

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253072

研究課題名(和文) 双極性障害の発症に強く関わる稀な遺伝子変異の同定と包括的な解析による病態解明

研究課題名(英文) Identification of rare genetic variants associated with bipolar disorder and comprehensive analysis to elucidate its pathophysiology

研究代表者

尾崎 紀夫(OZAKI, Norio)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40281480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の双極性障害患者を対象に高解像度ゲノムコピー数変異(CNV)解析を実施した。その結果、発症に関する頻度の稀なCNVを患者全体の約6%で同定し、中でも複数の患者で欠失を同定したPCDH15(proto cadherin 15)を双極性障害の有力な候補遺伝子として見出した。同定した患者のうち、同意を得た2症例患者の血液より誘導多能性幹細胞(iPS)細胞の樹立を行った。さらにCRISPR/Cas9法により、Pcdh15欠失モデルマウスの作出に成功した。

研究成果の概要(英文)：We performed a high-resolution genome-wide copy number variation (CNV) analysis on Japanese patients with bipolar disorder (BP). We identified clinically significant CNVs in around 6% of BP patients. Among others, PCDH15 (protocadherin 15) was identified as a promising candidate gene because exonic deletions were observed in three patients. From two BP patients with PCDH15 deletions, we established induced pluripotent stem (iPS) cell lines. We applied genome-modifying technology of CRISPR/Cas9 method and generated the Pcdh15-deficient mice, carrying the NHEJ mutant allele.

研究分野：医歯薬学

キーワード：双極性障害 ゲノムコピー数変異

1. 研究開始当初の背景

双極性障害は躁病相とうつ病相を繰り返す重篤かつ慢性の精神疾患で、発症頻度は1%に及び、高い自殺率や長期にわたる就労困難を引き起こす。うつ病との鑑別が難しく、適切な診断や治療が遅れること、既存の治療薬の効果が限定的であることから、病因・病態の理解に基づいた診断法や治療法の開発が喫緊の課題となっている。

疫学研究から、双極性障害の発症に遺伝要因が強く関与し(遺伝率:約80%)、統合失調症、自閉スペクトラム症(以下、ASD)と共通の遺伝要因が存在することが報告されていた。近年のゲノム研究から、統合失調症やASDの発症に頻度の稀な(<1%)ゲノムコピー数変異(CNV)が関与することが明らかになった。CNVは、染色体上の1kb以上にわたるゲノム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)となるゲノム変異を指す。双極性障害においても稀なCNVが発症に関与することが複数の研究によって報告されていた。

しかし、これまでの知見はコーカシアンを対象に行われた研究で得られたもので、日本人患者を対象にした双極性障害の大規模CNV解析は実施されていなかった。稀なゲノム変異は人種特異性が存在する可能性も指摘されていることから、コーカシアン患者で得られた知見が日本人患者に当てはまるか否かを検証する必要がある。

2. 研究の目的

日本人の双極性障害患者を対象に全ゲノムで高解像度のCNV解析を行い、発症に関与する頻度の稀なCNVを同定する。その解析結果に基づき、本疾患の候補遺伝子を選択する。病態解明に向けて、発症関連CNVをもつ患者からiPS細胞の樹立を行い、さらに同ゲノム変異を模したモデルマウスを作製する。

3. 研究の方法

(1) CNV解析

日本人の双極性障害患者400名を対象に高解像度アレイCGH(Agilent SurePrint G3 Human CGH 400K)を用いて全ゲノムCNV解析を実施した。患者はDSM-IV-TRの診断基準で双極性障害と診断された者とし、末梢血採血から抽出したゲノムを用いた。アレイCGHを用いた実験はアジレントの解析システムを用いてプロトコルに沿って実施した。

CNV callingはNexus Copy Number software v7.5でFast Adaptive States Segmentation Technique 2 algorithmを用いて実施した。具体的には、significance threshold p-valueを 1×10^{-6} 、CNVのコールに必要な最小プローブ数を5と設定した。CNVデータのquality controlを行い、最終的に高精度の

稀な(<1%)CNVを得た。

本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会において承認を受け、被験者に書面による説明を行い、書面で同意を得たうえで実施した。

(2) iPS細胞の樹立

研究項目(1)の結果に基づき、双極性障害関連CNVである*PCDH15*欠失を持つ患者よりiPS細胞の樹立に着手した。具体的には、*PCDH15*欠失を持つ双極性障害患者2症例より同意を得た後に採血を行った。採血した血液より単核球の単離を行い、非ウイルス性のエピソードベクターの遺伝子導入を行なった。導入する遺伝子は、Oct4、Sox2、Klf4、L-Myc、Lin28、mp53DD(マウスp53遺伝子のドミナントネガティブ変異体)とした。これをフィーダー細胞下で培養し、ヒトES様のコロニーが現れたのを確認した。このコロニーをピックアップし、形態を維持しかつエピソードベクター残存のないクローンをストックした。

(3) モデルマウスの作製

双極性障害患者で同定した*PCDH15*の欠失を模倣するモデルマウスの作製に着手した。具体的には、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9法を用いて、マウス*Pcdh15*の全てのアイソフォームに含まれているエキソン5を標的としたデザインのため、ガイドRNAであるCRISPR RNAとTrans-activating RNAを人工的に合成した。これらの人工RNAとCas9リコンビナントタンパク質との混合液をC57BL/6Jマウス系統より採取した受精卵の前核にマイクロインジェクションで導入した。2細胞期まで成育が進んだ卵を偽妊娠雌マウスの卵管に移植し、産仔の尾よりゲノムDNAを抽出した。遺伝子型をPCR法とサンガーシーケンシング法により確認し、1系統、エキソン5が11bp欠失している産仔を得ることが出来た。

4. 研究成果

(1) CNV解析

高解像度アレイCGHを用いて双極性障害患者400名のCNV解析を実施した。Quality control後の高精度CNVデータから、American College of Medical Genetics(ACMG)のガイドラインの基準("Pathogenic"または"uncertain clinical significance, likely pathogenic"に相当)に基づいて発症に関与するCNVを抽出した。その結果、患者全体の約6%において、病的意義をもつCNVを同定した。この中には、分節重複領域に反復性にかかるCNV(15q11.2欠失、22q11.23重複、Xp22.31重複など)非反復性の大規模CNV(サイズが2Mb以上)疾患関連遺伝子の小規模CNV(*PCDH15*欠失、*RBFOX1*欠失、*ULK4*欠失など)が含まれ、双極性障害の遺伝的異質性の一端を明らかにした。上述のCNVは、統合失調症やASDを含む多様な精神疾患・神経発達

症の患者で既に報告されているものが多く、同一 CNV が疾患横断的に発症に関与することが示唆された。

PCDH15 (protocadherin 15) ではエキソン領域を含む欠失が3名の患者で同定されたことから、双極性障害の有力な候補遺伝子として絞り込んだ。

(2) iPS 細胞の樹立

研究項目(1)において双極性障害の有力な候補遺伝子として絞り込んだ *pCDH15* 欠失をもつ3名の患者のうち、同意の得られた2名の患者から血液細胞を得て、iPS 細胞の樹立を行った。樹立手法として、ゲノム DNA への挿入を伴わないエピソーマルベクターを用いた方法を採用した。遺伝子導入を行った血液細胞をフィーダー細胞の存在下、ヒト ES 用培地で培養したところ、ヒト ES 細胞様のコロニーが得られた。このコロニーを複数単離し、数回継代後、エピソーマルベクターの残存確認を行った。エピソーマルベクターの残存が認められないクローン群の胚様体形成能確認後、一次ストックとして保存した。

PCDH15 が関与する病態として、セロトニン神経系が示唆されている。上記樹立に並行する形で、健常者由来 iPS 細胞よりセロトニンニューロンの誘導を試みた。先行論文を参考にし、これまで 10%以下であったセロトニンニューロン誘導を 50%以上の割合で誘導することに成功した。

今後、この誘導法を患者由来 iPS 細胞に対しても行い、セロトニン神経系における *PCDH15* の関与を解析していく必要があると考えられた。

(3) モデルマウスの作製

(1)の双極性障害の CNV 解析で見出した多くの病態関連遺伝子の中から、候補遺伝子として *PCDH15* に絞り込んだ。脳内のセロトニン神経経路において表現型を示す可能性が報告されたためである。そこで、患者で同定した *PCDH15* 欠失を模倣する *Pcdh15* 欠失マウスの作製に着手した。遺伝子操作の方法として、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いて、マウス *Pcdh15* の全てのアイソフォームに含まれているエキソン 5 を標的としたデザインを設計した。ガイド RNA である CRIAPR RNA (配列 5'-

TTGATTAAGGGGACTGCCGGAGG-3') と Trans-activating RNA (配列 5'- AAACAG CAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA ACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU-3') を人工的に合成した。これらの人工 RNA と Cas9 リコンビナントタンパク質との混合液を C57BL/6J マウス系統より採取した受精卵の前核にマイクロインジェクションで導入した。2細胞期まで成育が進んだ卵を偽妊娠雌マウスの卵管に移植し、産仔の尾よりゲノム DNA を抽出した。遺伝子型を PCR 法とサンガーシーケンシング法により確認し、1系統、エ

キソン 5de11bp 欠失している産仔を得ることが出来た。

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 9件)

1) 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 (2016) Investigation of Rare Single-Nucleotide *PCDH15* Variants in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. *PLoS One* 11:e0153224, 査読有

2) Kimura H, Tanaka S, Kushima I, Koide T, Banno M, Kikuchi T, Nakamura Y, Shiino T, Yoshimi A, Oya-Ito T, Xing J, Wang C, Takasaki Y, Aleksic B, Okada T, Ikeda M, Inada T, Iidaka T, Iwata N, Ozaki N (2015) Association study of *BCL9* gene polymorphism rs583583 with schizophrenia and negative symptoms in Japanese population. *Sci Rep* 5:15705, 査読有

3) 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 (2015) Identification of Rare, Single-Nucleotide Mutations in *NDE1* and Their Contributions to Schizophrenia Susceptibility. *Schizophr Bull* 41:744-53, 査読有

4) Xing J, Wang C, Kimura H, Takasaki Y, Kunimoto S, Yoshimi A, Nakamura Y, Koide T, Banno M, Kushima I, Uno Y, Okada T, Aleksic B, Ikeda M, Iwata N, Ozaki N (2014) Resequencing and Association Analysis of *PTPRA*, a Possible Susceptibility Gene for Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders. *PLoS One* 9:e112531, 査読有

5) Wang C, Koide T, Kimura H, Kunimoto S, Yoshimi A, Nakamura Y, Kushima I, Banno M, Kawano N, Takasaki Y, Xing J, Noda Y, Mouri A, Aleksic B, Ikeda M, Okada T, Iidaka T, Inada T, Iwata N, Ozaki N (2014) Novel rare variants in F-box protein 45 (*FBXO45*) in schizophrenia. *Schizophr Res* 157:149-56, 査読有

6) Takata A, Iwayama Y, Fukuo Y, Ikeda M, Okochi T, Maekawa M, Toyota T, Yamada K, Hattori E, Ohnishi T, Toyoshima M, Ujike H, Inada T, Kunugi H, Ozaki N, Nanko S, Nakamura K, Mori N, Kanba S, Iwata N, Kato T, Yoshikawa T (2013) A Population-Specific Uncommon Variant in GRIN3A Associated with Schizophrenia. Biol Psychiatry 73:532-9, 査読有

7) Niwa M, Jaaro-Peled H, Tankou S, Seshadri S, Hikida T, Matsumoto Y, Cascella NG, Kano S, Ozaki N, Nabeshima T, Sawa A (2013) Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. Science 339:335-9, 査読有

8) Aleksic B, Kushima I, Ohye T, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Koide T, Iritani S, Kurahashi H, Iwata N, Ozaki N (2013) Definition and refinement of the 7q36.3 duplication region associated with schizophrenia. Sci Rep 3:2587, 査読有

9) Shiino T, Koide T, Kushima I, Ikeda M, Kunimoto S, Nakamura Y, Yoshimi A, Aleksic B, Banno M, Kikuchi T, Kohmura K, Adachi Y, Kawano N, Okada T, Inada T, Ujike H, Iidaka T, Suzuki M, Iwata N, Ozaki N (2013) Common variants in bcl9 gene and schizophrenia in a Japanese population: Association study, meta-analysis and cognitive function analysis. J Med Biochem 32:351-357, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 紀夫 (OZAKI, Norio)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40281480

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

入谷 修司 (IRITANI, Syuji)
名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座教授
研究者番号：60191904

飯高 哲也 (IIDAKA, Tetsuya)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70324366

アレクシッチ ブランコ (ALEKSIC, Branko)

名古屋大学・大学院医学系研究科(国際)・特任准教授
研究者番号：60547511

國本 正子 (KUNIMOTO, Shohko)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：30350135

神庭 重信 (KANBA, Shigenobu)
九州大学・医学部・教授
研究者番号：60312112

岩田 仲生 (IWATA, Nakao)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：60312112

岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60312112

野田 幸裕 (NODA, Yukihiro)
名城大学・薬学部・教授
研究者番号：60312112