

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461712

研究課題名(和文)ゲノムワイド関連解析とDNAメチル化解析を統合したパニック障害候補遺伝子の探索

研究課題名(英文) Search for new susceptibility genetic factor associated with panic disorder

研究代表者

梅景 正 (Umekage, Tadashi)

東京大学・環境安全本部・准教授

研究者番号：20323587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、パニック障害の発症機序解明につながる成果を得ることを目的とし、ゲノム・エピゲノム双方の観点から研究を実施した。ゲノム研究では、ゲノムワイド関連解析のデータに基づいたパスウェイ解析ならびにヒト白血球抗原(HLA)の解析を実施し、パニック障害にHLA-DRB1などの免疫系に関連する遺伝子が関連する可能性のあることを見出した。エピゲノム解析として実施したゲノムワイドDNAメチル化解析では、40か所の疾患関連候補メチル化部位を同定し、その近傍に存在する遺伝子は、リンパ球の活性化の制御に関するパスウェイを構成する遺伝子群などで、有意に割合が高いという結果を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed genome and epigenome studies to identify new genetic factors associated with panic disorder. In the genome study, we performed pathway analyses, identifying the association between immune-related pathways and panic disorder. We also genotyped the HLA genes and found that HLA-DRB1\*13:02 was associated with the disease. Further, epigenome-wide association study of DNA methylation was conducted and forty CpG sites were identified as candidate methylation sites associated with panic disorder. A pathway analysis on the genes annotated to the significant CpG sites identified several pathways, including "positive regulation of lymphocyte activation."

研究分野：分子遺伝学

キーワード：Panic disorder genome wide association study pathway analysis epigenome study HLA genes

## 1. 研究開始当初の背景

パニック障害は、代表的な精神疾患である不安障害の一つであり、パニック発作と予期不安を主症状とする。一部の患者は、広場恐怖を合併し、一旦発症すると社会生活に大きな支障をきたす疾患である。パニック障害の年間罹患率は約1%、生涯罹患率は2 - 2.5% (パニック発作は7 - 9%)と高率である。これまでに家族研究や双生児研究によりパニック障害に遺伝要因が関与することが推定されてきた (Crow 1983; Kendler 1994)。疾患の発症にどのくらい遺伝要因が関与しているかを示す遺伝率については、40%程度との報告がされている (Hettema 2001)。遺伝子研究では、これまでに連鎖解析や関連解析が多数行われてきたが、確実な関連候補遺伝子は見だされていない。我々はこれまでに世界最大規模の日本人パニック障害サンプル (> 1300 例) を収集し、ゲノム全域にわたり網羅的に疾患関連遺伝要因を探索するゲノムワイド関連解析 (Genome wide association study : GWAS) を行ない、候補遺伝子の同定を目指してきた。その結果、*NPY5R*、*BDKRB2* といった遺伝子領域内の単一塩基多型 (SNP) がパニック障害と関連する傾向を示した (J Hum Genet 2009; 2010; Transl Psy 2012)。しかし、パニック障害の遺伝率から考え、これら以外にも疾患に関連する遺伝要因が存在すると考えられる。

一方で、パニック障害の発症には遺伝要因だけでなく、ストレスなどの環境要因の果たす役割も大きい。近年、遺伝子配列を変えずに遺伝発現に影響を与える修飾因子 (DNA メチル化などのエピジェネティクス) が注目されている。これまで、環境ストレスとエピジェネティクスの関連についての研究は、マウスなどの動物モデルを用いた報告が中心であり、対象についても神経栄養因子や神経伝達物質に関連する遺伝子など (*GDNF*、*AVP*、*NR3C1*、*5HTT*P) に限ら

れてきた (Weaver 2006; Murgatroyd 2009; Kinnally 2010; Uchida 2011)。ヒトの精神疾患を対象とした DNA メチル化解析の報告は、うつ病や統合失調症などを中心に少ないサンプル規模 ( $N < 50$ ) で少数の遺伝部位を解析しているのが現状であった (Fuchikami 2011; Kinoshita 2013)。

## 2. 研究の目的

上述したように、我々が行った GWAS データからはパニック障害の遺伝率の大部分が説明できない (説明のつく variance は 1-2% 程度) (Transl Psy 2012)。こうした「消えた遺伝率」 ("missing heritability") の問題が起こる背景には、個々のオッズの小さな多数の SNP の関連や、エピジェネティックな変異の存在が考えられる。そこで本研究では以下に示す2つの目的を達成することで、パニック障害に関連するゲノム・エピゲノム要因を同定し、疾患の発症機序を解明するという主目的の達成を目指した。

- (1) これまでに実施したパニック障害の GWAS の結果から、個々のオッズは小さくとも真に疾患に関連している可能性のある SNP を検出する
- (2) パニック障害患者と健常者のゲノムワイドな DNA メチル化プロファイルを明らかにし、疾患に関連している DNA メチル化部位を探索する

## 3. 研究の方法

- (1) GWAS データを用いたパスウェイ解析

個々のオッズは小さい SNP でも、それらの機能的な組み合わせが疾患に関連している可能性を検討するために、GWAS データを用いたパスウェイ解析を実施した。より確実な結果を得るために DAVID、i-GSEA4GWAS、ICSNPathway という3通りの手法を用いて解析を実施し、全ての解析で共通して検出されるパスウェイに着目した。

## (2) ヒト白血球抗原 (HLA) についての解析

(1) のパスウェイ解析の結果、全ての解析において免疫系パスウェイがパニック障害に関連し、それらの関連に *HLA* が寄与している可能性があるとの結果が得られたため、特に *HLA-DRB1* と *HLA-B* に着目し、遺伝子型の決定を行った (患者群  $N = 744$ 、健常者群  $N = 1418$ )。

## (3) パニック障害に関連する *HLA* アリルの有無による GWAS データの層別解析

(2) の *HLA* の解析で疾患に関連が認められたアリル (*HLA-DRB1\*13:02*) を持つパニック障害と持たないパニック障害で、疾患に関連する遺伝要因が異なる可能性を考慮するために、当該アリルの有無でサンプルを層別した GWAS のサブグループ解析を実施した (*DRB1\*13:02* を持つ群; 患者:  $N = 103$ , 健常者:  $N = 198$ , 持たない群; 患者:  $N = 438$ , 健常者:  $N = 1341$ )。

## (4) アレイを用いたゲノムワイドメチル化解析

ゲノムワイドメチル化解析には、マイクロアレイ (Infinium® Human Methylation 450K BeadChip, Illumina 社) を使用し、患者 48 例、健常者 48 例のメチル化状態をゲノムワイドに探索した。アレイで得られたデータについては、質の悪いプローブを除くフィルタリングと適切な標準化を実施した。疾患に関連するメチル化部位の同定は、メチル化率を目的変数、年齢、性別、白血球細胞構成比率を共変量とした回帰分析にて実施した。

## 4. 研究成果

GWAS データを用いて 3 通りの手法でパスウェイ解析を行った結果、全ての解析において免疫系のパスウェイがパニック障害に関連しているという結果が得られた。さらにそれらのパスウェイの関連に *HLA* が寄与していることが判明した。GWAS の *HLA* 領域

の結果を再検討した結果から特に、*HLA-DRB1* と *HLA-B* に着目してタイピングを実施したところ、パニック障害の患者群において、*HLA-DRB1\*13:02* のアリル頻度が有意に高いことが確認された ( $P = 2.50 \times 10^{-4}$ , オッズ比 (OR) = 1.54)。先行研究より、*HLA* のアリルが関連する疾患では、その関連するアリルの有無によって、病態や関連する遺伝要因が異なるという報告があることから、*HLA-DRB1\*13:02* の有無で GWAS のデータを分けた層別解析を実施したところ、*DRB1\*13:02* を持たない群の解析では、*MCPH1* (microcephalin 1) 領域内の 1 つの SNP が多重検定の補正後も有意な関連を示した ( $P = 4.23 \times 10^{-8}$ , OR = 1.61)。さらに、ヨーロッパ系集団においてパニック障害への関連が再現されている遺伝子である *TMEM132D* 領域内の 2 つの SNP も関連する傾向を示し、上位の SNP として検出された (rs1397504;  $P = 3.88 \times 10^{-6}$ ; OR = 1.51, rs7962650;  $P = 7.32 \times 10^{-6}$ ; OR = 1.49)。

一方、エピゲノム解析として実施したパニック障害のゲノムワイドメチル化解析では、全てのサンプルにおいて質の高い DNA メチル化データを取得した。フィルタリングと標準化の結果、最終的に 376,602 プローブが解析対象となり、これらについてそのメチル化率に患者、健常者群間で差が見られるかを検討した。その結果、メチル化率の差自体は小さいものの、FDR (false discovery rate) を 5% とした際に、40 プローブが有意に疾患に関連しているという結果が得られた。有意な部位のうち 37 か所は CpG アイランド内または周辺領域に位置していた。また、多くの有意な部位 (27/40) は遺伝子上流に位置しており、2 か所の例外を除いてパニック障害患者でメチル化率が低下していた。さらに、EWAS データから得られた有意なプローブの結果を用いてパスウェイ解析を行ったところ、複数の関連パスウェイが検出され、その

中にはリンパ球の活性化の正の制御に関するパスウェイが含まれていた。

以上のゲノム・エピゲノム研究の結果は共に免疫系がパニック障害に関連している可能性を示唆している。統合失調症など他の精神疾患ではこれまでに免疫系の関連が複数報告されているが、パニック障害と免疫系の関連の報告は管見によると我々の報告がはじめてである。今後のさらに免疫系に着目した解析を進めることで、パニック障害さらなる関連要因が見出されることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

### 雑誌論文

1) Epigenome-wide association study of DNA methylation in panic disorder

Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, Umekage T, Kawamura Y, Bundo M, Iwamoto K, Tochigi M, Kasai K, Kaiya H, Tanii H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T.

Clin Epigenetics. 2017 Jan 21;9-6. doi: 10.1186/s13148-016-0307-1. eCollection 2017.

2) The First Pilot Genome-Wide Gene-Environment Study of Depression in the Japanese Population.

Otowa T, Kawamura Y, Tsutsumi A, Kawakami N, Kan C, Shimada T, Umekage T, Kasai K, Tokunaga K, Sasaki T.

PLoS One. 2016 Aug 16;11(8): e0160823. doi: 10.1371/journal.pone.0160823. eCollection 2016.

3) Polymorphisms in the TMEM132D region are associated with panic disorder in

HLA-DRB1\*13:02-negative individuals of a Japanese population.

Shimada-Sugimoto M, Otowa T, Miyagawa T, Khor SS, Omae Y, Toyo-Oka L, Sugaya N, Kawamura

Y, Umekage T, Miyashita A, Kuwano R, Kaiya H, Kasai K, Tanii H, Okazaki Y, Tokunaga K, Sasaki T. Hum Genome Var. 2016 Feb 25;3: 16001, doi: 10.1038/hgv.2016.1. eCollection 2016.

4) Meta-analysis of genome-wide association studies of anxiety disorders.

Otowa T, Hek K, Lee M, Byrne EM, Mirza SS, Nivard MG, Bigdeli T, Aggen SH, Adkins D, Wolen A, Fanous A, Keller MC, Castelao E, Kutalik Z, Van der Auwera S, Homuth G, Nauck M, Teumer A, Milaneschi Y, Hottenga JJ, Direk N, Hofman A, Uitterlinden A, Mulder CL, Henders AK, Medland SE, Gordon S, Heath AC, Madden PAF, Pergadia M, van der Most PJ, Nolte IM, vanOort FVA, Hartman CA, Oldehinkel AJ, Preisig M, Grabe HJ, Middeldorp CM, Penninx BWJH, Boomsma D, Martin NG, Montgomery G, Maher BS, van den Oord EJ, Wray NR, Tiemeier H, Hettema JM Molecular Psychiatry 21, 2016,1391-1399 10.1038/mp.2015.197

5 ) Candidate Genes in Panic Disorder: Meta-analyses of 23 common variants in major anxiogenic pathways.

Howe A, Buttenschøn H, Bani-Fatemi A, Maron E, Otowa T, Erhardt A, Binder E, Gregersen N, Mors O, Woldbye D, Domschke K, Reif A, Shlik J, Koks S, Kawamura Y, Miyashita A, Kuwano R, Tokunaga K, Tanii H, Sasaki T, De Luca V, Smoller J, Koszycki D Molecular Psychiatry 21,2016,665-679, 10.1038/mp.2015.138

6) Dysfunction of ventrolateral prefrontal cortex underlying social anxiety disorder: A multi-channel NIRS study.

Yokoyama C, Kaiya H, Kumano H, Kinou M, Umekage T, Yasuda S, Takei K, Nishikawa M, Sasaki T, Nishimura Y, Hara N, Inoue K, Kaneko Y, Suzuki S, Tanii H, Okada M, Okazaki Y.

Neuroimage Clin. 2015 May 28;8: 455 -61. doi: 10.1016/j.nicl.2015.05.011. eCollection 2015.

7) Gender-specific association between the COMT Val158Met polymorphism and openness to experience in panic disorder patients.

Konishi Y, Tanii H, Otowa T, Sasaki T, Motomura E, Fujita A, Umekage T, Tochigi M, Kaiya H, Okazaki Y, Okada M.

Neuropsychobiology. 2014;69(3):165-74. doi: 10.1159/000360737. Epub 2014 May 16.

#### 学会発表

1) Genome-wide association study in a Japanese sample identifies candidate loci for HLA-DRB1\*13:02-negative panic disorder

Mihoko Shimada, Takeshi Otowa, Taku Miyagawa, Seik-Soon Khor, Yosuke Omae, Licht Toyo-oka, Nagisa Sugaya, Yoshiya Kawamura, Tadashi Umekage, Akinori Miyashita, Ryoza Kuwano, Hisanobu Kaiya, Kiyoto Kasai, Hisashi Tanii, Yuji Okazaki, Katsushi Tokunaga, Tsukasa Sasaki

The 13th International Congress of Human Genetics  
2016年4月3日-7日 京都国際会館

2) Epigenome-wide association study of DNA methylation in panic disorder

Mihoko Shimada-Sugimoto, Takeshi Otowa, Taku Miyagawa, Nagisa Sugaya, Yoshiya Kawamura, Tadashi Umekage, Hisanobu Kaiya, Kiyoto Kasai, Hisashi Tanii, Yuji Okazaki, Katsushi Tokunaga and Tsukasa Sasaki

America Society of Human Genetics 2016 2016年10月21日 バンクーバー(カナダ)

3) ニック症のゲノムワイド関連解析の HLA アリルに

#### よる層別解析

杉本美穂子, 音羽健司, 宮川卓, Khor Seik-Soon, 大前陽輔, 豊岡理人, 柏瀬貢一, 小島裕人, 二神貴臣, 佐治博夫, 佐々木司, 徳永勝士  
日本組織適合性学会 第25回大会 2016年10月23日 北海道大学

#### 6. 研究組織

研究代表者 梅景 正(Umekage Tadashi), 東京大学・環境安全本部・准教授、研究者番号(20323587)

研究分担者 音羽 健司(Otowa Kenji) 帝京平成大学・臨床心理学研究者・教授、研究者番号(70456119)