

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390285

研究課題名(和文)全ゲノムシーケンス時代に向けた統合失調症の病態の類型化と診断・治療戦略の確立

研究課題名(英文)Diagnostic classification of pathophysiology of schizophrenia utilizing genomic information

研究代表者

有波 忠雄 (ARINAMI, TADAO)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10212648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の症状、治療反応性、予後には患者間で大きな差があり、その差の一部は遺伝要因が関与していると推測されている。近年のゲノム解析の進歩により、非家族性の統合失調症の一部は突然変異が大きな役割を演じていることが知られてきたが、約1/3を占める家族性では関係する遺伝子は捉えられていない。そのため家族性と非家族性で病態の違いに関して大きな障壁となっている。日本人の家族性の統合失調症では第1染色体短腕に連鎖が認められていたことから、本研究では連鎖部位の統合失調症の関連遺伝子を次世代シーケンサーなどにより探索し、CELSR2遺伝子が関わっていることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Large difference in symptoms, treatment response, and prognosis between patients with schizophrenia is assumed to be partly caused by difference in genome architecture. Recent genome analyses revealed important role of de novo mutation in sporadic cases. In familial cases, however, such breakthrough has not been discovered. Past studies indicate responsible locus in the short arm of chromosome 1p in Japanese familial schizophrenia. To clarify path-etiology of Japanese familial schizophrenia, we screened the linkage region in the probands using next-generation sequencing and found the CELSR2 gene as a potential responsible gene of Japanese familial schizophrenia.

研究分野：遺伝医学

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：臨床精神分子遺伝学 統合失調症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 統合失調症のゲノムワイド解析と民族差 (数) 十数万円で全ゲノムシーケンスを読むサービスが可能になり、今後数年以内に患者が自分のゲノムシーケンスを持参して診断、治療などを求めてくる時代になる。これは統合失調症においても例外ではない。そのとき統合失調症の治療場面ではどのような対応が可能であろうか。

これまでの頻度の高い 1 塩基多型 (SNP) を用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) は統合失調症ではうまくいっていないと判断されており、全ゲノムシーケンスが現実になったとしても有用性は乏しいとの見方もある。ところが、実際には多くの SNPs の情報を持ち寄る統計解析 (polygenic component analysis) により、統合失調症の遺伝要因のある程度を説明できることが分かっている (Nature, 460: 748-, 2009)。さらに、コピー数変異 (CNV) の一部で代表される低頻度であるものの統合失調症に対する効果量 (effect size) が大きいものも発見されている (Nature 455: 232-, 2008)。一方、統合失調症に対して比較的効果量の大きい SNPs や CNV は頻度が低く、民族固有のものが多いことも分かかってきており、民族固有の比較的頻度の低い変異の情報が重要であることが示されている (Nature, 460: 753-, 2009)。このように統合失調症は世界中でみられ特に大きな頻度差もない疾患でありながら、関与している遺伝子やその変異は民族差がかなりあるという興味深い状況が見えてきた。これは多くの遺伝子が統合失調症には関与しているものの、個々の患者により関係する遺伝子群は異なっていることを示している。民族単位で見れば、民族固有の遺伝子頻度や変異も多く見られる上、個々の遺伝子変異の統合失調症に対する影響は遺伝的バックグラウンドや環境にも大きく影響される。このことは、個々の患者の全ゲノムシーケンス情報を統合失調症の診療や治療に生かすには、欧米のデータに加えて日本人における統合失調症に関係するゲノム情報が必要であることを示している。さらに、各民族の情報が提出されてはじめて、民族間の比較でき、統合失調症の分子病態全体の理解が可能となる。

(2) 申請者のこれまで研究経過と本研究申請の着想

申請者はオールジャパン体制の連鎖解析 (JSSLG) (Arinami et al. Am J Hum Genet, 2005) や GWAS を中心に統合失調症のゲノム解析を行ってきた。対象としているサンプル数は 6000 を超える。解析では、遺伝子関連の報告だけでなく、検出した統合失調症の関連遺伝子変異が統合失調症の病態にど

のような意味を持つかを細胞実験や遺伝子改変マウスを用いて検討し、病態のみならず治療などに役立つ情報を付加して発表してきた。この過程を通じて、民族特異的な関連変異も検出してきた。また、GWAS データを元にして統合失調症に大きな影響をもつ頻度の低い変異を検出できることを経験した。

上述の変異はグルタミン酸シグナル伝達に関わるが、この他にもこれまで検出した変異は主にドーパミンシグナル伝達に関係しているもの、GABA シグナル伝達に関係しているもの、その他のシグナル伝達に関係しているもの、シナプス可塑性に関係しているもの、神経発達に関係しているもの、など機能的な分類が可能なものも多い。それらは治療に対してもヒントを与える。その上、申請者等は抗精神病薬の副作用である遅発性ジスキネジアの解析も GWAS を用いて実施し、遅発性ジスキネジアのリスクとなる関連 4 遺伝子 (群) を同定し、2 遺伝子 (群) についてはすでに報告した。その過程で遅発性ジスキネジアが共通の病態で発生していることが浮かび上がってきた。その共通の病態の法則から探索することにより、さらに遅発性ジスキネジアに対して効果量の小さい多型についても同定することができると分かった。多くの変異を同時に考慮する全ゲノムシーケンス時代に適した診断・治療法への応用が可能であることを着想した。

このように、GWAS による欧米でのデータや日本人でのデータ、欧米人の CNV に関するデータに加えて、日本人の稀な変異で効果量の多い変異のデータを加えることにより、全ゲノムシーケンス時代に対応する統合失調症のリスクや副作用に関する情報を患者やその家族に提供できる可能性があると考えた。

診断に加えて、治療に関しての情報がなければ、患者や治療者にとって魅力ある情報とは言い難い。統合失調症においても、薬物動態的データや薬力学的データとゲノム変異との関係についてはデータが集まりつつある。一方、重篤な副作用に関するデータの収集は発生頻度が低いため困難であるが、本研究では遅発性ジスキネジアに重点を置いて研究し、副作用データのひとつとして利用する。全ゲノムシーケンスが患者やその家族、治療者に有用な情報であることを示すことができれば、実際の診療でデータが集積され、稀な副作用に関してもゲノム情報がさらに有用性を増していく良い回転が起こる。その道筋をつけることも本研究の目的である。

## 2. 研究の目的

全ゲノムシーケンス時代にもたらされ

るはずである統合失調症の患者ゲノム情報を診断・治療に適用する方法を提示することを目的とする。その目的には、これまでの欧米を中心とした統合失調症に関するデータでは不足しているため、日本人のゲノムワイド関連解析のデータに加えて全ゲノムシークエンスを行い、統合失調症の易罹病性と遅発性ジスキネジアに関する日本人固有のデータを得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 遅発性ジスキネジアではヒトの対象は全て統合失調症患者で、60人ずつの遅発性ジスキネジア群と60人の非遅発性ジスキネジア群で Illumina HumanHapCNV370 を用いてゲノムワイド関連解析を行い、有望な SNPs について36人の遅発性ジスキネジア群と136人の非遅発性ジスキネジア群で確認解析を行った。さらにヒト死後脳を用いて関連 SNP と関連遺伝子発現との関連を解析し、リスクアレルが遺伝子の機能にどのように関わっているかを解明した。また、マウスにハロペリドールを50週投与し、関連遺伝子発現の変化をみた。研究は筑波大学、神経研究所、その他関連する施設の倫理委員会の承認を得て実施した。

(2) 統合失調症の易罹病性に関しては、とくに関連遺伝子の同定が遅れている家族性の統合失調症の病因として関わる遺伝子を同定するために、日本人の家族性統合失調症連鎖解析のために集められ、連鎖領域が同定されている JSSLG 家系サンプルを対象に、連鎖領域の第1染色体短腕にあるはずの原因遺伝子を同定することを目指した。そのために JSSLG 家系発端者14名について5500 SOLiDTM にてエクソーム解析を行い、染色体1p21.2-1p13.2領域内において PolyPhen2 により遺伝機能に大きな影響を与える変異を持つ候補遺伝子を検出した。検出された候補遺伝子のエクソンについて302家系から抽出した221名を対象に Ion PGMTM によるターゲットリシークエンスを行った。これらにより同定された変異の確認にはサンガー法のダイレクトシークエンスにより行い、変異が確認できたものに関して、TaqMan 法にて関連解析を行った。各々にコントロール群をおいた。

### 4. 研究成果

(1) ゲノムワイド関連解析では多重比較の補正後に有意になる SNPs はなかった。もっとも関連 P 値が小さかった10 SNPs のうち、4 SNPs は DPP6 遺伝子内にあり ( $P = 7.1 \times 10^{-6} \sim 5.9 \times 10^{-5}$ )、2 SNPs は SMYD6 遺伝子内にあった ( $P = 2.9 \times 10^{-5}$ ,  $1.1 \times 10^{-5}$ ) ので、各々の遺伝子で最も有意な SNP につ

いてさらに別の集団で確認したところ、DPP6 遺伝子内にある SNP では関連が追認されたが、SMYD6 遺伝子内の SNP では関連は追認されなかった。DPP6 遺伝子内の遅発性ジスキネジアと関連している SNP は DPP6 遺伝子の第一エクソンにあり、関連している可能性のある SNPs は全てひとつの連鎖不平衡ブロックにあって、その連鎖不平衡ブロックは第一エクソン内にあり、アミノ酸置換を伴う種類の遺伝子変異が遅発性ジスキネジアに関連している可能性は低かった。死後脳を用いてリスク遺伝子型と DPP6 遺伝子発現との関連をみたところ、リスク遺伝子型では有意に発現量が低かった。また、マウスにハロペリドールを50週投与したところ、Dpp6 遺伝子の発現量は生食群に比べて有意に上昇した。

これまで我々はゲノムワイド解析により4遺伝子(群)の薬原性遅発性ジスキネジアの関連遺伝子を同定してきたが、全て、リスク遺伝子型はマウスでのハロペリドール長期投与での発現変化と反対方向となっており、抗精神病薬投与による適応ともいべき発現変化が起こりにくいことが薬原性遅発性ジスキネジアの脆弱性に関わっていることが分かった。また、これまでの研究により、関連する遺伝子は大きく、GABA 受容体遺伝子伝達系、アセチルコリン受容体シグナル伝達系、カリウムチャンネル伝達系が関わっていることが明らかとなった。これらの系ではいずれも治療薬として使うことができる薬剤が存在しており、遅発性ジスキネジア治療の個別化医療として、ゲノム情報が役立つ可能性が示された。

(2) エクソーム解析の結果、疾患関連遺伝子の候補として CELSR2 を同定した。そこで CELSR2 のターゲットリシークエンスを行った。その結果、遺伝子機能に大きな変化を与えると予測される13箇所の候補変異が見つかり、ダイレクトシークエンス法によりこれらの内、10箇所で変異が確認できた。これらの個々の変異の関連解析では、コントロールと比べて有意差はなかったが、CELSR2 遺伝子単位でみると発端者は対照群と比べて有意に変異のある CELSR2 遺伝子を多く持っており、また、発端者を除いた伝達不平衡テスト(TDT)では有意に機能変異が患者に伝達されていた。2 IBD 共有家系の発端者は0 IBD 共有家系に比べて変異を多く持っていたが、家系数が少なく、有意差はなかった。

これらの結果は、日本人の家族性統合失調症に限っても、原因として関わっている遺伝子の変異は家系ごとに異なり、また、連鎖領域であっても家系により原因遺伝子も異なる可能性を示唆している。本研究の結果は、統合失調症に関わる遺伝子変異は数多くあ

り、病態や治療、予後の判断材料として活用するためにはゲノムワイドの情報が必要であり、さらに、それをグルーピングする根拠となるデータが必要であることを示している。

#### 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3件)

Horiuchi Y, Ishikawa M, Kaito N, Iijima Y, Tanabe Y, Ishiguro H, Arinami T. Experimental evidence for the involvement of PDLIM5 in mood disorders in hetero knockout mice. PLoS One 8(4):e59320, 2013, 査読有  
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. 13(1):27-34, 2013, 査読有  
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. 159B(1):30-7, 2012, 査読有

##### [学会発表](計1件)

朝倉明果、鈴木千裕、飯嶋良味、野口恵美子、有波忠雄、日本人統合失調症罹患同胞対家系における連鎖領域の変異探索、日本人類遺伝学会第58回大会、2013年11月21日、仙台

##### [産業財産権]

出願状況(計0件)

##### [その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/m-genetics/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

有波 忠雄 (ARINAMI, TADAO)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：1021264

##### (2)研究分担者

飯嶋 良味 (IIJIMA, YOSHIMI)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：70574648

##### (3)連携研究者

稲田 俊也 (INADA, TOSHIYA)  
(財)神経研究所・副所長  
研究者番号：00184721