

令和元年6月18日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09275

研究課題名(和文)エクソーム解析による摂食障害原因変異の網羅的探索

研究課題名(英文) Identification of eating disorder susceptibility variants by whole-exome sequencing

研究代表者

安藤 哲也 (Ando, Tetsuya)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 行動医学研究部・室長

研究者番号：50311428

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)：摂食障害罹患同胞対または母子を含む10家族36個体の全エクソームシーケンスを実施し、変異の検出、アノテーションを行い、日本人集団で極めて頻度が低く(0.1%以下)、各家族の罹患者間で一致かつ健常者に存在しない変異で、生物学的に有害と予測されるものに絞り込み、2個の変異に到達した。それぞれcorticotropin releasing hormone receptor 2 (CRHR2)とglutamate metabotropic receptor 8 (GRM8)の遺伝子上に存在し、いずれもアミノ酸に変異を生じる非同義置換であった。摂食障害の原因遺伝子の候補、2遺伝子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRHR2はストレス応答時に視床下部から分泌されるホルモン CRHの受容体遺伝子である。CRHR2にCRHが結合すると脳下垂体からのACTH分泌が刺激され、ACTHは副腎皮質からコルチゾールの分泌を促進する。コルチゾールは脳内で不安や食欲低下、交感神経の興奮に関係する。一方、CRHR2はCRHの作用のうち食欲抑制に関係する。GRM8は神経伝達物質のグルタミン酸の受容体遺伝子で脳で優勢に発現し、遺伝学的な解析により統合失調症、注意欠陥多動性障害、うつ病、摂食行動との関連が報告されてきた。いずれも摂食障害の候補遺伝子として期待され、今後は動物を用いた機能解析などさらに詳細な研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We performed whole-exome sequencing of 36 individuals in 10 families including eating disorder affected sib-pairs or a mother-daughter and extracted variants which were very rare (under 0.1%) in Japanese population, identical between patients in a family, not identical in healthy individuals, and estimated to be strongly deleterious by all 8 algorithm. These investigations identified two variants as candidate factors of eating disorder. One was located in corticotropin releasing hormone receptor 2 (CRHR2) and the other was located in glutamate metabotropic receptor 8 (GRM8). Both were variants with non-synonymous substitution which altered the amino acid sequence of these proteins. Previous studies have also suggested that these genes are associated with psychiatric disorders. Therefore, we have successfully identified two genes that could be candidates for the etiology of eating disorders

研究分野：心身医学

キーワード：摂食障害 エクソーム解析 原因遺伝子 変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

摂食障害（ED）の罹患感受性には遺伝的要因が関与している。双生児研究では、罹患感受性分散への寄与は神経性やせ症（AN）、神経性過食症（BN）ともに遺伝的要因が約 6 割、非共有環境が約 4 割とされる。家族内集積研究によると、AN 罹患の相対危険度は AN 発端者の女性第一度近親が 11.3、BN 発端者の女性第一度近親が 12.3、BN 罹患の相対危険度は AN 発端者の女性第一度近親が 4.2、BN 発端者の女性第一度近親が 4.4 であった。また AN と BN 間の遺伝相関は 0.46、非共有環境相関は 0.42 であり遺伝、環境要因ともに AN と BN 間で独立の要因と共通の要因が存在する(Wade, 2000、Bulik, 2000)。

罹患同胞対解析では AN の感受性領域が 1 番染色体上に示唆され(Grice, 2002)、BN では第 10 染色体上に連鎖領域が見いだされた (Bulik, 2003)。ゲノムワイド相関解析では AN と *CNTN5*、*SPATA17*(Nakabayashi K, 2009)、*ZNF804B*(Wang K, 2011)、*SOX2OT*、*PPP3CA*、*CUL3*、*FAM124B*、*SPATA13* 遺伝子(Boraska V 2014)との関連が示唆されたが、いずれもゲノムワイドの有意水準には達しなかった。

これまでの研究成果は、どの遺伝子座においても、疾患発症に対するリスクは低く、本疾患の遺伝分散の極わずかし説明できなかつた。これは他疾患でもほぼ同様に GWAS の潜在的な問題である。これに対し、エクソーム解析は精神神経疾患の遺伝学に対し、パラダイムシフトをもたらした。すなわち、これらの疾患の原因変異は GWAS で捕らえることが事実上不可能である、近年発生した集団中で頻度が極めて低い変異、もしくは *de novo* 変異であった(Nat Neurosci. 2014 Jun;17(6):764-72.)。しかし統合失調症や自閉症などではこれらの報告も多いが、摂食障害の報告はほとんど認められない。

2. 研究の目的

高い遺伝率で知られる摂食障害は、ゲノムワイド関連解析(GWAS)などが実施されているが、その多くを説明できる原因変異は見いだされていない。一方、統合失調症や自閉症などの精神神経疾患において、近年登場した全エクソンをシーケンシングするエクソーム解析により、多くの原因変異が同定されつつあるが、摂食障害において、このような報告はこれまでのところごく少数であり、国内では皆無である。そこで本研究の目的は、複数の摂食障害罹患同胞対家族を対象にエクソーム解析を行うことにより、摂食障害発症に寄与する原因変異ならびに遺伝子を同定することである。

3. 研究の方法

すでに収集されている摂食障害罹患患者 30 家族試料の中から、比較的遺伝性が強いと考えられている、生涯病型が一致した罹患同胞対がいる 8 家族、生涯病型が一致しない二卵性双生児罹患姉妹がいる 1 家族、さらに母子で罹患者がいる 1 家族の合計 10 家族、38 個体を対象に、全ゲノムエクソームシーケンシングを実施した。ゲノム DNA からアジレント社の Human All Exon V5 にてエクソン DNA 断片ライブラリーを調整し、イルミナ社の GAIII、hiseq2000 ならびに hiseq2500 にてシーケンシングを実施し、リード配列を獲得した。続いてクオリティーコントロールをパスしたリード配列を GTCh37/hg19 のヒトゲノム参照配列にマッピングし、変異の検出ならびにその変異のアノテーションを実施した。続いて、この変異のアノテーション情報に基

づいて、遺伝子重複領域、欠失挿入変異、非コード領域、同義置換、ならびに変異頻度が日本人集団で 0.1%以上のものを除外した。さらに家族内で疾患と一致する変異を抽出し、最終的にそれらの変異の生物に対する有害度を 8 種のプログラムにより予測し、候補の変異を厳選した。また、候補の変異はサンガーシーケンシング法による検証も行った。

4. 研究成果

10 家族、38 個体のエクソームシーケンシングの結果、2 家族で遺伝学的な家族関係に矛盾が認められたため、8 家族 30 個体のデータを用いて解析を行った。合計 633,030 個の変異を検出し、遺伝子重複領域、欠失挿入変異、非コード領域ならびに同義置換を除外すると、27,300 個の変異に絞られた。さて、このエクソーム解析による原因変異の同定は、集団中で極めて頻度が低く、個体に影響力が大きい変異の検出に有用である。そこで、日本人集団で 0.1%以下の頻度の変異を抽出すると、1,530 個の変異に絞り込まれた。さらに、各家族の罹患者間で一致し、健常者に存在しない変異に厳選すると、423 個の変異が抽出された。これらの変異の中で、最も生物学的に有害と予測される変異を厳選するために、8 種の予測プログラム (SIFT, Polyphen2, LRT, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, GERP++, PhyloP) を使い、これらすべての有害と判定された変異に厳選すると、2 個の変異にたどり着くことができた。さらに、これら 2 個の変異は、サンガーシーケンシングにて確認された (図 1)。

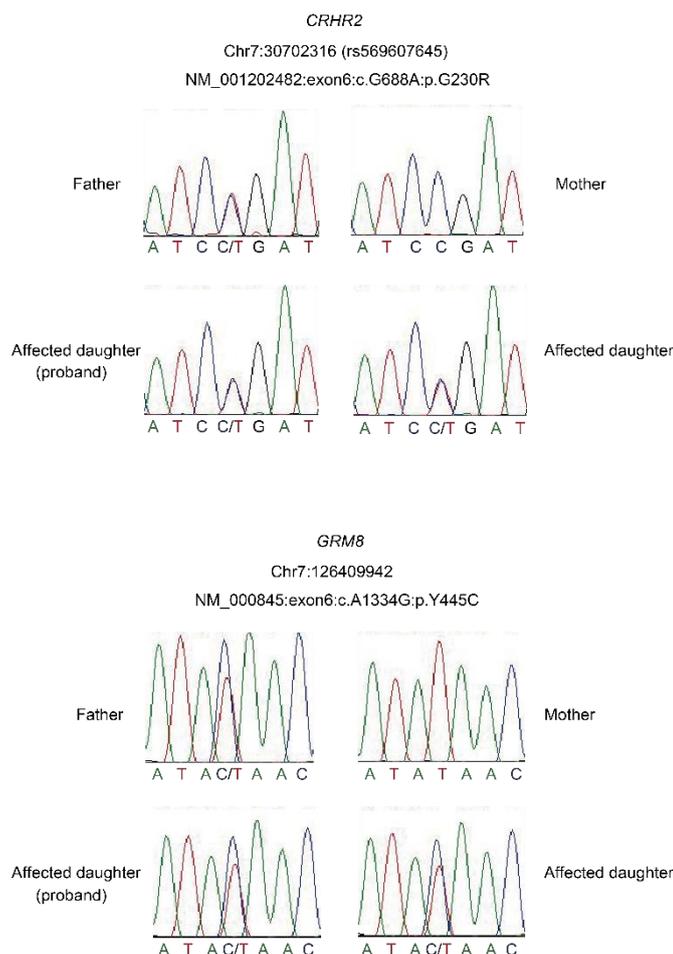


図 1. 候補変異のサンガーシーケンシング

これら 2 個の変異はそれぞれ corticotropin releasing hormone receptor 2 (*CRHR2*)、ならびに glutamate metabotropic receptor 8 (*GRM8*) の遺伝子上に存在し、*CRHR2* の変異 rs569607645 の日本人集団での頻度は 0.04%、*GRM8* の変異は全くの新規変異であり、それぞれ非同義置換であった (図 1)。この 2 つの遺伝子はどちらも G protein-coupled receptor (GPCR) のスーパーファミリーに属するものであった。これらの変異のアミノ酸の保存性を調査したところ、種を超えて保存され、遺伝子機能として重要な部位であると推定された (図 2, 3)。

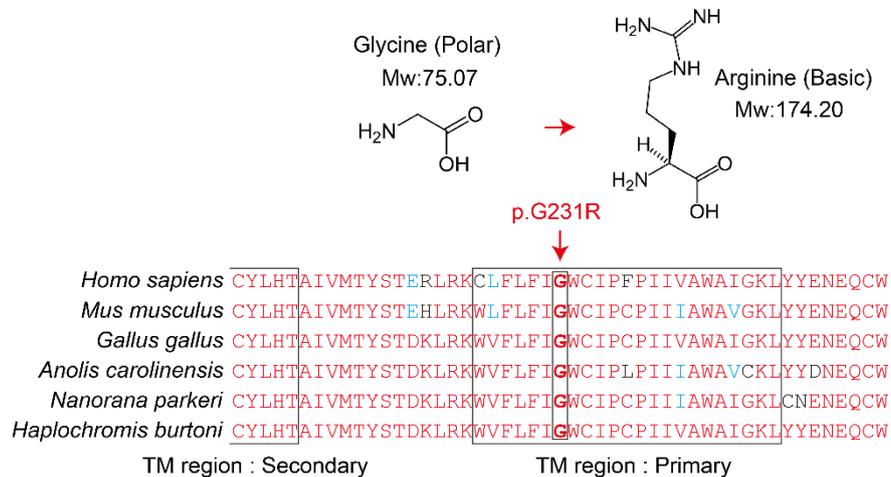


図 2. *CRHR2* のアミノ酸保存性と見出した変異

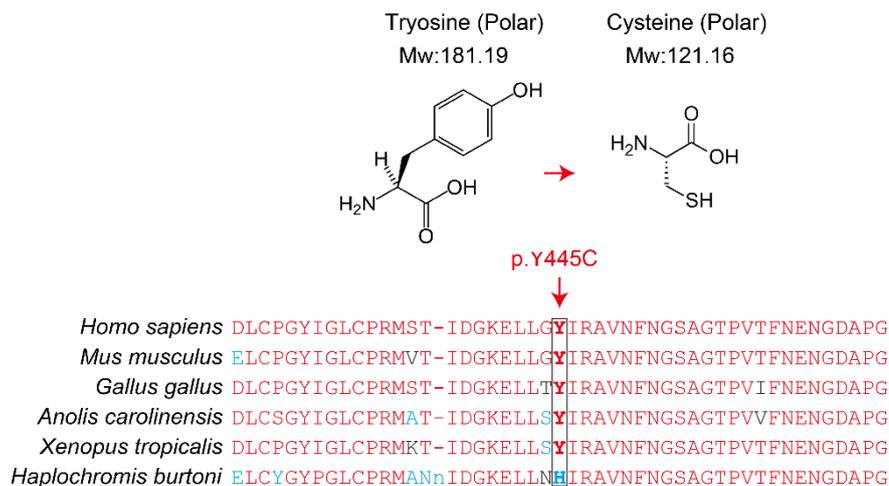


図 3. *GRM8* のアミノ酸保存性と見出した変異

CRHR2 はストレス応答時に視床下部の室傍核から分泌されるホルモン (CRH: corticotropin releasing hormone) のレセプターをコードしている遺伝子である。そして、*CRHR2* がこのホルモンを受け取ると、脳下垂体からの adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 分泌を刺激し、ACTH は副腎皮質からストレスホルモンと呼ばれるコルチゾールの分泌を促進する。またこのコルチゾールは脳内において不安や食欲低下、交感神経の興奮に関係する。一方、*CRHR2* は CRH の作用のうち、食欲抑制に関係している受容体です。したがって、機能的にも摂食障害の候補遺伝子として期待されるものである。また、このように精神神経疾患の原因遺伝子として機能的に疑われる *CRHR2* であるが、これまで遺伝学的な関連を示した報告は家族症例の双極性障害で 1 例あるのみで、この変異の同定は画期的であると言える。

GRM8 は神経伝達物質としても知られるグルタミン酸レセプターである。機能的にはその詳細は不明であるが、臓器の中では脳で優勢に発現している。その機能の報告はないものの、GWASなどの遺伝学的な解析により、統合失調症、注意欠陥多動性障害、鬱病ならびに摂食行動など精神神経疾患を中心とした疾患との関連が認められている。それゆえこの遺伝子も摂食障害の候補として十分期待されるものである。

今回の研究により、摂食障害の原因遺伝子の候補となりうる 2 つの遺伝子を同定することに成功した。今後は動物を用いた機能解析などによる、より詳細な研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- 1) Kawanishi H, Sekiguchi A, Funaba M, Fujii Y, Yoshiuchi K, Kikuchi H, Kawai K, Maruo K, Sugawara N, Hatano K, Shoji T, Yamazaki T, Toda K, Murakami M, Shoji M, Ohara C, Tomita Y, Fukudo S, Tetsuya Ando T. Cognitive behavioral therapy with interoceptive exposure and complementary video materials for Irritable bowel syndrome (IBS): protocol for a multicenter randomized controlled trial in Japan. *BioPsychoSocial Medicine*. 2019, 13:14.
- 2) Ogino K, Takahashi H, Nakamura T, Kim J, Kikuchi H, Nakahachi T, Ebishima K, Yoshiuchi K, Ando T, Sumiyoshi T, Stickley A, Yamamoto Y, Kamio Y. Negatively skewed locomotor activity is related to autistic traits and behavioral problems in typically developing children and those with autism spectrum disorders. *Front Hum Neurosci*. 2018, 12: 518(1)-518(5)
- 3) Takahashi H, Nakamura T, Kim J, Kikuchi H, Nakahachi T, Ishitobi M, Ebishima K, Yoshiuchi K, Ando T, Stickley A, Yamamoto Y, Kamio Y. Acoustic Hyper-Reactivity and Negatively Skewed Locomotor Activity in Children With Autism Spectrum Disorders: An Exploratory Study. *Front. Psychiatry*. 2018, 9: 355-.
- 4) Kodama N, Moriguchi Y, Takeda A, Maeda M, Ando T, Kikuchi H, Gondo M, Adachi H, Komaki G. Neural correlates of body comparison and weight estimation in weight-recovered anorexia nervosa: a functional magnetic resonance imaging study. *BioPsychoSocial Medicine*. 2018, 12: 15-.
- 5) Tanahashi T, Kawai K, Tatsushima K, Saeki C, Wakabayashi K, Tamura N, Ando T, Ishikawa T. Purging behaviors relate to impaired subjective sleep quality in female patients with anorexia nervosa: A prospective observational study. *BioPsychoSocial Medicine*. 2017, 11: 22.
- 6) Kajii TS, Oka A, Saito F, Mitsui J, Iida J Whole-exome sequencing in a Japanese pedigree implicates a rare non-synonymous single-nucleotide variant in BEST3 as a candidate for mandibular prognathism. *Bone*. 2019 May;122:193-198.
- 7) Suzuki S, Ranade S, Osaki K, Ito S, Shigenari A, Ohnuki Y, Oka A, Masuya A, Harting J, Baybayan P, Kitazume M3, Sunaga J, Morishima S, Morishima Y, Inoko H, Kulski JK1, Shiina T. Reference Grade Characterization of Polymorphisms in Full-Length HLA Class I and II Genes With Short-Read Sequencing on the ION PGM System and Long-Reads Generated by Single Molecule, Real-Time Sequencing on the PacBio Platform *Front Immunol*. 2018 Oct 4;9:2294
- 8) Kajii TS, Oka A, Hatta M, Yamazaki J, Yamashita J, Iida J. PLXNA2 identified as a candidate gene by genome-wide association analysis for mandibular prognathism in human chondrocytes *Biomed Rep*. 2018 Sep;9(3):253-258.
- 9) Oka A, Asano Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Ishikawa O, Kuwana M, Kawaguchi Y, Yamamoto T, Takahashi H, Goto D, Endo H, Jinnin M, Mano S, Hosomichi K, Mabuchi T, Ueda MT, Nakagawa S,

Beck S, Bahram S, Takehara K, Sato S, Ihn H. RXRB is an MHC-encoded susceptibility gene associated with anti-topoisomerase I antibody-positive systemic sclerosis J Invest Dermatol 2017 Sep;137(9):1878-1886.

10) Saito F, Kajii TS, Oka A, Ikuno K, Iida J. Genome-wide association study for mandibular prognathism using microsatellite and pooled DNA method. American Journal of Orthodontics 2017 Sep;152(3):382-388.

11) Terao C, Kawaguchi T, Dieude P, Varga J, Kuwana M, Hudson M, Kawaguchi Y, Matucci-Cerinic M, Ohmura K, Riemekasten G., Kawasaki A, Airo P, Horita T, Oka A, Hachulla E, Yoshifuji H, Caramaschi P, Hunzelmann N, Baron M, Atsumi T, Hassoun P, Torii T, Takahashi M, Tabara Y, Shimizu M, Tochimoto A, Ayuzawa N, Yanagida H, Furukawa H., Tohma S, Hasegawa M, Fujimoto M, Ishikawa O, Yamamoto T, Goto D, Asano Y, Jinnin M, Endo H, Takahashi H, Takehara K, Sato S, Ihn H, Raychaudhuri S, Liao K, Gregersen P, Tsuchiya N, Riccieri V, Melchers I, Valentini G, Cauvet A, Martinez M, Mimori T, Matsuda F, Allanore Y. Trans-ethnic meta-analysis identifies GSDMA and PRDM1 as susceptibility genes to systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2017 Jun;76(6):1150-115

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岡 晃

ローマ字氏名：Oka Akira

所属研究機関名：東海大学

部局名：総合医学研究所

職名：講師

研究者番号（8桁）：80384866

(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。