

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19720

研究課題名(和文)統合失調症のゲノムコピー数変異解析とバイオインフォマティクスを用いた分子病態研究

研究課題名(英文) Copy number variation analysis of schizophrenia and elucidation of molecular pathogenesis using bioinformatic approach

研究代表者

久島 周(Kushima, Itaru)

名古屋大学・高等研究院(医)・特任助教

研究者番号：00732645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アレイCGHを用いて、統合失調症1699名、健常者824名を対象にゲノムコピー数変異(CNV)解析を実施した。発症関連CNVは、健常者と比較して患者で有意に頻度が高かった(オッズ比=3.04、 $P=9.3 \times 10^{-9}$)。発症関連CNVを持つ患者では、41.7%に先天性・発達上の問題が認められ、さらに抗精神病薬に対する治療抵抗性を示す割合が有意に高かった(オッズ比=2.79、 $P=0.0036$)。遺伝子セット解析からは先行研究で示唆されていたシナプスの関与を再確認し、新しい生物学的パスウェイとして酸化ストレス応答、ゲノム安定性、低分子量GTPアーゼの関与を見出した。

研究成果の概要(英文)：Using array comparative genomic hybridization, we performed a genome-wide CNV analysis (1699 SCZ cases and 824 controls). Clinically significant CNVs were significantly more frequent in cases than in controls (odds ratio=3.04, $P=9.3 \times 10^{-9}$). In patients with clinically significant CNVs, 41.7% had a history of congenital/developmental phenotypes, and the rate of treatment resistance was significantly higher (odds ratio=2.79, $P=0.0036$). Gene set analysis replicated previous findings (e.g., synapse) and identified novel biological pathways including oxidative stress response, genomic integrity, kinase and small GTPase signaling.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 ゲノムコピー数変異

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は全人口の約1%が罹患し、発症後に長期間の薬物治療を要し、生活機能が低下するため患者、家族の苦悩や社会的損失は甚大である。新たな治療薬が導入されているが、十分な治療効果が得られない患者も多く、わが国では約17万人の患者が入院を余儀なくされている。従って、病因・病態の理解に基づいた診断法・治療法の開発が喫緊の課題となっている。

多数の疫学研究から、統合失調症の発症に遺伝要因が強く関与することが知られている。近年のゲノム解析技術の進歩を背景に、発症に強い影響を与える頻度の低い稀な遺伝子変異が多数同定されつつある。その1つである、ゲノムコピー数変異 (copy number variation; CNV) は染色体上のゲノム 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) となる変異を指す。これまでの研究から複数の稀な (<1%) 大規模 CNV が統合失調症のリスク変異として同定されている。一方でこれら病的意義のある CNV を持った統合失調症患者の臨床的特徴については十分に明らかにされていない。また病的意義が既に明確になっている CNV 以外にも多数の稀な CNV が同定されているが、患者で同定した CNV が全体としてどのような生物学的機能に影響を与えるかについても十分に明確にされていない。これらの点を明らかにすることは、ゲノム解析に基づいた補助診断検査法の確立、病因・病態の解明や創薬に役立つことが期待される。

2. 研究の目的

統合失調症患者と健常者を対象に、全ゲノムを対象とした CNV 解析を実施し、次の点を明らかにする。

(1) 患者と健常者で発症に関連する CNV を同定し、統合失調症の遺伝的異質性を明確化する。

(2) 発症関連 CNV をもつ統合失調症患者の臨床的特徴を明らかにする。

(3) CNV データに基づいて、統合失調症の病態に關与する生物学的パスウェイを同定する。

3. 研究の方法

(1) 被験者

1745名の統合失調症患者、837名の健常者を対象とした。患者は Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, Forth Edition に基づき、統合失調症の診断を受けた者である。健常者は質問紙等で精神障害を有していないことを確認した。各被験者からは書類を用いて研究の説明を行い、書面で同意を得た。本研究は名古屋大学医学部および共同研究施設の倫理委員会で承認を受けた上で実施した。

(2) CNV 解析

アレイ CGH (NimbleGen 720k Whole-Genome Tiling arrays) を用いて、プロトコールに従って CNV 解析を実施した。CNV calling は Nexus Copy Number software v.7.5 を用いて Fast Adaptive States Segmentation Technique 2 algorithm に基づいて行った。同定した CNV に基づいてサンプルレベルと CNV のレベルで、quality control を行い、頻度1%以下の稀な CNV を得た。CNV の再現性の確認は、quantitative real-time PCR を用いて実施した。

(3) 発症関連 CNV の抽出

American College of Medical Genetics のガイドラインに基づいて CNV の病的意義を判定し、発症関連 CNV を抽出した。具体的には、既報で統合失調症や神経発達症との関連が報告された CNV、サイズが1Mbを超える大規模 CNV、de novo であることが確認できた CNV などが発症関連 CNV に含まれる。

(4) 表現型解析

発症関連 CNV をもつ統合失調症患者の表現型を後方視的に調査した。具体的な臨床情報として、先天性疾患、発達上の問題、統合失調症の発症年齢、精神症状、抗精神病薬投与量、治療反応性等を確認した。

(5) 遺伝セット解析

患者と健常者で同定した CNV データに基づいて、患者 CNV が有意に集積する生物学的パスウェイを探索した。遺伝子セットは、gene ontology (GO) の遺伝子セットを用いた。解析は Raychaudhuri らが使用した方法 (引用文献) すなわち、ロジスティック回帰モデルを用いて、患者・健常者間の CNV サイズ、頻度の違い等のバイアスを考慮した方法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) Quality control をパスした 1699 名の統合失調症患者と 824 名の健常者において、合計で 7066 個の頻度の稀な (<1%) CNV を得た。CNV の再現性の確認を quantitative real-time PCR を用いて実施した結果、314 個の CNV 中、312 個 (99.4%) は確認できた。

American College of Medical Genetics の基準に基づいて CNV の病的意義を評価し、発症と関連する CNV を患者 153 名 (9.0%)、健常者 26 名 (3.2%) で同定した。従って、発症関連 CNV の頻度は、健常者と比べて統合失調症患者で有意に高かった (オッズ比=3.04、 $P=9.3 \times 10^{-9}$)。患者で同定した発症関連 CNV は多様であり、本疾患の遺伝的異質性を明確化した。

(2) 臨床表現型解析：発症関連 CNV をもつ患者 108 名の臨床表現型を後方視的に調べた結果、42% の患者で先天性疾患や発達上の問題を認めた。また抗精神病薬への治療反応性

に関しては、発症関連 CNV をもつ患者はそれ以外の患者と比較して、治療抵抗性を示す割合が有意に高いことを明らかにした (36% vs 17%, オッズ比=2.79, $p=0.0036$)。

(3) 遺伝セット解析

患者 CNV が有意に集積する生物学的パスウェイを探索した結果、53 の遺伝子セットが有意 (FDR $q < 0.01$) になり、とくに 31 の遺伝子セットは既報の研究で生物学的妥当性が示唆された。これら 31 の遺伝子セットは、9 つの機能的カテゴリー (oxidative stress response, genomic integrity, gene expression regulation, cell adhesion, neurotrophin signaling, kinase, synapse, small GTPase signaling, endocytosis) に分類できた。この結果は統合失調症の分子病態には多様な生物学的パスウェイが関与することを強く示唆する。特に酸化ストレスは既報で多数の報告があるが、本結果はその遺伝的基盤を明らかにした点で重要である。

< 引用文献 >

Raychaudhuri S, Korn JM, McCarroll SA, Altshuler D, Sklar P, Purcell S et al. Accurately assessing the risk of schizophrenia conferred by rare copy-number variation affecting genes with brain function. PLoS Genet 2010; 6: e1001097.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Shiino T, Yoshimi A, Kimura H, Takasaki Y, Wang C, Xing J, Ishizuka K, Oya-Ito T, Nakamura Y, Arioka Y, Maeda T, Yamamoto M, Yoshida M, Noma H, Hamada S, Morikawa M, Uno Y, Okada T, Iidaka T,

Iritani S, Yamamoto T, Miyashita M, Kobori A, Arai M, Itokawa M, Cheng MC, Chuang YA, Chen CH, Suzuki M, Takahashi T, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T, Ikeda M, Toyota T, Yoshikawa T, Numata S, Ohmori T, Kunimoto S, Mori D, Iwata N, Ozaki N. High-resolution copy number variation analysis of schizophrenia in Japan. *Mol Psychiatry*. 2017 Mar;22(3):430-440. 査読有 doi:10.1038/mp.2016.88.

Takasaki Y, Koide T, Wang C, Kimura H, Xing J, Kushima I, Ishizuka K, Mori D, Sekiguchi M, Ikeda M, Aizawa M, Tsurumaru N, Iwayama Y, Yoshimi A, Arioka Y, Yoshida M, Noma H, Oya-Ito T, Nakamura Y, Kunimoto S, Aleksic B, Uno Y, Okada T, Ujike H, Egawa J, Kuwabara H, Someya T, Yoshikawa T, Iwata N, Ozaki N. Mutation screening of GRIN2B in schizophrenia and autism spectrum disorder in a Japanese population. *Sci Rep*. 2016 Sep 12;6:33311. 査読有 doi: 10.1038/srep33311.

Kimura H, Wang C, Ishizuka K, Xing J, Takasaki Y, Kushima I, Aleksic B, Uno Y, Okada T, Ikeda M, Mori D, Inada T, Iwata N, Ozaki N. Identification of a rare variant in CHD8 that contributes to schizophrenia and autism spectrum disorder susceptibility. *Schizophr Res*. 2016 Dec;178(1-3):104-106. 査読有 doi: 10.1016/j.schres.2016.08.023.

Xing J, Kimura H, Wang C, Ishizuka K, Kushima I, Arioka Y, Yoshimi A, Nakamura Y, Shiino T, Oya-Ito T, Takasaki Y, Uno Y, Okada T, Iidaka T, Aleksic B, Mori D,

Ozaki N. Resequencing and Association Analysis of Six PSD-95-Related Genes as Possible Susceptibility Genes for Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. *Sci Rep*. 2016 Jun 7;6:27491. 査読有 doi: 10.1038/srep27491.

Isles AR, Ingason A, Lowther C, Walters J, Gawlick M, Stöber G, Rees E, Martin J, Little RB, Potter H, Georgieva L, Pizzo L, Ozaki N, Aleksic B, Kushima I, Ikeda M, Iwata N, Levinson DF, Gejman PV, Shi J, Sanders AR, Duan J, Willis J, Sisodiya S, Costain G, Werge TM, Degenhardt F, Giegling I, Rujescu D, Hreidarsson SJ, Saemundsen E, Ahn JW, Ogilvie C, Girirajan SD, Stefansson H, Stefansson K, O'Donovan MC, Owen MJ, Bassett A, Kirov G. Parental Origin of Interstitial Duplications at 15q11.2-q13.3 in Schizophrenia and Neurodevelopmental Disorders. *PLoS Genet*. 2016 May 6;12(5):e1005993. 査読有 doi: 10.1371/journal.pgen.1005993.

Ishizuka K, Kimura H, Wang C, Xing J, Kushima I, Arioka Y, Oya-Ito T, Uno Y, Okada T, Mori D, Aleksic B, Ozaki N. Investigation of Rare Single-Nucleotide PCDH15 Variants in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. *PLoS One*. 2016 Apr 8;11(4):e0153224. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0153224.

Kimura H, Tsuboi D, Wang C, Kushima I, Koide T, Ikeda M, Iwayama Y, Toyota T, Yamamoto N, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Banno M, Xing J, Takasaki Y,

Yoshida M, Aleksic B, Uno Y, Okada T, Iidaka T, Inada T, Suzuki M, Ujike H, Kunugi H, Kato T, Yoshikawa T, Iwata N, Kaibuchi K, Ozaki N. Identification of Rare, Single-Nucleotide Mutations in NDE1 and Their Contributions to Schizophrenia Susceptibility. Schizophr Bull. 2015 May;41(3):744-53. 査読有 doi: 10.1093/schbul/sbu147.

(4)研究協力者
なし

〔学会発表〕(計2件)

久島 周、統合失調症の高解像度ゲノムコピー数変異解析、第38回日本生物学的精神医学会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)、2016.9.8

Itaru Kushima, Copy number variations in schizophrenia, 4th Asian Congress of Schizophrenia Research, Taipei (Taiwan), 2015.11.19

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/seisin/>

報道関係情報

本成果は、2016年6月21日の中日新聞で報道された。

6. 研究組織

(1)研究代表者

久島 周 (KUSHIMA Itaru)

名古屋大学・高等研究院(医)・特任助教

研究者番号:00732645

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究

なし