

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15479

研究課題名(和文) 精神疾患における転移因子デノボ転移の意義

研究課題名(英文) De novo mobile element insertions in mental disorders

研究代表者

西岡 将基 (Nishioka, Masaki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：00780503

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)：両親と発症者の3名からなるトリオないし同胞を含めた4名のカルテット(双極性障害171トリオ・統合失調症1,726トリオ・自閉症トリオ・カルテット計9044名)由来のエクソームシーケンスデータを用い、デノボ変異を網羅的に解析した。計画進行中にデノボ転移因子の報告が複数あったため計画をピボットし、新規デノボ変異クラスとしてエクソン・ミトコンドリア上のモザイク変異の検出を行った。独立した双極性障害2名からSRCAP遺伝子上機能障害モザイク変異が検出され、双極性障害・統合失調症から複数のデノボミトコンドリア変異を検出し、確認実験にてその存在を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

双極性障害は遺伝因子と環境因子の2つが複合的に重なり発症されると考えられている。本計画により狭義の遺伝因子や環境因子とは異なる第3の因子として、発生発達過程で生じる後天的なゲノム変異も双極性障害・統合失調症に寄与している可能性を見出した。この知見は、双極性障害・統合失調症のゲノム構造や病態の理解に寄与するものと考えられる。特にミトコンドリアゲノムのデノボ変異解析はこれまで試みが少なく、本計画の新規性が高い。

研究成果の概要(英文)：I analyzed de novo mutations using exome sequencing data derived from trios or quartets with major mental disorders: 171 trios with bipolar disorder, 1,726 trios with schizophrenia, and 9,044 individuals with autism or their unaffected family members). During the execution of this project, several reports on de novo mobile element insertions from patients with mental disorders were published. I pivoted this project to comprehensive detection of de novo mutations including those arising early in development as mosaic mutations in the probands with mental disorders. Several mosaic mutations on exons and mitochondrial DNA were detected as a novel de novo mutation class. I detected two dysfunctional mosaic mutations on the SRCAP gene from two independent the probands with bipolar disorder, and multiple de novo mitochondrial mutations from the probands with bipolar disorder or schizophrenia. The mosaic mutations were confirmed by independent molecular experiments.

研究分野：精神医学、ゲノム科学

キーワード：精神疾患 双極性障害 統合失調症 自閉症 デノボ変異 転移因子 エクソーム

1. 研究開始当初の背景

自閉症・統合失調症・双極性障害などの主要な精神疾患は遺伝率が高く、ゲノム情報による説明力が高い表現型であると考えられる。マイクロアレイを用いたゲノムワイド関連解析や次世代シーケンサーによるゲノム・エクソーム解析により、多様なリスクバリエントが同定されているが、まだ精神疾患の発症を十分に説明できている状態ではない。これまでのマイクロアレイや次世代シーケンサーの標準的な解析では、繰り返し配列である転移因子は原則として除外して解析してきたが、レトロトランスポゾンを中心とする転移因子はヒトゲノム全体の45%を占めており、領域として無視するにはあまりに広大である。転移因子の中でも、Alu, LINE1 (long interspersed nuclear element 1) などのレトロトランスポゾンは、コピー&ペーストの形でゲノム上を増殖し、隣接遺伝子機能に影響を与える。レトロトランスポゾンは、外来性のウイルスに由来する因子と考えられており、他生物に由来する共生的・寄生的に生体内に存在するという意味で独特の位置付けをもつ。転移因子は、生殖ごとに一定割合でデノボ転移を生じ、様々な疾患に寄与していることが知られている。また統合失調症を中心に、脳において特徴的に転移活動が存在していることが示唆されており (Bundo, et al. Neuron 2014, Doyle, et al. Neuropsychopharmacology 2017)、精神疾患に対する転移因子の寄与が示唆されている。一塩基置換やコピー数変化といった既知のリスクバリエント以外のゲノム上の因子として、転移因子は精神疾患の missing heritability を説明しうるものと考えられる。特にデノボ変異は世代伝達による自然淘汰を受けないため疾患に対して効果の大きな変異が潜在的に含まれており、疾患メカニズムの理解に有用と考えられる。

2. 研究の目的

精神疾患の孤発トリオ家系の大規模ゲノムデータから、「デノボ転移による転移因子の精神疾患への寄与」を明らかにすることが本研究の当初の主目的であった。精神疾患遺伝学でこれまで扱われてこなかったものの、転移因子はゲノム上45%を占める領域であり、転移因子の解析は、missing heritability の一部の説明に貢献するものと考えた。計画進行中にデノボ転移因子の報告が複数なされたため、より包括的なデノボ変異解析へと計画を拡張し、特に後天的・体細胞性のデノボ変異と、ミトコンドリアDNAに生じるデノボ変異に注目し、これらデノボ因子の精神疾患への寄与を解明することを計画の目的として計画のピボットを行った。

3. 研究の方法

デノボ変異探索のため、両親と発端者の3名からなるトリオ(ないし同胞を含めた4名のカルテット)のエクソームシーケンスデータを準備した。双極性障害171トリオ・統合失調症1,726トリオに加え、自閉症トリオ・カルテット(計9044名)のデノボ変異を網羅的に解析した。タンパク質をコードする領域(エクソン)における変異は、タンパク質の機能を喪失させたり、本来の機能を低下させたり逆に必要以上に機能を亢進させることがあり、疾患に関連するものが多く含まれることから、エクソンに存在するデノボ変異を標的とした。双極性障害・統合失調症については、サンプルサイズの小ささを補うため2種類のリファレンスゲノム(GRCh37, GRCh38)を使用し、検出感度を高めた。シーケンスデータのアライメント及び品質管理は、BWA/GATKソフトウェアを用い、ベストプラクティスに準拠して行った。デノボ変異のうち、一塩基置換や短い欠失・挿入は TrioDenovo/DNMFiter を用いて検出し、転移因子は1000ゲノム計画で用いられ

た MELT ソフトウェアにて網羅的に検出した。

本研究は、ヒトゲノム上転移因子のデノボ転移による精神疾患への寄与を明らかにするために開始されたが、計画開始後に、自閉症や重度発達障害をはじめとして、転移因子のデノボ転移の網羅的な報告が複数なされた (Brandler et al. Science 2018; Werling et al. Nature Genetics 2018; Gardner et al. Nature Communications 2019)。本計画でも自閉症発端者にデノボ転移因子を複数検出したが、双極性障害・統合失調症ではデノボ転移因子が確認されず、既報により報告の新規性が失われた。

精神疾患の背景因子を探るという意義や論文報告の価値を踏まえ、上記の先天的なデノボ変異に加え、発生発達の過程で生じる後天的なデノボ変異 (モザイク変異)、および転移因子と同様に別な生物由来のゲノム要素であるミトコンドリアのデノボ変異 (デノボヘテロプラスミー変異) を探索価値の高いデノボ変異と考え、これら新規デノボ変異クラスを含めてより包括的なデノボ変異探索を行った (図 1)。計画当初の転移因子への注目も、他生物に由来する共生的因子による精神機能への影響という点で計画されたものであり、転移因子と同様に他生物に由来する共生的因子であるミトコンドリアは、計画趣旨に沿うピボット対象であると考えた。後天的デノボ変異は、がん領域で標準的に用いられている GATK MuTect2 ソフトウェアを用いて上記新規デノボ変異クラスを網羅的に検出し、重要な変異を中心にターゲットアンプリコンシークエンスによって確認実験を行うことで、正確なアレル割合を計算した。

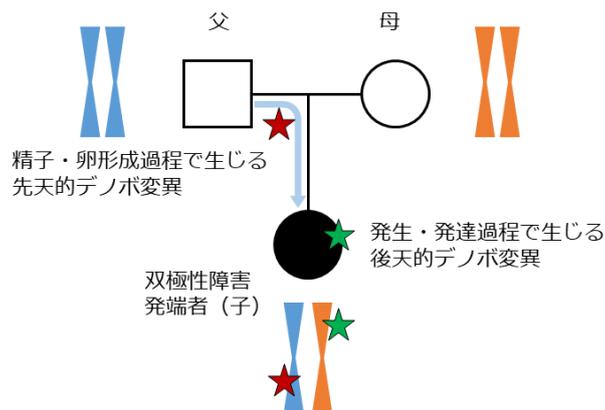


図 1. 本計画の解析対象：先天的・後天的デノボ変異

4. 研究成果

生殖系列の先天的デノボ変異および体細胞性の後天的デノボ変異について、双極性障害・統合失調症・自閉症から検出を行った。統合失調症・自閉症については、デノボ変異解析の既報が複数あり、双極性障害を中心に解析を行い、報告を行った (Nishioka et al. Nature Communications in press)。同定した双極性障害の先天的デノボ変異データと同じ解析方法で取得した自閉症・健常者 (対照) の先天的デノボ変異データを比較対象として比較したところ、自閉症において既報と同じ知見を認め、方法の妥当性を検証するポジティブコントロールとして確認できた。健常者と双極性障害の比較では下記の新規知見を得た。

・双極性障害・健常者両群でデノボ変異全体の頻度に有意な差は認めなかったが、gnomADやToMMoといった大規模公開ゲノムデータベースを用いて、精神疾患を持たない集団には存在しない極めて稀なデノボ変異のみを解析対象とすると、機能障害デノボ変異 (タンパク質の機能障害をもたらすと予想される変異) が双極性障害で多い傾向にある。

・ヒト進化の過程で、タンパク質の機能喪失変異が負の自然選択を受けている（つまり機能的に重要である）と考えられる遺伝子群（高 pLI [probability of loss-of-function intolerance] 遺伝子：3,488 遺伝子）のみを解析対象としたところ、タンパク質の機能喪失デノボ変異が有意に多い（図 2、多重比較補正後 P 値 0.0410）。

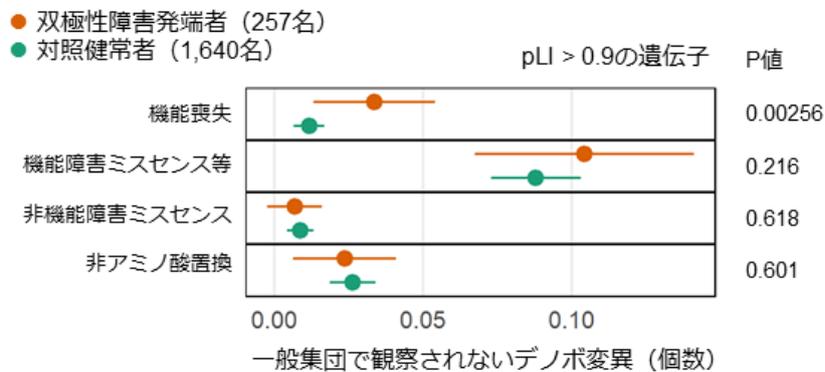


図 2. 高 pLI 遺伝子におけるデノボ変異の数の比較

精神疾患を持たない集団にはない極めて稀なデノボ変異のうち、機能障害デノボ変異の生物学的性質を Gene Ontology (GO) 解析にて検討すると、機能障害デノボ変異は、シナプス前アクティブゾーンや神経伝達物質といったシナプスに関わる遺伝子や、二価金属イオン（カルシウムイオンなど）のイオンチャンネルに関わる遺伝子など、神経細胞の中心的な機能を担う生物学的経路に関与する遺伝子に多かった。このようなシナプス・イオンチャンネル関連遺伝子はこれまでも双極性障害との関連が重ねて報告されており、これまでの双極性障害病態に関する知見を支持するとともに、稀な変異についても同様の生物学的経路を障害している可能性が高いという新規の知見が得られた。

双極性障害において機能喪失デノボ変異が観察された高 pLI 遺伝子として、ヒストンメチル化タンパク質をコードする *KMT2C* 遺伝子を確認した。この遺伝子の機能喪失デノボ変異は知的障害や特異顔貌を伴う神経発達障害 (Kleefstra 症候群) の原因となることが知られているが、検出された *KMT2C* 遺伝子機能喪失デノボ変異を持つ双極性障害患者には、Kleefstra 症候群の症状は認められなかった。同定されたデノボ変異について詳細な検討を行ったところ、細胞ごとに変異の有無が異なる「モザイク状態」で存在することがわかり、発生発達の過程で生じた後天的なデノボ変異（体細胞変異）であることが判明した（図 3a, b）。

このような変異が他にも存在する可能性を考え、体細胞性デノボ変異について網羅的な解析を実施した。双極性障害患者では、神経発達障害原因遺伝子 (*KMT2C* 遺伝子など) 上に、稀な体細胞性機能障害デノボ変異が有意に多いことが判明した ($P = 0.00135$, 図 3c)。また、双極性障害患者 2 人から独立して *SRCAP* 遺伝子 (神経発達障害 Floating-Harbor 症候群の原因遺伝子) 上の体細胞性機能障害デノボ変異が検出された。この知見から、神経発達障害原因遺伝子 (*KMT2C* 遺伝子や *SRCAP* 遺伝子など) の変異が、モザイク状に存在し、例えば特定の神経細胞種や脳領域など一部の細胞に生じた場合、双極性障害の発症リスクにつながるという仮説を得た。患者由来データの直接解析と並行して、このようなモザイク状・体細胞性の変異と精神疾患について広汎な文献の検討と理論的な考察を行い、精神疾患における体細胞性変異の重要性の提唱

を行った (Nishioka et al. Molecular Psychiatry 2019)。

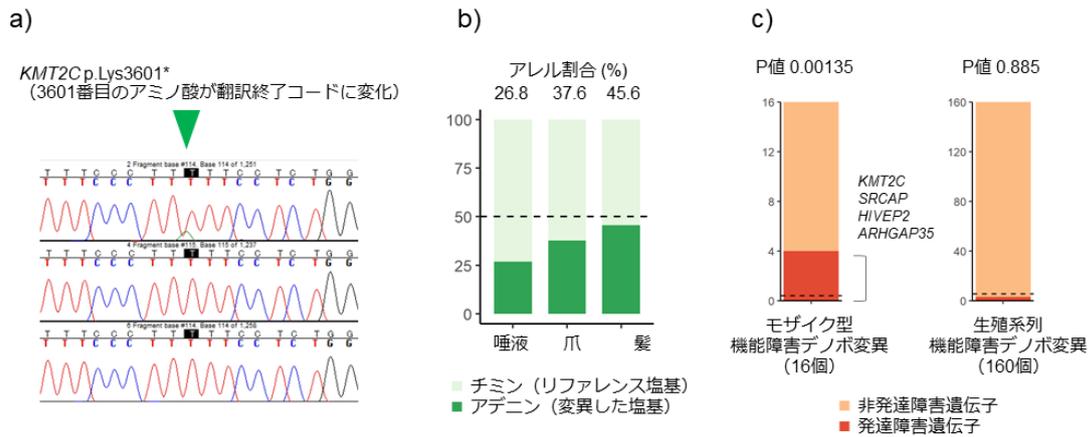


図 3. 双極性障害におけるモザイク型 (後天的) デノボ変異の代表的な例と全体の特徴

- (a) *KMT2C* 遺伝子上のデノボ変異に対するサンガーシーケンスは通常よりも低い波形であり、モザイク型が疑われた。
- (b) *KMT2C* 遺伝子上のデノボ変異をターゲットアンプリコンシーケンスにて確認したところ、唾液、爪、髪の毛の組織でモザイク型であることが判明し、発生初期に生じた変異と考えられた。
- (c) 双極性障害におけるモザイク型機能障害デノボ変異は、既知の重度発達障害の原因遺伝子上に多く見られ、これは生殖系列機能障害デノボ変異には見られない特徴であった。

エクソン上の変異に加え、ミトコンドリア DNA 専用の RNA プローブを用いミトコンドリアゲノムについても、モザイク状に存在する変異 (ヘテロプラスミー変異) の解析を行った。双極性障害・統合失調症から既知のミトコンドリア病原因変異を含めヘテロプラスミー変異を検出し、多くは母には認めないデノボ変異であると確認した。ミトコンドリア病原因変異は病原性が確実なものもあり、予備的な段階であるが、ミトコンドリア機能の障害を通じて疾患横断的に精神症状発症と関連すると考えられ、現在論文準備中である (Nishioka et al. in preparation)。

双極性障害をはじめとする精神疾患は遺伝因子と環境因子の 2 つが複合的に重なり発症されると考えられている。本計画により狭義の遺伝性因子 (親から子に伝達される生殖系列としての因子) や環境因子とは異なる第 3 の因子として、発生発達過程で生じる後天的なゲノム変異も双極性障害・統合失調症に寄与している可能性を見出した。この知見は、双極性障害・統合失調症のゲノム構造や病態の理解に寄与するものと考えられ、特にミトコンドリアゲノムのデノボ変異解析はこれまで試みが少なく、本計画の貢献が大きいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masaki Nishioka et al.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Systematic analysis of exonic germline and postzygotic de novo mutations in bipolar disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Masaki Nishioka, Miki Bundo, Kazuya Iwamoto, Tadafumi Kato	4. 巻 24
2. 論文標題 Somatic mutations in the human brain: implications for psychiatric research	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular psychiatry	6. 最初と最後の頁 839 - 856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41380-018-0129-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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 西岡将基、他
2. 発表標題 多施設共同トリオ解析による双極性障害の遺伝的構造の解明
3. 学会等名 第115回精神神経学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Masaki Nishioka et al.
2. 発表標題 Search for de novo mutations in bipolar disorder
3. 学会等名 Annual Meeting of International Society for Bipolar Disorder 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Masaki Nishioka et al.
2. 発表標題 Germline and postzygotic de novo mutations implicate neurobiological mechanisms in bipolar disorder
3. 学会等名 2020 Virtual World Congress of Psychiatric Genetics (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------