

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24689046

研究課題名(和文) ターゲットリシーケンスを利用した統合失調症感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of rare risk variants for schizophrenia using target resequencing

研究代表者

池田 匡志 (Ikeda, Masashi)

藤田保健衛生大学・医学部・講師

研究者番号：60424933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円、(間接経費) 6,180,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は遺伝要因の影響を受ける疾患であり、現在までに「頻度の高い」遺伝子多型をターゲットとした研究が数多く行われている。しかし、その発症脆弱性を説明する遺伝子多型は限られているため、最近では「希な」遺伝子変異がリスクとなりうるかを検討する方法論が、次世代シーケンサーの進展とともに注目されている。本研究では、発症年齢に着目し、統合失調症(若年発症と晩年発症)とコントロールを対象に、約300遺伝子の翻訳領域の塩基配列を決定、希な変異が統合失調症患者に多く存在するかを検討した。その結果、統合失調症全体ではコントロールと明確な差は認められなかったが、若年発症型では多く変異が認められる傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：Several epidemiological studies suggests that the genetic risk has significant influence of susceptibility for schizophrenia. Therefore a large number of genetic studies targeting common variants has been carried out, however small number of the risk variants were discovered by such studies. With the progress of next generation sequencing methodology, detecting of rare risk variant is topic for schizophrenia genetics. In this study, we conducted case-control analysis of target resequencing (about 300 genes) and examined burden of rare variants (nonsense or insertion/deletion). We found no significant enrichment between schizophrenia and controls, but detected trend for significance of over-representation in early-onset of schizophrenia.

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：臨床精神分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の病態は、疫学的研究から遺伝的要因が大きく関与することが判明している。そして、この遺伝的リスクは、糖尿病などの他の複雑疾患と同様に、個々の効果量 (effect size) は非常に小さいが、頻度の高い遺伝子多型 (common variant) が複雑に関連することで引き起こされると考えられていた (Common Disease-Common Variant 仮説)。しかし、近年実用可能となった全ゲノム上の遺伝子多型を対象とした全ゲノム関連研究 (GWAS) により、いくつかの領域・遺伝子で確度の高いリスクが同定されたが (Chr6 MHC 領域、MIR137、TCF4 など: Psychiatric GWAS Consortium (PGC), Nat Genet 2011)、common variant の疾患に対する遺伝的寄与は、最大でも 30% 程度と計算された (ISC, Nature, 2009)。

残り 70% の寄与を説明するリスクは、現在のところ不明であり、この状況を「missing heritability」と総称している。その中で、稀ではあるが、effect size が大きい変異 (rare variant) が、missing heritability を説明する候補となりうるかと期待が持たれ、Multiple rare variant (MRV) 仮説として積極的な展開が望まれている。その一例として、前述の GWAS のサブ解析から同定可能である、稀な copy number variant (CNV) は、知見が積み重ねられるとともに、統合失調症のリスクとして広く受け入れられつつある。特に、100Kb 以上という大きな CNV (欠失や重複) は、統合失調症患者が、正常対照者よりも統計的により多くの数を持つことが示されている (Burden 解析)。さらに、個々の CNV についても、1q21.1、3q29、15q11、16p11、16p13、22q11 などの領域が複数の報告で関連が得られている。興味深いことに、これらの CNV 領域は、統合失調症だけでなく、精神遅滞 (MR) や、自閉症などのリスクとしても報告されており、一つのリスクが、幅広い表現型のリスクとなりうるという、いわゆる pleiotropy を示している。したがって、既報で、より大量のサンプル数を使用している MR や自閉症の CNV 解析の結果を応用することで、新規の統合失調症のリスクを同定することが期待される。

他方、これらの CNV 領域などリスクとなりうる領域に存在する「稀」かつ「機能に影響する」変異は、同様に統合失調症のリスクとなりうる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ターゲットリシーケンスを行うことで、稀ではあるが、効果量の大きい統合失調症のリスク変異を同定することにある。候補領域としては、

(1) MR や自閉症との pleiotropy を考慮した CNV 領域 (pleiotropy を想定して統合失調症のみならず、MR や自閉症のリスク CNV (1q21、NRXN1、3q29、7q11、15q11-13、16p11、16p13、22q11) がヒットしている遺伝子群を選出する)

(2) GWAS mega 解析で同定された有望なリスク遺伝子

(世界中の GWAS の mega 解析が行われ (PGC)、common な SNP によるいくつかのリスクが同定された。common なリスクとなりうるならば、稀な変異も含有する可能性が高いと想定し、PGC にリストアップされている有望な遺伝子群を選出する)

を選出し、統合失調症と正常対照者の case-control study を行う。

特に、統合失調症では、発症年齢 (age at onset: AAO) を意識する。18 歳以下の若年発症型 (early-onset schizophrenia: EOS) は、MR や自閉症と症状及び病態の類似性が考慮される病型であり、副次的な仮説として「EOS は稀な変異が関与する」を挙げ、結果として EOS でより多く発見されるのではないかとすることを考慮したサンプル構成とする。すなわち、EOS vs 正常対照者や EOS vs AAO が 19 歳以上の統合失調症 (late-onset schizophrenia: LOS) という解析を統合失調症全体 (EOS+LOS) vs 正常対照者の解析に付随して行う。さらに、追試サンプルとして独立したデータセットを用い、確度の高い新規リスク変異の同定を目指す

3. 研究の方法

上述の (1) 及び (2) から選出した 259 遺伝子のエクソン領域をキャプチャーするカスタムメイド濃縮をデザインした (NexteraDNA sample prep kit を使用)。サンプルは 503 名の統合失調症患者 (内 EOS302 名及び LOS201 名)、296 名の正常対照者とし、Miseq を用いて塩基配列を決定した。

得られた row data は、マッピング、重複リードの除去など、Miseq Reporter の default setting で行い、GATK による Quality control を施行、最終的に QUAL score が 100 の SNV、ins/del を残した。さらに、SNPEff によりアノテーションを行い、high impact な効果を持つ nonsense mutation と frame shift を起こす ins/del を同定した。

それらの enrichment を調べるために、burden 解析として、統合失調症 vs 正常対照者、及びサブ解析として EOS vs 正常対照者と LOS vs 正常対照者の解析を行った。

さらに、同定した nonsense mutation と

ins/del に関して、独立した統合失調症サンプル1000名と正常対照者1000名をタイプし、追試を行った。

4. 研究成果

ターゲットリシークエンシングの結果、56個の nonsense mutation と Frame shift を引き起こす ins/del を同定した。これらの validation として、Sanger 法を用い確認、53個が確認された。

Burdern 解析として、これら53個を用いた解析では、すべての組み合わせ(統合失調症 vs 正常対照者、EOS vs 正常対照者、LOS vs 正常対照者)で有意な関連は認められなかった。しかし、singleton の変異(全サンプル中一人しか持たない変異)に関しては、統合失調症全体 vs 正常対照者では有意でなかったものの、EOS vs 正常対照者において、EOS に有意に多い傾向が認められた。

これら別のサンプルを用いて追試を行ったがこの場合はAAOが不明なサンプルが多く、統合失調症全体としての解析(統合失調症サンプルに多く認められる方向性は一致していたものの、やはり有意な over-representation は認められなかった。対象としている変異は、rare であるために、本関連解析の検出力は充分でない可能性がある。従って、今後もサンプル数を増やした解析を行っていく必要がある。また、missense mutation についても同様のストラテジーで解析をしていく必要がある。

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 10 件)

1) Kajio Y, Kondo K, Saito T, Iwayama Y, Aleksic B, Yamada K, Toyota T, Hattori E, Ujike H, Inada T, Kunugi H, Kato T, Yoshikawa T, Ozaki N, Ikeda M and Iwata N. Genetic association study between the detected risk variants based upon type II diabetes GWAS and psychotic disorders in the Japanese population. *Journal of human genetics* 2014; 59(1): 54-6.doi: 10.1038/jhg.2013.116 (査読有り)

2) Ikeda M, Okahisa Y, Aleksic B, Won M, Kondo N, Naruse N, Aoyama-Uehara K, Sora I, Iyo M, Hashimoto R, Kawamura

Y, Nishida N, Miyagawa T, Takeda M, Sasaki T, Tokunaga K, Ozaki N, Ujike H and Iwata N. Evidence for shared genetic risk between methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 2013; 38(10): 1864-70.doi: 10.1038/npp.2013.94(査読有り)

3) Hashimoto R, Ikeda M, Ohi K, Yasuda Y, Yamamori H, Fukumoto M, Umeda-Yano S, Dickinson D, Aleksic B, Iwase M, Kazui H, Ozaki N, Weinberger DR, Iwata N and Takeda M. Genome-wide association study of cognitive decline in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2013; 170(6): 683-4.doi: 10.1176/appi.ajp.2013.12091228 (査読有り)

4) Ikeda M, Aleksic B, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Matsuo K, Numata S, Watanabe Y, Ohnuma T, Kaneko T, Fukuo Y, Okochi T, Toyota T, Hattori E, Shimodera S, Itakura M, Nunokawa A, Shibata N, Tanaka H, Yoneda H, Arai H, Someya T, Ohmori T, Yoshikawa T, Ozaki N and Iwata N. Genetic evidence for association between NOTCH4 and schizophrenia supported by a GWAS follow-up study in a Japanese population. *Molecular psychiatry* 2013; 18(6): 636-8.doi: 10.1038/mp.2012.74(査読有り)

5) Guha S, Rees E, Darvasi A, Ivanov D, Ikeda M, Bergen SE, Magnusson PK, Cormican P, Morris D, Gill M, Cichon S, Rosenfeld JA, Lee A, Gregersen PK, Kane JM, Malhotra AK, Rietschel M, Nothen MM, Degenhardt F, Priebe L, Breuer R, Strohmaier J, Ruderfer DM,

Moran JL, Chambert KD, Sanders AR, Shi J, Kendler K, Riley B, O'Neill T, Walsh D, Malhotra D, Corvin A, Purcell S, Sklar P, Iwata N, Hultman CM, Sullivan PF, Sebat J, McCarthy S, Gejman PV, Levinson DF, Owen MJ, O'Donovan MC, Lencz T and Kirov G. Implication of a rare deletion at distal 16p11.2 in schizophrenia. *JAMA Psychiatry* 2013; 70(3): 253-60.doi: 10.1001/2013.jamapsychiatry.71 (査読有り)

6) Lencz T, Guha S, Liu C, Rosenfeld J, Mukherjee S, Derosse P, John M, Cheng L, Zhang C, Badner JA, Ikeda M, Iwata N, Cichon S, Rietschel M, Nothen MM, Cheng AT, Hodgkinson C, Yuan Q, Kane JM, Lee AT, Pisante A, Gregersen PK, Pe'er I, Malhotra AK, Goldman D and Darvasi A. Genome-wide association study implicates NDST3 in schizophrenia and bipolar disorder. *Nat Commun* 2013; 4: 2739.doi: 10.1038/ncomms3739 (査読有り)

7) Esaki K, Kondo K, Hatano M, Saito T, Kishi T, Umene-Nakano W, Yoshimura R, Nakamura J, Ozaki N, Ikeda M and Iwata N. Further evidence of an association between a genetic variant in BMP7 and treatment response to SSRIs in major depressive disorder. *Journal of human genetics* 2013; 58(8): 568-9.doi: 10.1038/jhg.2013.52 (査読有り)

8) Kanazawa T, Ikeda M, Glatt SJ, Tsutsumi A, Kikuyama H, Kawamura Y, Nishida N, Miyagawa T, Hashimoto R, Takeda M, Sasaki T, Tokunaga K, Koh J, Iwata N and Yoneda H. Genome-wide association study of atypical psychosis. *American journal of medical genetics*.

Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics 2013; 162B(7): 679-86.doi:

10.1002/ajmg.b.32164 (査読有り)

9) Kondo K, Ikeda M, Kajio Y, Saito T, Iwayama Y, Aleksic B, Yamada K, Toyota T, Hattori E, Ujike H, Inada T, Kunugi H, Kato T, Yoshikawa T, Ozaki N and Iwata N. Genetic variants on 3q21 and in the Sp8 transcription factor gene (SP8) as susceptibility loci for psychotic disorders: a genetic association study. *PLoS One* 2013; 8(8): e70964.doi: 10.1371/journal.pone.0070964(査読有り)

10) 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 and Iwata N. An evaluation of polymorphisms in casein kinase 1 delta and epsilon genes in major psychiatric disorders. *Neuroscience letters* 2012; 529(1): 66-9.doi: 10.1016/j.neulet.2012.08.070 (査読有り)

{ 学会発表 }(計 3 件)

- 1) 池田匡志 : 双極性障害のgenome-wide association study (GWAS)、日本生物学的精神医学会 (招待講演) 2012/9/29、神戸
- 2) 池田匡志 : 統合失調症と覚醒剤誘発性精神病の遺伝学的共通性、日本精神神経学会、2012/5/25、札幌
- 3) 池田匡志 : Shared risk between Methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia、World Congress of Psychiatric Genetics、2012/10/16、Hamburg, Germany

{ 図書 }(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 匡志 (Ikeda, Masashi)
藤田保健衛生大学・医学部・講師
研究者番号：60424933

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：