(3)、2012、552-560
DOI: 10.1093/schbul/sbq118

7) Matsunaga S, Ikeda M, Kishi T, Fukuo Y, Aleksic B, Yoshimura R, Okochi T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Umene-Nakano W, Inada T, Kunugi H, Kato T, Yoshikawa T, Ujike H, Nakamura J, Ozaki N, Kitajima T, Iwata N、An evaluation of polymorphisms in casein kinase 1 delta and epsilon genes in major psychiatric disorders、Neurosci Lett、査読有、529(1)、2012、66-69
DOI: 10.1016/j.neulet.2012.08.070

8) Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Okada T, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H, Numata S, Ikeda M, Ohnuma T, Iwata N, Ueno S, Ozaki N, Ohmori T, Arai H, Takeda M、Functional genetic variation at the NRG1 gene and schizophrenia: Evidence from a gene-based case-control study and gene expression analysis、Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet、査読有、159B(4)、2012、405-413
DOI: 10.1002/ajmg.b.32043

9) Torii Y, Iritani S, Sekiguchi H, Habuchi C, Hagikura M, Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Ozaki N、Effects of aging on the morphologies of Heschl's gyrus and the

superior temporal gyrus in schizophrenia: A postmortem study、Schizophr Res、査読有、134(2-3)、2012、137-142
DOI: 10.1016/j.schres.2011.10.024

10) Watanabe Y, Egawa J, Iijima Y, Nunokawa A, Kaneko N, Shibuya M, Arinami T, Ujike H, Inada T, Iwata N, Tochigi M, Kunugi H, Itokawa M, Ozaki N, Hashimoto R, Someya T、A two-stage case-control association study between the tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene and schizophrenia in a Japanese population、Schizophr Res、査読有、137(1-3)、2012、264-266
DOI: 10.1016/j.schres.2012.01.034

11) Takahashi N, Nielsen KS, Aleksic B, Petersen S, Ikeda M, Kushima I, Vacaresse N, Ujike H, Iwata N, Dubreuil V, Mirza N, Sakurai T, Ozaki N, Buxbaum JD, Sap J、Loss of Function Studies in Mice and Genetic Association Link Receptor Protein Tyrosine Phosphatase alpha to Schizophrenia、査読有、70 (7)、2011、626-635
DOI: 10.1016/j.biopsych.2011.06.016

12) Sekiguchi H, Iritani S, Habuchi C, Torii Y, Kuroda K, Kaibuchi K, Ozaki N、Impairment of the tyrosine hydroxylase neuronal network in the orbitofrontal cortex of a genetically modified mouse model of schizophrenia、査読有、1392、2011、47-53
DOI: 10.1016/j.brainres.2011.03.058

13) Niwa M, Matsumoto Y, Mouri A, Ozaki N, Nabeshima T、Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders、Int J Neuropsychopharmacol、査読有、14 (4)、2011、459-477
DOI: 10.1017/S1461145710001239

14) Ikeda M, Aleksic B, その他 20 名, Ozaki N, O'Donovan MC, Iwata N、Genome-wide association study of schizophrenia in a Japanese population、Biol Psychiatry、査読有、69 (5)、2011、472-478
DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.07.010

15) Yoshimi A, et al、Gene-wide association study between the methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and schizophrenia in the Japanese population, with an updated meta-analysis on currently available data、Schizophr Res、査読有、124 (1-3)、2010、216-222
DOI: 10.1016/j.schres.2010.07.011

16) Takahashi M, et al、Diagnostic

classification of schizophrenia by neural network analysis of blood-based gene expression signatures, Schizophr Res、査読有、119 (1-3)、2010、210-218
DOI:10.1016/j.schres.2009.12.024

17) Syu A, et al, Association of the HSPG2 gene with neuroleptic-induced tardive Dyskinesia、Neuropsychopharmacology、査読有、35 (5)、2010、1155-1164
DOI:10.1038/jhg.2009.139

18) Kushima I, et al, Association study of ubiquitin-specific peptidase 46 (USP46) with bipolar disorder and schizophrenia in a Japanese population、J Hum Genet、査読有、55 (3)、2010、133-136
DOI:10.1038/jhg.2010.38

19) Koide T, et al, A two-stage case-control association study of the dihydropyrimidinase-like 2 gene (DPYSL2) with schizophrenia in Japanese subjects、J Hum Genet、査読有、55 (7)、2010、469-472
DOI:10.1038/jhg.2010.38

20) Ishiguro H, et al, Supportive evidence for reduced expression of GNB1L in schizophrenia、Schizophr Bull、査読有、36 (4)、2010、756-765
DOI: 10.1093/schbul/sbn160

21) Ishiguro H, et al, Brain cannabinoid CB2 receptor in schizophrenia、Biol Psychiatry、査読有、67(10)、2010、974-982
DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.09.024

22) Ikeda M, et al, Identification of novel candidate genes for treatment response to risperidone and susceptibility for schizophrenia: integrated analysis among pharmacogenomics, mouse expression, and genetic case-control association approaches、Biol Psychiatry、査読有、67 (3)、2010、263-9
DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.08.030

23) Ikeda M, et al, Copy number variation in schizophrenia in the Japanese population、Biol Psychiatry、査読有、67 (3)、2010、283-6
DOI: 10.1016/j.biopsych.2009.08.034

24) Aleksic B, et al, Genetic association study of

KREMEN1 and DKK1 and schizophrenia in a Japanese population、Schizophr Res、査読有、118 (1-3)、2010、113-7
DOI: 10.1016/j.schres.2010.01.014.

[学会発表] (計 3 件)

1) Ozaki N, Myelin-related abnormality of schizophrenia: genetic, imaging and postmortem study, the 15th Pacific Rim

College of Psychiatrists Scientific Meeting (PRCP 2012) Symposium Genetics of Schizophrenia、2012年10月25日、Seoul, Korea

2) 尾崎紀夫、Protein tyrosine phosphatase alufa as novel candidate molecule for the etiopathology of

schizophrenia: Genetic analysis and biological implications、第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、横浜

3) Ozaki N、Genome study of Japanese schizophrenia: GWAS, CNV and Rare variants: Symposium: Neuroscience and neurochemistry in Japan、WFSBP Congress 2011、2011年5月31日、Prague

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 統合失調症マーカー及びその利用

発明者: 尾崎紀夫、永井拓、吉見陽、山田真之亮

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特願

番号: 2010-147017

出願年月日: 2010. 6. 29

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 紀夫 (OZAKI NORIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40281480

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

貝淵 弘三 (KAIBUCHI KOZO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00169377

岩田 仲生 (IWATA NAKAO)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 60312112