

博士論文

双極性障害トリオ家系のエクソーム解析による
デノボ変異の同定

片岡 宗子

2. 序文.....	6
2-1. 双極性障害の概要.....	6
2-2. 双極性障害の疫学.....	15
2-3. 双極性障害における遺伝子研究の歴史.....	16
2-4. デノボ変異とその研究.....	19
2-5. DNA マイクロアレイの概要.....	23
2-6. サンガーシーケンス法の概要.....	25
2-7. 次世代シーケンサーの概要.....	26
2-8. パイロシーケンス法の概要.....	28
2-9. イルミナ社 Hiseq の概要.....	29
2-10. WES とシーケンス前処理.....	31
2-11. GO 解析の概要.....	32
2-12. 双極性障害におけるエクソーム解析研究の動向.....	34
2-13. 本研究の目的.....	36
3. 方法.....	38
3-1. 対象.....	38
3-2. サンプルの採取法.....	43
3-3. DNA 抽出.....	44
3-4. エクソン領域のキャプチャとライブラリ調製.....	46
3-5. Hiseq による塩基配列決定.....	50
3-6. 塩基配列情報の処理とデノボ変異の抽出.....	51
3-7. サンガーシーケンス法による変異の確認.....	53
3-8. パイロシーケンス法による体細胞変異の確認.....	57
3-9. アレイ CGH 法によるデノボ CNV の確認.....	60
3-10. EHD1 変異の機能解析実験.....	63

3-11. 統計解析.....	70
4. 結果.....	71
4-1. 被験者の特徴と収集された唾液サンプルの状態.....	71
4-2. 唾液採取時間による DNA 収集量の確認実験.....	74
4-3. 被験者 DNA 収集量と質の検討.....	76
4-4. エクソームデータのインフォマティクス解析により見出されたデノボ SNV 候補のリスト.....	79
4-5. デノボ SNV の実験的確認と確認されたデノボ SNV のリスト.....	82
4-6. 体細胞変異の変異率の測定.....	90
4-7. EHD1 の機能解析-EHD1 と snapin の結合能の検討.....	93
4-8. エクソームデータのインフォマティクス解析により見出されたデノボ CNV 候補の実験的確認.....	96
4-9. デノボ SNV の個数と両親の年齢、発症年齢との関係.....	97
4-10. DAVID を用いたデノボ SNV の Gene Ontology (GO) 解析.....	100
5. 考察.....	104
5-0. サンプル募集に関する考察.....	104
5-1. 対象とサンプル.....	106
5-1-1. 対象.....	106
5-1-2. 唾液サンプルの量と質.....	106
5-2. 同定されたデノボ SNV 及びデノボ CNV に関する検討.....	109
5-2-1 体細胞変異に関して.....	109
5-2-2. デノボ変異の個数の検討.....	110
5-2-3. 年齢との相関.....	119
5-3 デノボ変異が見いだされた遺伝子の考察.....	122
5-3-1. GO 解析.....	122

5-3-2. EHD1 機能解析	124
5-5. 今後の展望.....	127
6. 謝辞.....	129
7. 参考文献.....	130
8. 図の凡例	137

1. 要旨

双極性障害は、躁状態とうつ状態を繰り返す二大精神疾患の一つである。本研究では、本邦の双極性障害患者及びその両親（トリオ）についてヒト DNA の全エクソーム解析を行い、患者は持つが両親は持たない変異（デノボ変異）を探索した。我々は 79 トリオ家系の解析を行い、42 家系計 71 か所のデノボ一塩基変異（SNV）と、1 家系計 1 か所のデノボコピー数変異（CNV）を同定した。患者一人当たりのデノボ変異の個数は既報の健常者における値と有意差がなかった。また、デノボ SNV を持つ群は持たない群より発症年齢が有意に低かった。Gene Ontology 解析では、Ca²⁺イオン関連パスウェイにおけるエンリッチメントを認めた。

2. 序文

2-1. 双極性障害の概要

双極性障害とは、躁状態とうつ状態を定期的に繰り返す気分障害である¹。うつ状態と躁状態の両方が、症状のない寛解期を挟みながら繰り返すのが特徴である²。最初の病相から次の病相までは3～6年を経過することが多いが、病相を繰り返す毎に病相間隔は短くなっていく。一方で急速交代型とよばれる年4回以上の気分エピソード（躁状態、軽躁状態、うつ状態のいずれか）を繰り返す型もある。双極性障害の診断は、アメリカ精神医学会が定義した国際的な診断基準、DSM-5 (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5) に従って行なわれる。

躁状態の症状としては、気分の変化、認知の変化、行動の活発化が見られる。

第一に、躁状態では主に気分の高揚が起こり、楽しく清々しい気分になり（爽

快気分)、やる気に満ち溢れ動き続け (目標志向性の活動の増加)、多幸、多弁を呈する。一方で、情動の不安定化、不機嫌、易怒性の亢進といったいろいろな気分を伴う場合もある。第二に、躁状態では認知の変化が起こる。特に、自己認知の異常や、思考の異常などが起こる。自己認知の異常としては、自分が誰よりも優れた人間に思えたり (自尊心の肥大)、何でもできるような気分になったりする (万能感)。また、思考の異常としては、場当たりの考え方をし、考えが頭の中に幾つも浮かび競い合う感じがし、考えがどんどん膨らみ纏まらない (観念奔逸)、滅裂になる、自分は神だ等と奇抜な妄想を抱くようになる (誇大妄想)。第三に、躁状態では行動の活発化が起こる。具体的には、行動し続け (過活動、行為心迫)、疲れても眠らず (不眠、睡眠欲求の減少)、会話も成立しないほど延々と話し続け (多弁)、注意が続かず (注意転動性の亢進)、後先を省みず快楽的活動に熱中する (危険な運転、浪費等)。DSM-IV の

場合、躁状態の診断には上記の症状が1週間以上続くことが必要である。躁病

エピソードの診断基準（DSM-IV）を図1に示す²。（現在の臨床では主に、本研

究期間中に刊行されたDSM-5が用いられるが、ここでは本研究に用いたDSM-IV

を示す。）

図1 躁病エピソードのDSM-IV診断基準

躁病エピソードのDSM-IV診断基準

A. 気分が異常かつ持続的に高揚し、開放的または易怒的ないつもと異なった期間が、少なくとも1週間持続する。（入院治療が必要な場合はいかなる期間でも良い。）

B. 気分の障害の期間中、以下の症状のうち3つ（またはそれ以上）が持続しており（気分が単に易怒的な場合は4つ）、はっきりと認められる程度に存在している。

- (1) 自尊心の肥大、または誇大。
- (2) 睡眠欲求の減少。（例えば、3時間眠っただけでよく休めたと感じる。）
- (3) 普段よりも多弁であるか、しゃべり続けようとする心迫。
- (4) 観念奔逸、またはいくつもの考えが競い合っているという主観的な体験。
- (5) 注意散漫。（すなわち、注意があまりにも容易に、重要でないかまたは関係のない外的刺激によって他に転じる。）
- (6) 目標志向性の活動。（社会的、職場または学校内、性的のいずれか）の増加、または精神運動性の焦燥。
- (7) まずい結果になる可能性が高い快楽的活動に熱中すること。（例えば制御のきかない買いあさり、性的無分別、またはばかけた商売への投資などに専念すること。）

C. 症状は混合性エピソードの基準を満たさない。

D. 気分の障害は、職業的機能や日常の社会活動または他者との人間関係に著しい障害を起こすほど、

または自己または他者を傷つけるのを防ぐため入院が必要であるほど重篤であるか、または精神病性の特徴が存在する。

E. 症状は物質（例：乱用薬物、投薬、あるいは他の治療）の直接的な生理学的作用、または一般身体疾患（例：甲状腺機能亢進症）によるものではない。

注：身体的な抗うつ治療（例：投薬、電気けいれん療法、光療法）によって明らかに引き起こされた躁病様のエピソードは、双極型障害の診断にあたるものとするべきではない。

また、軽躁病エピソードの診断基準を図 2 に示す²。躁病エピソードでは、気分の異常は 1 週間以上続き、社会的活動や人間関係において著しい障害が起こるため、入院を必要とする場合がある。軽躁病エピソードでは気分の異常が 4 日間以上続くが、症状は社会的に著しい障害をもたらすほど重篤でなく、入院を必要としないことが多い。

図2 軽躁病エピソードのDSM-IV診断基準

軽躁病エピソードのDSM-IV診断基準

- A. 持続的に高揚した、開放的な、または易怒的な気分が、少なくとも4日間続くはっきりとした期間があり、それは抑うつのない通常気分とは明らかに異なっている。
- B. 気分の障害の期間中、以下の症状のうち3つ(またはそれ以上)が持続しており(気分が単に易怒的な場合は4つ)、はっきりと認められる程度に存在している。
1. 自尊心の肥大、または誇大。
 2. 睡眠欲求の減少(例えば、3時間眠っただけでよく休めたと感じる。)
 3. 普段よりも多弁であるか、しゃべり続けようとする心迫。
 4. 観念奔逸、またはいくつかの考えが競い合っているという主観的な体験。
 5. 注意散漫(すなわち、注意があまりにも容易に、重要でないかまたは関係の無い外的刺激によって他に転じる。)
 6. 目標志向性の活動(社会的、職場または学校内、性的のいずれか)の増加、または精神運動性の焦燥。
 7. まずい結果になる可能性が高い快楽的活動に熱中すること(例えば、制御のきかない買い漁り、性的無分別、馬鹿げた商売への投資などに専念すること。)
- C. エピソードには、症状のないときにはその人物に特徴的でない明確な機能変化が随伴する。
- D. 気分の障害や機能の変化は、他者から観察可能である。
- E. エピソードは、社会的または職業的機能に著しい障害を起こすほど、または入院を必要とするほど重篤でなく、精神病性の特徴は存在しない。
- F. 症状は物質(例:乱用薬物、投薬、または他の治療)の直接的な生理学的作用、または一般身体疾患(例:甲状腺機能亢進症)によるものではない。
(身体的な治療、例えば投薬、電気けいれん療法、光療法などによって明らかに引き起こされた軽躁病様のエピソードは双極Ⅱ型障害の診断とはしない。)

一方、うつ状態における症状としては、気分の落ち込み、思考の変容、身体的症状がある。第一に、うつ状態では気分の落ち込みが起こる。うつ状態の主要症状として、良い事があっても改善しないような憂鬱な気分(抑うつ気分)

と、普段であれば楽しめることにまったく興味がわからない（興味・喜びの喪失）がある。これらの症状は、ほとんど 1 日中、ほとんど毎日持続する。また、何もかも面倒でやる気がでない（意欲低下）、表情の乏しさや動きの小ささ（精神運動制止、寡動）、またはじっとしてられないそわそわした感じ（焦燥）等の症状が出現する。第二に、うつ状態では思考の変容が起こる。具体的には、現実とはそぐわない過剰な罪責感を強く感じ、集中力が低下し、自分は生きていても仕方がないなどと無価値感に襲われ、死について繰り返し考え（希死念慮）実際に自殺を試みたりする（自殺企図）。第三に、うつ状態では身体症状が出現する。具体的には、食欲の減少や増加、著しい体重減少や増加、不眠や睡眠過多、易疲労感が見られる。うつ状態の診断には、上記のような症状が 2 週間以上続くことが必要である。大うつ病エピソードの診断基準（DSM-IV）を図 3 に示す²。

図3 大うつ病エピソードのDSM-IV診断基準

大うつ病エピソードのDSM-IV診断基準

A. 以下の症状のうち5つ(またはそれ以上)が同じ二週間の間に存在し、病前の機能からの変化をおこしている。これらの症状のうち少なくとも1つは、(1)抑うつ気分または(2)興味または喜びの喪失である。(明らかに、一般身体疾患または気分不一致な妄想または幻覚による症状は含まない。)

1. 患者自身の言明(例えば悲しみまたは、空虚感を感じる)か、他者の観察(例えば涙を流しているように見える)によって示される、ほとんど一日中、ほとんど毎日の抑うつ気分。(小児や青年ではいらいらした気分もありうる。)

2. ほとんど一日中、ほとんど毎日の、すべて、またはほとんどすべての活動における興味、喜びの著しい減退。(患者の言明または他者の観察によって示される。)

3. 食事療法をしていないのに、著しい体重の減少、あるいは体重増加(例えば1ヶ月で体重の5%以上の変化)、またはほとんど毎日の食欲の減退または増加。(小児の場合、期待される体重増加がみられないことも考慮。)

4. ほとんど毎日の不眠または睡眠過多。

5. ほとんど毎日の精神運動性の焦燥または制止。(他者によって観察可能で、ただ単に落ち着きがないとか、のろくなったという主的感覚でないもの。)

6. ほとんど毎日の易疲労性、または気力の減退。

7. ほとんど毎日の無価値観、または過剰であるか不適切な罪責感。(妄想的であることもある。単に自分をとがめたり、病気になったことに対する罪の意識ではない。)

8. 思考力や集中力の減退、または決断困難がほとんど毎日認められる。(患者自身の言明による、または他者によって観察される。)

9. 死についての反復思考(死の恐怖だけではない)、特別な計画はないが、反復的な自殺念慮、自殺企図、または自殺するためのはっきりした計画。

B. 症状は混合性エピソードの基準を満たさない。

C. 症状には著しい苦痛または社会的、職業的または他の重要な領域における機能の障害を引き起こしている。

D. 症状は物質(例:乱用薬物、投薬)の直接的な生理学的作用または一般身体疾患(例:甲状腺機能低下症)によるものではない。

E. 症状は死別反応ではうまく説明されない。すなわち愛する者を失った後、症状が2ヶ月をこえて続くか、または著明な機能不全、無価値観への病的なとらわれ、自殺念慮、精神病性の症状、精神運動制止があることで特徴づけられる。

双極性障害は、躁状態を伴うか、軽躁状態のみかにより、双極Ⅰ型障害と双極Ⅱ型障害に分類される。両者の診断基準（DSM-IV）を図4に示す²。双極Ⅰ型障害では、その経過中に大うつ病エピソードと躁病エピソードが認められる。これに対し、双極Ⅱ型障害では、大うつ病エピソードと軽躁病エピソードが認められる。急速交代型は、双極性障害Ⅱ型また女性に多い。

図4 双極性障害Ⅰ型、Ⅱ型のDSM-IV診断基準

双極Ⅰ型障害

単一エピソードの場合

- A 1回のみ躁病エピソードが存在し、以前に大うつ病エピソードが存在しない。
- B 躁病エピソードは、分裂感情障害ではうまく説明されないし、統合失調症（精神分裂病）、分裂病様障害、妄想性障害または特定不能の精神病性障害に重畳したものではない。
この単一エピソードは、躁病の初回のエピソードだけに用いる。

単一エピソード以外の双極Ⅰ型障害は、反復性のもので、現在または最も新しいエピソードにより、最も新しいエピソードが軽躁病、躁病、混合性、うつ病、特定不能の5組に分かれる。

双極Ⅱ型障害（軽躁病エピソードを伴う反復性大うつ病エピソード）

- A 1回またはそれ以上の大うつ病の存在。（または既往歴。）
- B 少なくとも1回の軽躁病エピソードの存在。
- C 躁病エピソードまたは混合性エピソードが存在したことがない。
- D 基準AとBの気分症状は、分裂感情障害ではうまく説明されないし、統合失調症（精神分裂病）、分裂病様障害、妄想性障害または特定不能の精神病性障害に重畳したものではない。
- E その症状は臨床的に著しい苦痛または、社会的、職業的、または他の重要な領域における機能の障害を引き起こしている。（現在または最も新しいエピソードを軽躁病またはうつ病と特定する。）

双極性障害の治療には、主に気分安定薬であるリチウムやバルプロ酸、カルバマゼピン、ラモトリギンの他、オランザピン、クエチアピン等の抗精神病薬も用いられる。リチウムは抗躁・抗うつ効果、再発予防効果を持つ、双極性障害の基本的薬剤である。リチウムの作用機序には諸説あるが、細胞内シグナル伝達系、特にイノシトールリン脂質系やアデニル酸シクラーゼ系に対する作用説が有力である。バルプロ酸は、リチウムと同程度の抗躁効果を持つ。リチウムとバルプロ酸の有効性には必ずしも関連は無く、リチウム無効症例に対してバルプロ酸が有効な場合がある。バルプロ酸の作用機序にも諸説あるが、電位依存性 Na^+ チャネルの抑制作用、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの抑制作用、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用、小胞体ストレスタンパクへの作用等の説がある。

このように、双極性障害には、リチウムやバルプロ酸などエビデンスのはっきりした治療薬が存在する。しかし、薬剤では気分の波をコントロールしきれ

ない患者や、薬剤抵抗性の患者、病識や知識の乏しさから治療を中断する患者、福祉や家庭環境のサポートの不足等により再発を繰り返す患者も多い。また、双極性障害による社会機能障害は、糖尿病や高血圧等の慢性疾患よりも大きく、社会負担も重い。にも拘らず、現時点で双極性障害の発症メカニズムも気分安定薬の作用機序も未だ解明されていない。双極性障害の病因解明研究また治療薬開発研究は、急を要する責務である。

2-2. 双極性障害の疫学

双極性障害の疫学については次の通りである³。生涯罹患率については、双極 I 型障害ではおよそ 0.4-1.7% であるのに対し、双極 II 型障害はおよそ 0.3-4.8% 程度である。また、双極 I 型障害は男女間で生涯罹患率に差が無いのに対し、双極 II 型障害は女性での方が罹患率が高いとの報告が多い。平均発症年齢は双極 I

型障害と双極Ⅱ型障害で差が無く、20代後半である。

双極Ⅰ型障害は定型的な躁病相、うつ病相を示すことが多いのに対し、双極Ⅱ型障害では、混合状態や、非定型の特徴を伴う症状（過眠、過食、鉛様の麻痺、対人関係に対する敏感さ）を示す患者が多いと報告されている。また、双極Ⅱ型障害は、不安障害（45%）や人格障害（33%）、薬物乱用・依存（38.9%）との併存が多いことも特徴である。自殺の危険率に関しては、双極Ⅱ型障害（24%）が双極Ⅰ型障害（17%）よりも高い。

2-3. 双極性障害における遺伝子研究の歴史

躁うつ病の双生児研究は1920年代から行われ、その一致率は一卵性双生児で77%、二卵性双生児で23%程度と報告されている。これは双極性障害の発症に遺伝要因が強く関与している事を示している。躁うつ病が双極性障害と命名されて以降は、1977年デンマークの Bertelsen ら⁴により行われた双極性障害の双

生児研究にて、双極 I 型障害では、発症一致率が一卵性双生児で 80%、二卵性双生児で 13%に対し、双極 II 型障害では一卵性双生児で 78%、二卵性双生児で 31%と報告されている³。

Amish Study 等の家族研究によると、患者の第 1 親族の発症率は 1.5~15.5%である。これは一般人口における生涯罹患率の 1%前後より有意に高い。また、家族研究によると双極 I 型障害の家族には双極 I 型障害が多く、双極 II 型障害の家族には双極 II 型障害が多いことが報告されている¹。また、双極性障害の遺伝率を計算すると (Holzinger の遺伝率 = 一卵性双生児の発症一致率 - 二卵性双生児の発症一致率 / 100 - 二卵性双生児の発症一致率)、双極 I 型障害では遺伝率が 77%であるのに対し、双極 II 型障害では 68%である。これらのことより、双極 I 型障害と II 型障害との間には遺伝的な差異があると考えられている。

DNA マイクロアレイの開発により頻度の高い (マイナーアレル頻度 5%以上)

一塩基多型 (SNP : Single Nucleotide Polymorphism) や、コピー数変異 (CNV : copy Number Variation; 1kbp 以上にわたってゲノムが重複・欠失するタイプの個人差) を網羅的に解析することが可能になった。そこで 2007 年頃より全ゲノム関連解析 (GWAS : Genome-Wide Association Study) が盛んにおこなわれるようになった。これにより *CACNA1C* 等、疾患と関連していると考えられる多型 (SNP) が多数同定されたが、それらの遺伝子一つ一つが疾患に及ぼす影響はいずれも小さく、(OR [Odds Ratio]=1.2 以下) 原因遺伝子と呼ぶには十分とは言えなかった^{5,6}。CNV に関しては、2011 年に若年発症 (18 歳未満) の患者群では有意にデノボ CNV が多いという報告がなされたが⁷、後の研究では再現されていない^{8,9}。

このように、これまで様々な研究が双極性障害の高い遺伝率を示唆しているにもかかわらず、その明確な原因遺伝子は特定されていない。よって、この双

極性障害の高い遺伝率の大部分は、missing heritability（失われた遺伝率）であると認識されている¹⁰。

最近では、マイクロアレイでは特定できないような頻度5%以下のより稀な変異に疾患原因を求める動きが強まっている。本研究は、近年注目されている稀な変異の一つ、デノボ変異に注目したものである。

2-4. デノボ変異とその研究

デノボ変異とは両親が持たずに子のみが持つ、新たに発生した変異（デノボ＝ラテン語で「新たな」）を意味する。その多くは生殖細胞における突然変異に由来し、そのためデノボ変異の頻度は父親の年齢と正に相関することが知られている¹¹。自閉症スペクトラム障害、統合失調症などの精神疾患においても、父親の年齢が上昇するほどデノボ変異の数は増加するということがわかっている

知的障害、自閉症スペクトラム障害（ASD：Autism Spectrum Disorder）、統合失調症などの精神疾患を持つ患者は、生殖適応度（子孫を残す確率）が健常者に比べて大幅に低い²⁵ ため、その原因となる遺伝子変異は自然選択により淘汰されるはずである。にも拘わらず、これらの疾患は世界的にいつの時代も有病率に大きな変動がないと考えられている。その理由として、ある世代で突然新たに生じる変異であるデノボ変異が一定数生じることによって、発症率が一定に保たれているのではないかという説が以前から唱えられており、統合失調症や ASD に関しては、CNV と疾患の関連が多数報告されてきているが、その一部がデノボ CNV であることも報告されている¹²。近年の次世代シーケンサーの開発により、ヒトゲノム配列が一塩基単位の解像度でより安価に解読できるようになったことで、CNV より更に特異的な、デノボ SNV の網羅的解析が可能とな

った。

デノボ SNV の網羅的解析では現在のところ ASD において最も大規模な研究が行われており、2012 年、Sanders らは、Simons Simplex Collection (SSC) のトリオ家系（患者とその両親）を用いて 15 パーセントの患者の発症にデノボ変異が関与していることを報告した¹³ また、同時に Iossifov ら¹⁴、O’Roak ら¹⁵、は自閉症トリオ家系のエクソーム解析を報告した。

2014 年に Iossifov ら¹⁶が、それら 3 つの自閉症エクソーム研究をまとめ、総合的に解析した研究の報告をした。

統合失調症においては、2012 年に 231 の患者トリオと 34 の健常トリオを解析した研究がなされた。そして、患者群では蛋白配列の変化を伴う変異（LOF とミスセンス変異）が多く、4 つの遺伝子に複数の機能的デノボ変異を認め、これらは期待されるよりも多いことなどが報告された¹⁷。近年 Fromer ら¹⁸は統合失

調症 3000 人規模のコンソーシアムのエクソーム解析論文を発表した。

知的障害では IQ50 未満の患者 100 人とその両親を解析した研究では、過去に知的障害と関連していると報告がある遺伝子や、それらの遺伝子と深く関わる遺伝子中のデノボ変異などが認められ、これらについて遺伝子診断を行うことができたと考えられると報告された¹⁹。また 5 つの候補遺伝子を選択し、765 トリオでさらに検索を行った結果、3 つの遺伝子 (*DYNC1H1*, *GATAD2B*, *CTNNB1*) では別の患者でもデノボ変異が同定された。51 人の患者対 20 人の健常者とそれぞれの両親を解析した研究では、患者群の LOF 変異が有意に多く、16 人の患者で既知の知的障害関連遺伝子が発見され、複数の患者で認められた遺伝子が 3 つあったと報告されている²⁰。

双極性障害においては、父親の年齢が高いほど、双極性障害のリスクが高まり¹²特に父親が 50 歳以上では OR が 2.84 にもなる⁴³。また、双極性障害患者は

健常者より有意に子が少なく、男性で OR=0.75、女性では OR=0.85 と生殖適応度が低い^{25,26}という報告がある。一方、双極性障害と CNV の関連については、早期発症の双極性障害とデノボ CNV の関連があるとの報告が 2011 年にされている²⁷が、これを否定する報告もなされている⁸。デノボ SNV に関する報告は未だなされていない。

2-5. DNA マイクロアレイの概要

ゲノム DNA の構造変化を検出する方法として、現在でも臨床検査として一般的に使用されている G バンド分染法（ギムザ染色により染色体バンドを染色し、欠失、重複等を検索する）、特定の塩基配列と結合するプローブ（蛍光タグを付けた短い DNA 鎖）を患者組織の細胞核と反応させ、蛍光顕微鏡で観察する FISH 法がある。

DNA マイクロアレイは DNA チップともよばれる。これはスライドガラスやシリコン製の基板の上に、人工的に高密度に配置された DNA オリゴプローブと調べたいゲノム DNA をハイブリダイゼーションし、プローブと結合する塩基配列を検出する手法であり、主に遺伝子の発現量や、上述の一塩基多型等を網羅的に調査するために利用される。

本研究では、次世代シーケンサー (Hiseq) を用いた解析で同定されたデノボ CNV 候補の確認に、アレイ CGH 法を用いた。アレイ CGH 法は、マイクロアレイと CGH(Comparative Genomic Hybridization:比較ゲノムハイブリダイゼーション)法を組み合わせた手法である。CGH 法とは、全染色体を対象としてゲノム DNA が増幅、欠失した領域を調べる手法であり、マイクロアレイと組み合わせることで、効率的に目的遺伝子やコピー数変異を検出することができるシステムである。

2-6. サンガーシーケンス法の概要

ヒトゲノム計画にてヒト DNA 全体を解読しようという試みがなされた際、使用されたのがサンガーシーケンス法であった。サンガーシーケンス法は Sanger らによって開発された DNA の遺伝子配列を同定するために用いられる手法である。PCR 法や大腸菌導入により増幅された DNA 断片を鋳型にしたサンガー反応につづき、ゲル電気泳動、キャピラリーシーケンサー等によるサイズ分画を行うことにより塩基配列を決定する。具体的には次の通りである。

4 色の蛍光ラベルされたダイターミネーターと呼ばれるジデオキシリボヌクレオチド 3 リン酸を反応液に混ぜて、DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長反応を行う。ダイターミネーターが取り込まれるとプライマー伸長反応は停止し様々な長さの断片が生じるが、この断片はダイターミネーターの取り込まれた部位の塩基によって異なる蛍光体でラベルされているため、DNA を電気泳動

によって分離し、蛍光の種類を検出することにより DNA の塩基配列を決定することができる。電気泳動での検出にはガラスキャピラリー中で電気泳動を行うキャピラリーシーケンサーが利用される。キャピラリーは検出部位で 1 次元に整列させられ、レーザー光で励起された蛍光シグナルの検出を行う。

本研究では、次世代シーケンサー (Hiseq) によって得られたシーケンスデータの解析により抽出したデノボ SNV 候補が、実際に存在するかどうかを確認するためにこの手法を用いた。

2-7. 次世代シーケンサーの概要

サンガー法によるキャピラリー電気泳動を用いたシーケンス法の開発によって、多様な生物全般の遺伝情報の解読が可能となった。サンガーシーケンス法は現在も多くの研究室で使用されているが、データのスループット、拡張性、

スピード、解像度、コストといった面での制限があり、多くの必要な遺伝情報を引き出すことが難しかった。しかし、2006年に新しい原理に基づく高出力なDNAシーケンサーが誕生し、圧倒的なデータ量とスピードでDNA解読の大幅なコストダウンをもたらした。サンガーシーケンサーに対し、これら新型のシーケンサーを総称し次世代シーケンサーと呼ぶ。本研究で使用したパイロシーケンス法、可逆的ターミネータを使用したイルミナ社のHiseqは、第2世代の次世代シーケンサーに分類される。サンガー法の1ランあたり672K塩基/1時間に対し、パイロシーケンス法では3.5~30M塩基/1時間、Hiseqでは2~4G塩基/1時間と大幅な出力の増加が実現した。コスト面においてもヒトゲノム計画においてヒトゲノム解読に要したコストはおよそ30億ドルであったものが、現在では1万ドルを下回っている。次世代シーケンサーの開発により、ゲノム研究に新たな可能性が広がった。

2-8. パイロシーケンス法の概要

パイロシーケンス法とは、DNA ポリメラーゼによる塩基伸長反応を定量的に測定することで、リアルタイムかつ定量的にシーケンス反応を行う手法である。

この定量性に基づき、DNA メチル化比率解析や SNPs のアレル頻度解析を行うことができる。

パイロシーケンス法はDNA ポリメラーゼによる塩基伸長反応を基本としている。まず、パイロシーケンサがプライマーとテンプレートの入ったウェルに対し、1種類ずつ dNTPs を添加してゆく。テンプレートに相補する dNTP が添加されたときのみ DNA ポリメラーゼによる塩基伸長反応が起こり、ピロリン酸が定量的に発生する。このピロリン酸に基づいてカスケード反応が起こり、ルシフェラーゼ発光反応として検出される。このように、伸長反応が起きた塩基の量に比例して発光反応が起こるため、DNA メチル化比率や SNPs のアレル頻度を

定量的に測定することができる。ただし、1塩基が連続する配列の場合、その塩基数に応じてシグナル強度が強くなるという特徴から、パイロシーケンスは原理的に連続塩基の読み出しに弱いことが知られている。パイロシーケンス法による SNV のアリル頻度解析には、ビオチン処理したシーケンスプライマーを用いる。

パイロシーケンス法を用いれば、確認されたデノボ変異の変異率を定量的に測定することができる。本研究では、サンガー法にてシグナルの低い変異が確認された対象に関して、その実際の変異率の程度をパイロシーケンス法を用いて確認した。

2-9. イルミナ社 HiSeq の概要

イルミナ社のシーケンサーはブリッジ PCR と可逆的ターミネータを用いた

DNA ポリメラーゼによる逐次合成を基本としている。ブリッジ PCR とは、フローセルと呼ばれるガラス基板上に固定化された 2 種の PCR プライマーを用いて鋳型 DNA の増幅を行う手法をいう。基板上に固定されたプライマーから伸長した DNA 鎖が、近傍のプライマーにアニールし、繰り返しブリッジを形成しながら伸長を繰り返すことで、直径 1 ミクロン程度のクラスターを無数に形成する。塩基の読み取りは可逆的ターミネータと呼ばれる蛍光標識された特殊なヌクレオチド基質を使用し 1 塩基ごとに伸長反応を行うことにより、4 色の蛍光画像としてスキャンされる。これをデータ化することによって、塩基配列の決定を行う。無数のクラスター配列を同時並行して塩基配列決定するシステムにより、桁違いのハイスループットを実現しているのである。イルミナシーケンサー HiSeq はこれまでに様々な改良を経て、2500 が最新の機種である。今回はエクソームキャプチャしたゲノム DNA の塩基配列決定にこの HiSeq2000 または 2500

を使用した。

2-10. WES とシーケンス前処理

次世代シーケンサーの開発により、ヒトゲノムの解読がより短時間、低コストで可能となった。しかし、全ゲノムを塩基配列決定する全ゲノムシーケンス解析（WGS : Whole Genome Sequencing）で多数のヒトゲノムを解読するには、大幅なコスト低下があったとはいえ多大な費用が未だに必要であり、また得られた莫大なデータを処理するにも多大な労力と時間を要する。そのため、多くの研究ではゲノムのうち、タンパク質コーディング領域であるエクソン領域のみを選択的に解読する全エクソーム解析（WES : Whole Exome Sequencing）という手法を用いている。本研究も、WES を用いて解析を行った。

WES では、シーケンス前処理としてエクソン領域を選択してキャプチャする

工程（ライブラリ調製とハイブリダイゼーション）が必要となる。まずゲノム DNA は物理的に断片化され、末端修復後アデニンが付加され、両末端にアダプターが結合される。両端にアダプターが付加された DNA 断片は PCR 反応により増幅され、ビオチン標識 DNA もしくは RNA プローブとハイブリダイズさせる。ハイブリダイズされた DNA はストレプトアビジン磁気ビーズによって回収され、PCR 増幅後 NGS にかけてシーケンスする。エクソームキャプチャーキットは 3 社から販売されておりすべてほぼ全遺伝子のタンパク質コード領域を網羅している。本研究ではアジレント社のエクソームキャプチャーキット（SureSelect^{XT}HumanAll Exon キット）を使用した。

2-11. GO 解析の概要

Gene Ontology (GO : 遺伝子オントロジー) とは、生物学的概念を記述するための共通言語を策定しようとする試みのことである。遺伝子解析、バイオイン

フォーマティクス分野の発達により様々な種の遺伝子情報がデータベース化されているが、これらの情報を有効利用するためには、共通言語を用いてこれらの情報を記述しなければならない。遺伝子を GO にて記述するためのツールはインターネット上で無料提供されている。GO を記述する用語は GO タームと呼ばれる。GO タームには、biological process (生物学的プロセス)、cellular component (細胞の構成要素)、molecular function (分子機能) の 3 つのカテゴリーがある。

本研究において用いられた、DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) ^{28,29} は、GO ツールの一つであり、ある遺伝子リストにどんな機能をもつ遺伝子が集積 (エンリッチ) しているかを調べたり、そのリストを遺伝子機能により分類したり、関連する機能を持つ他の遺伝子を検索したりすることができる。

2-12. 双極性障害におけるエクソーム解析研究の動向

双極性障害における全エクソン解析研究の最近の報告を以下にまとめる³⁰。

Goes ら³¹は、現在、937 症例と 912 例の健常者を全ゲノムシーケンスしている。また、同チームは 8 家族の多発家系の連鎖解析研究も行っている。報告では 191 の患者群と 107 の健常者群の比較にて MAPK シグナルを含めた 7 個の遺伝子群との関連が示された。Cruceanu ら³²はリチウム反応性の高い双極性障害家系（この家系には 1-3 世代内に 3-7 人の双極性障害患者が存在する）から 250 名をエクソーム解析し、*ZNF259*、*MTOR* を双極性障害関連遺伝子として報告した。また、Amish 家系の研究として、George らが 497 人の大家系のうち 388 人の SNP について連鎖解析を行い、そのうち 23 人の患者を含む 50 人を対象にエクソーム解析を行った。Strauss ら³³は、同様に、Amish の 7 人の患者を含む 14 人をエクソーム解析した。10 個の遺伝子が抽出され、これらを 340 名のコント

ロール家系と比較した。14名全員にて共通していた変異は *KCNH7*, *R394H* 変異であった。

Fiorentino ら³⁴は、99名のI型患者について全ゲノム解析を行っている。GWASにて双極性障害との関連が報告されている *ANK3* と *CACNA1C* に注目し、1510名の患者群と1095名の健常者群にて追跡した。*CACNA1C*、*ANK3* それぞれに1か所ずつ、双極性障害との関連変異を認めた。

Ament ら³⁵は2015年、41家系200人の双極性障害多発家系において既知の3,087箇所の疾患関連遺伝子を探索した。双極性障害家系ではGABBA受容体サブユニットや電位依存性Caチャンネルなどをコードする遺伝子に稀な変異が多いこと、*GABRA6*の変異を含む4つの新規の変異などが発見された。また、3,014人の患者と1,717人の健常群において、26か所の変異のターゲットリシーケンスを行い、*ANK3*, *CACNA1B*, *CACNA1C*, *CACNA1D*, *CACNG2*, *CAMK2A*, 及び

NGFにおける稀な変異の関連を認めた。

以上のように、双極性障害の次世代シーケンサーを使用したゲノム研究は、現在のところ大家系の連鎖解析や、ケースコントロール解析が多く行われている。初期解析ではCaシグナル、CREBシグナル、Kチャンネル等の既報のパスウェイとの関連が示唆されている。しかし、自閉症や統合失調症と異なり、双極性障害においてはトリオ家系の解析は未だ行われていない。よって、この双極性障害エクソーム解析研究は世界初の報告となるものである。

2-13. 本研究の目的

2006年に開発された次世代シーケンサーの開発により広く安価に遺伝子配列を解読することができるようになったことで、遺伝学的研究が急速な発展を見せている。双極性障害の遺伝子研究も多数行われているが、未だその高い遺伝

率を証明できるような具体的な遺伝子変異は発見されていない。最近では ASD、統合失調症等の精神疾患においてデノボ変異の疾患への関与が多数報告されている。双極性障害においても、デノボ変異が疾患発症に関与している可能性を検索するため、当研究を開始した。

3. 方法

3-1. 対象

本研究を行うにあたり、理化学研究所脳科学総合研究センター精神疾患動態研究チーム主導のもと、双極性障害患者とその両親の 3 人で研究に参加できる被験者の募集を行った。募集は双極性障害研究ネットワークのメールマガジン、研究室のウェブサイト、当事者向け雑誌における広告の掲載、患者会や一般講演会における募集活動やクリニック等で配布したチラシ（図 5）を通じて、Eメールを連絡手段としての応募を求めた。専用のメールアドレスに対して応募があった者の中から、【1】精神科受診歴があり、躁うつ病または双極性障害と診断されている者、【2】両親が共に参加できる者、を候補者とし面接した。本研究の説明文書、研究への同意文書、臨床情報問診票、MINI（M.I.N.I international neuropsychiatric interview；精神疾患簡易構造化面接法）問診票、唾液サンプル採

取用キットをあらかじめそれぞれの被験者の元に送付し、後日電話面接を行った。面接後、書類及び唾液サンプルの返送を依頼し、【3】熟練した精神科医師により MINI 構造化面接を行い、双極 I 型障害または II 型障害と診断された者のみを採用した。MINI には双極性障害の既往、つまり現在寛解した双極性障害を診断する項目がないため、大うつ病エピソードの既往を質問事項に追加した。面接は主に電話面談（音声のみ）にて行ったが、一部対面にて行った者もある。患者と両親の面接を行ったが、患者の同胞が協力可能な場合はできる限り面接とサンプル収集を行った。6 名に関しては、研究チームのリーダーが長期に担当している症例であるため、診断ははっきりしているが、患者の追跡が困難であったため MINI 構造化面接は行われていない。

被験者面接と診断は、申請者を初めとして 4 名の精神科医が参加して MINI 構造化面接を行い、DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders,

Four Edition) に従って行った。被験者の身体既往、精神科家族歴、婚姻歴、最終学歴、職業、飲酒喫煙歴等の情報を問診票（図 5）記入と非構造化面接により得た。本研究において行った面接のうち、構造化面接以外の臨床情報に関しては、質問票に基づいて質問を行った。電話面接では、被面接者の親、兄弟、子に関する家族歴を聴取した。特に、精神科通院歴、休職歴、自殺者の有無等について確認した。上記の採用基準以外に特に除外した条件はない。被験者群は全て日本人である。

対象者全員から、書面によるインフォームドコンセントを得た。本研究は理化学研究所和光研究所研究倫理第一委員会（和光第一 15-4(20)）、及び関係各機関の倫理委員会の承認を受けた。

ここまでわかった そううつ病 (ゲノム研究編)

2. ゲノム研究の進展

ゲノムとは
ゲノムは、細胞が持つDNAの総称です。DNAは、細胞の核内にあり、遺伝子の集合体です。ゲノム研究は、ゲノムの全体的な構造や、遺伝子の働きを明らかにすることを目指しています。

ゲノム研究の進展
ゲノム研究は、遺伝子の働きを明らかにすることを目指しています。ゲノム研究は、遺伝子の働きを明らかにすることを目指しています。

ゲノム研究の進展
ゲノム研究は、遺伝子の働きを明らかにすることを目指しています。ゲノム研究は、遺伝子の働きを明らかにすることを目指しています。

ゲノム研究にご参加のお願い

2012年より、当チームで国際ゲノム研究センター（ICGC）における全ゲノム解析の取り組みを開始しました。

- 1. 研究目的の明確化
- 2. 参加者の募集
- 3. 全ゲノム解析

ご参加いただける方は、[bipolar@brain.rip.jp](mailto:bipolar@brain.riken.jp) までご連絡下さい。

ゲノム研究にご参加のお願い

2012年より、当チームで国際ゲノム研究センター（ICGC）における全ゲノム解析の取り組みを開始しました。

- 1. 研究目的の明確化
- 2. 参加者の募集
- 3. 全ゲノム解析

ご参加いただける方は、[bipolar@brain.rip.jp](mailto:bipolar@brain.riken.jp) までご連絡下さい。

ゲノム研究にご参加のお願い

2012年より、当チームで国際ゲノム研究センター（ICGC）における全ゲノム解析の取り組みを開始しました。

- 1. 研究目的の明確化
- 2. 参加者の募集
- 3. 全ゲノム解析

ご参加いただける方は、bipolar@brain.rip.jp までご連絡下さい。

ゲノム研究にご参加のお願い

2012年より、当チームで国際ゲノム研究センター（ICGC）における全ゲノム解析の取り組みを開始しました。

- 1. 研究目的の明確化
- 2. 参加者の募集
- 3. 全ゲノム解析

ご参加いただける方は、bipolar@brain.rip.jp までご連絡下さい。

ゲノム研究にご参加のお願い

2012年より、当チームで国際ゲノム研究センター（ICGC）における全ゲノム解析の取り組みを開始しました。

- 1. 研究目的の明確化
- 2. 参加者の募集
- 3. 全ゲノム解析

ご参加いただける方は、bipolar@brain.rip.jp までご連絡下さい。

図 5-1 被験者募集のために作成したポスター及びチラシ

臨床情報フォーム 平成 年 月 日記入

- 1 氏名 _____ 2 性別 (男 ・ 女)
- 3 生年月日 年 月 日 生まれ (歳)
- 4 身長 _____ cm, 体重 _____ kg
- 5 何かこれまでに体の病気で大きなものがありましたか？ 手術したことはありますか？
- _____
- _____
- 6 月経は (順 ・ 不順 ・ 閉経)
現在月経が続いている方で、月経前 10 日から開始後 2, 3 日に気分が不快になることはありますか？
(ある ・ ない)
- 7 たばこは吸いますか？ (はい _____ 本/日 ・ いいえ)
- 8 アルコールは飲まれますか？ (飲まない ・ つきあい程度 ・ 週に数日 ・ ほぼ毎日)
一日平均 _____ 程度 (500ml 缶ビール 1 本など)
- 9 高血圧といわれたことがありますか？または、治療中ですか？ (はい ・ いいえ)
- 10 高脂血症といわれたことがありますか？または、治療中ですか？ (はい ・ いいえ)
- 11 糖尿病といわれたことがありますか？または、治療中ですか？ (はい ・ いいえ)
- 11 生まれたときの状態はいかがでしたか？ (安産 ・ 難産 ・ 未熟児 ・ 仮死 ・ その他)
- 12 婚姻状態は？ (未婚 ・ 既婚 ・ 離婚 ・ 死別)
(離婚 回 ・ 再婚 回)
- 13 最終学歴は？
- 14 現在のご職業は？ ()
- 15 ご兄弟はいますか？いる場合、兄弟構成をおしえてください。
- また、ご家族（ご両親やご兄弟等）に精神や神経の病気で医者にかかったことがある方がいる場合、おしえてください。（例；兄（・・歳）うつ病、妹（・・歳）健康 等）
- 17 服用中の全ての薬をおしえてください。

ありがとうございました。

図 5-2 被験者の方々に送付しご記入頂いた臨床情報フォーム

3-2. サンプルの採取法

本研究では主に、被験者から採取された唾液サンプルを用いた。10 家系に関しては、すでに理化学研究所にて収集されていた双極性障害患者とその両親の末梢血由来 DNA サンプルを用いた。

唾液の採取には、被験者それぞれに郵送した Oragene 唾液採取キット (DNA genotek) 一人につき 1 キットを使用し、被験者自身がキットの取扱説明書を読むよう指示した上でそれぞれの時間と環境で行った。そのためその採取時間や環境に関しては不詳であり、それらは一定でない。プロトコルによると Oragene-DNA キットの唾液採取チューブに入っている Oragene・DNA 溶液の容量は 1.9ml であり、推奨される唾液採取量は 2ml とされている。よって、唾液 2ml と Oragene・DNA 溶液の全量は約 4ml となる。また 30 分以内に唾液採取しすぐに溶液と混合することが推奨されている。被験者の唾液採取後、返送され

理研にて受理された唾液サンプルは、トリオ 3 名（同胞がいる場合は 4 名以上）を 1 家系とし匿名化しナンバリングを行った上で、施錠したヒト材料保管庫に常温にて保管した。

一部の対象者については、上腕末梢血管から一般的手順により採血された末梢血由来 DNA を用いた。

3-3. DNA 抽出

唾液からのゲノム DNA 抽出は Oragene 唾液採取キットのプロトコルに従って行った。この工程は共同研究者である石渡みずほ氏と共同で行い、一部は小森敦子氏が行った。具体的には次の通りである。

まず、患者から返送されたチューブ入りのサンプル溶液を転倒混和し、唾液と DNA 溶液をよく混合した。そのままエアーインキュベーターに入れ、50°Cで一晩インキュベートした。1.5ml チューブに 500 μ l のサンプル溶液を移し、残り

のサンプルはそのまま室温保存場所に戻した。20 μ l の Oragene 精製溶液 (PT-L2P-5, DNA genotek) を加え、数秒間ボルテックスし攪拌したあと、氷上で 10 分間冷却する。室温で 15 分間遠心分離 (13000rpm,15000G) する。500 μ l 未満の上清を新しい 1.5ml チューブ (保存用、スクリーキャップ) に移し替え、残った沈殿物は廃棄する。600 μ l 程度 (上清の 1.2 倍量) の室温 95 - 100%エタノールを上清に加え、10 回静かに転倒混和し攪拌する。すると DNA が析出してくるので、DNA が完全に沈殿するよう室温で 10 分静置する。その後室温で 2 分間遠心分離 (13000rpm,15000G) する。DNA ペレット (沈殿物) を破壊しないように気を付けながら、上清を取り除き廃棄する。70%エタノールを 250 μ l 静かに加えて室温で 1 分間静置し、ペレットを破壊しないようにエタノールを完全に取り除く。もしもペレットが乱れてしまった場合は、室温にて 5 分間同条件の遠心分離を行う。ペレットの周囲が半透明になる程度に乾かした後、ペ

レットの大きさに従って 10-50 μ l の TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) に溶解する。軽くボルテックスし、室温で 1 日インキュベートして DNA を水和させる。完全に水和した DNA は 4 $^{\circ}$ C にて保存した。

その後 UV 分光光度計 (NanoDrop) を用いて DNA クオリティチェックを行った。続いて Qbit Fluorometer (Invitrogen) によるクオリティチェックを行い、DNA 収集量が 3 μ g に達すると次工程に進んだ。

別途末梢血から抽出した DNA サンプルに関しては、標準的なプロトコルを用いて抽出され、4 $^{\circ}$ C にて保存された DNA を使用した。

3-4. エクソン領域のキャプチャとライブラリ調製

エクソン領域のキャプチャとライブラリ作成の工程は、理化学研究所和光キャンパス 研究基盤センター 生体物質分析ユニットに依頼した。この工程は、

SureSelect^{XT} (ポストプール) ターゲットエンリッチメントシステムプロトコル

に従って行われた。エクソン領域のキャプチャには SureSelect^{XT}HumanAll Exon

キット Ver.4 または Ver.5、Ver.5+mitochondria (Agilent Technologies) を用いた。

実験手順は以下の通りである。

まず、超音波破碎装置 (コバリス S2) を使用し、サンプル DNA を断片化し

た。AMPureXP ビーズ (Beckman Coulter) を使用し断片化 DNA を精製 (磁気ビ

ーズに DNA を吸着させ磁力により分離することで、残存する dNTP や塩、プラ

イマーやプライマーダイマーなどの夾雑物を PCR 産物から取り除く) 後、バイ

オアナライザ (Agilent Technologies) (ゲル電気泳動を、専用チップを用いて機

械的に短時間で行うことのできる装置) により電気泳動を行い、サイズが 150

- 200bp 程度であることを確認した。次に、SureSelect XT Library Prep Kit, ILM

を使用しエンドリペアミックスと混合し、20°Cにて 30 分間インキュベートし、

末端修復を行った。再度 AMPureXP ビーズを使用し DNA を精製した。DNA 断片の 3'末端に A オーバーハングを付加 (37°C、30 分間) し、同様のビーズ精製を行った後、インデックス用アダプターをライゲーション (20°C、15 分間) し、再度同様のビーズ精製を行った。アダプターが付加された DNA ライブラリを、アダプター特異的プライマーで 5 サイクル PCR 反応し、増幅した。その後同様のビーズ精製を行った。バイオアナライザにて電気泳動し、約 225bp-275bp 程度のサイズであることを確認した。

上記手順にて調整したアダプター付き DNA ライブラリの濃度を 221ng/μl 以上となるよう濃縮した後、DNA750ng に SureSelect Block Mix を加え、95°C5 分間、65°C5 分以上にてハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーションバッファーミックス、RNaseBlock 希釈液、SureSelect オリゴキャプチャライブラリを室温で混合し、65°Cに保ったままの前述の DNA ライブラリ溶液に加え、そのまま

65°Cにて 24 時間ハイブリダイゼーションした。Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies) を調整し、キャプチャ済の DNA 溶液を加えた。ミキサー上で 30 分インキュベート後、磁石にセットし静置し、透明になった上清を取り除いた。洗浄液にて洗浄を 2 回繰り返し氷上に保管した。サンプルごとに異なるインデックスバーコードタグ付きのプライマーと Herculase II Fusion DNA Polymerase にて PCR 反応を行い、ビーズ付き DNA を鋳型として DNA 増幅を行った。AMPure XP ビーズと混合し、磁石スタンドを使って磁気ビーズとインデックス付き DNA を分離した。バイオアナライザにて 250-350bp のサイズであることを確認した。最後に、Library Quantification Kit (Illumina) を用いて定量 PCR を行い、濃度を算出した。Hiseq のフローセル 1 レーンに流すサンプル数 (5-6 サンプル) を濃度調整してプールし、Hiseq によるデータ解析に用いた。

3-5. Hiseq による塩基配列決定

塩基配列決定には、Hiseq2000 または 2500 (Illumina) を用いた。この過程は、理化学研究所横浜キャンパス (約 130 サンプル)、理化学研究所脳科学総合研究センター内情報基盤センター 生体物質分析ユニット (約 100 サンプル)、またはイルミナ社 (35 サンプル) に依頼した。なお、一部イルミナ社により行われたのは、納入された機械の不具合のためである。シーケンス反応により得られた画像は CASAVA (Illumina) を用いて解析され、FASTQ ファイル形式で提供された。このファイルは、1 つの配列の情報を 4 行の文字列のテキストにて記載したもので、1 行目は@で始まりその配列に関する情報が、2 行目はシーケンス配列、3 行目は + で始まり配列についてのヘッダー情報が、4 行目はシーケンスオリティが記載されている。(下 4 行)

```
@id_01 length=62
GACTACGTACAGAACAGATAATGACCATTTATACCGGAACAAATGGTTATCTGGATGGATTA
+id_01 length=62
IIIIIIIIIIICCCFFFFHHHHJJJJJJJJ<HHIJJJJJJJJJFHIJJJJJIJJJJJJ
```

3-6. 塩基配列情報の処理とデノボ変異の抽出

この過程は、共同研究者である的場奈々氏に依頼した。行われた工程は以下の通りである。

前過程より得られた FASTQ データより、FASTX-Toolkits (FASTQ のクオリティコントロール ; アダプター配列の除去、短いリードの除去、5' 末端、3' 末端からのトリミング、クオリティフィルタリング等を行うソフト) を使用してクオリティの低いデータのフィルタリングを行い、compfast_pe でペアが存在するリードのみを採用した。次に BWA-MEM を使用しヒトリファレンス (GRCh37+decoy) 配列上にそれぞれの塩基配列をマッピングし、Picard (<http://picard.sourceforge.net/>) を使用し SAM 形式ファイルから BAM 形式ファイルへの変換、ライブラリ調整時の PCR 重複リードの除去、GATK (The Genome Analysis Toolkit) を使用し挿入欠失部分のローカルアライメント補正と、変異の

抽出を行った。1家系の3人ともが20リード以上読めている部分のみ次の解析に進めた。デノボ変異は、発端者で少なくとも8リード以上が変異アレルを示しており、95%以上のリードが両親ともにリファレンス配列を示しているものと定義して抽出した。

公共の遺伝子変異データベース (dbSNP137 または NHLBI Exome Sequencing または 1000 ゲノムプロジェクト、the Exome Aggressin Consortium (ExAC) データセット) において Minor Allele Frequency [MAF] > 0.01 である変異、HLA 遺伝子上の変異は除外した。抽出されたデノボ変異は ANNOVAR³⁶ を使用し、トランスクリプトの情報には Ensembl を参照した。

デノボ CNV に関しては、eXome Hidden-Markov Model (XHMM)³⁷⁻³⁹ 及び Copy Number Inference From Exome Reads (CoNIFER)⁴⁰ を使用し、エクソームシーケンスタデータから CNV を探し出し、PLINK/SEQ

(<http://atgu.mgh.harvard.edu/plinkseq/>) を用いて同定した。PLINK⁴¹にて3つ以

上のエクソームキャプチャプローブにて支持されるものを採用し、2つのプローブにて支持されるもの、両親で2回以上出現するものは除外した。

3-7. サンガーシーケンス法による変異の確認

続いて、エクソームデータより抽出されたデノボ変異の候補が実際に存在するかどうか、サンガー法により実験的確認を行った。

まず、確認したいデノボ変異を含む DNA 断片を PCR 法によって増幅するため、プライマーの設計を行った。TaKaRa のプレデザインプライマーまたはカスタムデザインプライマーを使用した。TaKaRa のプライマー設計アルゴリズムにおいて設計不可能の判定が出た部位に関しては Primer3 を用いて自ら設計した。プレデザイン、Primer3 プライマーは 500–800bp、カスタムデザインプライ

マーは約 1000bp の断片を増幅するよう設定した。

使用した DNA サンプルは 1 か所の SNV につき、その変異が見つかった家系のトリオ（計 3 人）と、対照として健常被験者由来 DNA サンプルの 4 サンプルである。具体的実験手順は以下の通りである。

まず DNA サンプル 100ng（TE：Tris+EDTA）＋（DDW：Double distilled water 再蒸留水）を Tks Gflex DNA Polymerase（TaKaRa, 1.25U/μl）1μl、2×Gflex PCR Buffer（Mg²⁺, dNTP plus）25μl、各遺伝子のプライマーForward（50pmol/μl）0.2μl とプライマーReverse（50pmol/μl）0.2μl と混合し計 30μl とする。これをプレデザインプライマーの場合は PCR 条件を 94°C1 分間、60°C15 秒間を 32 サイクル繰り返し、60°Cで 4 分間最終伸長反応を行い、4°Cまたは 15°Cにてオーバーナイトで保存した。カスタムプライマーの場合は、PCR 条件は 94°C1 分間の後、98°C10 秒間、57°C15 秒間、68°C24 秒間を 32 サイクル繰り返し、68°C4 分間の

後 4°C または 15°C にてオーバーナイトで保存した。Primer3 に設計したプライマーの場合は、プライマー 100 pmol/μl 各 0.1 μl として混合し、総量を 30 μl とした後、カスタムプライマーと同様の条件で PCR 反応を行った。

PCR 反応後は 2% アガロースゲル電気泳動を行い、シグナルバンドが、設計したプライマーにて増幅されるフラグメントのサイズの位置に intact に十分量得られているかを確認した。もし得られていない場合は、PCR 条件検討を行い、intact で十分量の DNA 増幅が得られるまで繰り返した。

反応後の PCR 産物 2 μl、ExoSAP-IT 試薬 1 μl、DDW 4 μl を混合し計 7 μl とし、37°C 45 分間、80°C 15 分間に設定したサーマルサイクラーにかけるという手順で残存する dNTP およびプライマーを処理し、PCR 産物を精製した。その後シーケンス反応を行った。ExoSAP 処理後 PCR 産物 1 μl、Big Dye Terminator v.3.1 (Life Technologies) 0.25 μl、Big Dye Terminator v.3.1 5 × sequence Buffer (Life

Technologies) 1.9 μ l、Forward プライマーまたは Reverse プライマー (PCR 反応時と同じもの) 0.1 μ l、DDW 6.75 μ l を混合し計 10 μ l とする。サーマルサイクラーを 96°C10 秒間の後、96°C10 秒間、50°C5 秒間、60°C4 分間を 27 サイクル繰り返し、15°Cにて保存する設定とし、4 サンプル (前述のトリオ 3 人と対照の 1 人) それぞれを Forward と Reverse 両方向にシーケンス反応し、1 か所の SNV につき $\times 2 = 8$ サンプルをサンガーシーケンス法による塩基配列決定に用いた。

サンガーシーケンス法は理化学研究所和光キャンパス研究基盤センター生体物質分析ユニットに依頼し、ABI 3730xl DNA シーケンサー (Life Technologies) を用いて行った。得られた塩基配列データは Sequencher ver.4.8 (Hitachi Soft) 解析ソフトを使用し確認した。

3-8. パイロシーケンス法による体細胞変異の確認

パイロシーケンスは PSQ96MA リアルタイムシーケンサー (Biotage) を用いて行った。使用した DNA サンプルは、サンガーシーケンス法で体細胞変異が疑われた 2 つの遺伝子 (*GOLGA4* : 1 家系、*RNF135* : 1 家系) が見いだされた計 2 トリオ (計 6 人) と対照サンプル 1 人である。具体的実験手順は以下である。

まず、primer3 を使用し設計した配列にビオチンラベル処理をしたプライマーを使用し PCR 反応を行った。DNA 250ng (TE) + DDW を、Taq polymerase (TaKaRa, 5U/ μ l) 0.75 μ l、2 \times GC buffer 25 μ l、dNTP (10 μ M) 5 μ l、各遺伝子のプライマー (100 μ M) 0.25 μ l に混合し総量 50 μ l とした。PCR 条件は 96 $^{\circ}$ C 1 分間、98 $^{\circ}$ C 10 秒間、*GOLGA4* は 55 $^{\circ}$ C、*RNF135* は 57 $^{\circ}$ C 30 秒間、72 $^{\circ}$ C 3 分間を 32 サイクル繰り返した後、72 $^{\circ}$ C で 4 分間伸長し、4 $^{\circ}$ C にて保存した。

この PCR 産物 50 μ l に、streptavidin-sepharose beads (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 4 μ l と binding buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 0.1% Tween 20 at pH 7.6) 54 μ l を加え、シェイカー上で室温 10 分間シェイク (1400rpm) した。この混合溶液を MultiScreen-HV, Clear Plate (Millipore, Billerica, MA, USA) のウェルにのせ、バキュームスタンド上にて下方よりバキュームし、水分を吸引した。バキューム処理後、ビーズを変性溶液 (0.2 N NaOH) 50 μ l/well によって 1 分間処理し、洗浄バッファ (10 mM Tris-Acetate at pH 7.6) 150 μ l/well を加えてバキュームする操作を 2 回繰り返す、洗浄した。次に、アニーリングバッファ (20 mM Tris-Acetate, 2mM Mg-Acetate at pH 7.6) 50 μ l に 10 pmol シーケンス用プライマーを添加した溶液を各ウェルに加え、ビーズを懸濁した。この反応溶液を PSQ 96 Plate (Biotage) 上に移し、90 °C のヒートブロックで 2 分間加熱した後、室温で静置しアニーリングさせた。

シーケンス反応には PSQ 96 SNP Reagent Kit (Biotage)を用いた。PSQ 96 Reagent カートリッジの各ウェルに、PSQ 96 SNP Reagent Kit の Enzyme mixture (DNA polymerase, ATP-sulfurylase, luciferase, apyrase)、Substrate mixture (luciferin, adenosine 5' phosphosulfate) と dATP、dTTP、dGTP、dCTP を添加し、PSQ96MA リアルタイムシーケンサー (Biotage) にセットした。シーケンス反応を開始し、リアルタイムに DNA 変異率を観測した。

本実験で使用したプライマーは以下の通りである。

GOLGA4 (PCR 用プライマー) : 5'-TGAGAGGATTTTGTTTTGTTTTATAT-3'およ

び Bio-5'-TGACCGGCCATGTTCTTATT -3'、*GOLGA4* (シーケンス用プライマ

ー) : 5'-GTTCTCTTCTAGTTTGTGA-3'、*GOLGA4* (シーケンスした配列) :

G/CGGGCTTTTAATACTTCT

RNF135 (PCR 用プライマー) : 5'-AGTGATGGAGGAGTTTTGTTAGATA-3' お

よび Bio-5'-TGACCGGCCATGTTCTTATT-3'、 *RNF135* (シーケンス用プライマ

ー) : 5'-GTGAGACACACAGTCATGTAC-3'、 *RNF135* (シーケンスした配列) :

G/AGGAATCCTTGGACACC

3-9. アレイ CGH 法によるデノボ CNV の確認

使用した DNA サンプルはエクソームデータの解析により抽出されたデノボ

CNV 候補が見いだされた 1 家系 (3 人) の DNA サンプルと、コントロールとし

て使用するヒト DNA #26 GA15510AP5 (Coriell Institute) 計 4 サンプルである。

まず、サンプル DNA の精製を行った。1×1M SurePrint G3 Human CGH マイクロ

アレイキットを使用しスタートゲノム DNA 量は 1μg とした。

アレイ CGH 法は理化学研究所和光キャンパス研究基盤センター生体物質分析ユニットに依頼した。SureTag Complete DNA Labeling Kit を使用し、プロトコルに従った。具体的な実験手順は以下である。

制限酵素 Alu1、Rsa1 を含む混合液を氷上で調整し、DNA サンプルと混合、37℃にて 2 時間、65℃で 20 分間インキュベーションした後 4℃で保管した。(DNA は制限酵素により断片化され、200-500bp となっている。) 6000G にて 1 分間遠心後、random primer を加え、98℃にて 3 分間インキュベーションし 4℃にて保管した。6000G にて 1 分間遠心分離後、蛍光ラベル Cyanin3-dUTP 混合液をリファレンス DNA に、Cyanin5-dUTP 混合液をサンプル DNA に加え、遮光し 37℃にて 2 時間、65℃にて 10 分間インキュベートした後、4℃にて保管した。蛍光ラベルした DNA をカラムにて精製し、1×TE (pH8.0) を加えて総量を調整後、NanoDrop にて DNA 濃度を測定した。A550、A650 値から Cy3、Cy5 の濃度と取

り込み率を計算した。リファレンス DNA、サンプル DNA のラベル化溶液を混合し、Human Cot-1 を含む混合液を加え、遮光し 95°Cにて 3 分間、37°Cにて 30 分間インキュベーションした。すぐに、チャンバーベース上にセットしたガスケットスライド上に溶液をアプライし、マイクロアレイスライドを下向きに載せ、溶液を挟みこみチャンバーカバーを乗せ、クランプ機器にてしっかり締めた。その後 65°Cに設定したハイブリダイゼーションオープンにて 20rpm にて 40 時間ハイブリダイゼーションした。オープンより取り出したアレイスライドは、37°Cに保ったキット付属の洗浄バッファ 1 にて 5 分間、洗浄バッファ 2 にて 1 分間洗浄、引き上げそのままスライドホルダにセットし、DNA マイクロアレイスキャナ C バージョン (Agilent Technologies) にてスキャンした。スキャンされた画像は Feature Extraction ソフトを使用し数値化されたデータとして提供された。得られたアレイデータは Gene Spring GX 解析ソフトを用いて確認した。

3-10. EHD1 変異の機能解析実験

今回同定したデノボ変異のうち、我々は遺伝子変異による機能変化の影響が最も大きいものとして、変異したアミノ酸配列がストップコドンに変化する nonsense 変異に注目した。nonsense 変異となるデノボ変異は 6 つ同定され、それらが存在する遺伝子は *EHD1*、*GSTM3*、*UVRAG*、*KMT2C*、*XPO4*、*DDHD1* であった。このうち *EHD1* の変異は最終エクソンに存在し、nonsense mediated decay (ナンセンス変異をもつ遺伝子の mRNA が細胞内で選択的に分解されること) を逃れ、遺伝子が発現することによって機能的に変化を及ぼしうると考えた。よって、この変異を含む相補的 DNA (cDNA) を作製し機能解析を行った。

この工程は共同研究者である澤田知世氏と共同で行った。具体的実験手順は以下の通りである。

同定された変異は、*EHD1* (1414 del G) である。Wei ら⁴²によると *EHD1* は

シナプスタンパクであり、**snapin** との結合によりエキソサイトーシスを調節する (図 6A)。EHD1 はエンドサイトーシス、特にリサイクリングエンドソームから細胞表面へのタンパク質 (AMPARs, IGF1R, Glut4 などが知られている) の輸送を制御している⁵²。また、エキソサイトーシスによる神経伝達物質の放出を負に調節することも報告されている。

今回見つかった変異は、機能的に重要な EH domain (Ca²⁺結合ドメイン) にあり、変異体が **nonsense mediated decay** を逃れ発現していた場合、**dominant negative** (遺伝子の変異産物が正常産物に対してドミナント (優位) に働き、正常産物の作用を阻害する) として働く可能性が考えられた (図 6B)。1414delG 変異で欠失する EH domain に結合するタンパク質として **Snapin** (SNAP-associated protein) が同定されている³⁶。**Snapin** は **SNAP-25** に結合して、**SNAP-25** と **synaptotagmin-1** の結合を促進することで神経伝達物質の開口放出を正に制御す

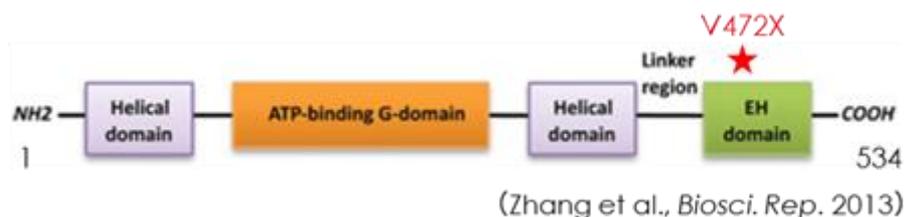
るが、Wei らの論文では、EHD1 が Snapin と SNAP-25 の結合を阻害することにより開口放出を抑制することを示唆している。我々は、1414 del G mutant を作製し、その発現パターンと Snapin との結合能を調べた。

図 6 EHD1 遺伝子、EHD1 タンパクの模式図

A)

WT	<u>GCC</u> <u>AAG</u> <u>AAG</u> <u>GAG</u> <u>ATG</u> <u>GTG</u> <u>AAG</u> <u>TCC</u> <u>AAG</u> <u>CTC</u> <u>CCC</u>
	A K K E M V K S K L P
	422
c.1414delG→p.V427X	<u>GCC</u> <u>AAG</u> <u>AAG</u> <u>GAG</u> <u>ATG</u> ... <u>TG</u> <u>AAG</u> TCC AAG CTC CCC
	A K K E M X
	422

B)



<cDNA の調製>

エクソーム解析の結果同定された 1414 delG 変異をヒト EHD1 cDNA に導入するため、PCR によるミュータジェネシスを行った。1414 番目の G を欠失させる

ためのプライマーを設計し、野生型ヒト EHD1 cDNA（かずさ DNA 研究所）を含むプラスミド DNA を鋳型として PCR を行った。PCR に用いた酵素は、Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase（Agilent Technologies）であり、プライマー配列は以下の通りである。

Forward Primer: 5'-TGAAGTCCAAGCTCCCCAAC-3'

Reverse Primer: 5'-ATCTCCTTCTTGGCGTTGG-3'

PCR 条件は、95°C 2 分間の後、95°C20 秒間、65°C20 秒間、72°C2 分 30 秒間を 30 サイクル繰り返し、72°C5 分間の後 15°Cで保存した。PCR 産物を DpnI（TaKaRa）にて制限酵素処理し、鋳型のプラスミド DNA を切断した。1%アガロースゲル電気泳動を行い、目的サイズ（約 5kb）のバンドを切り出した後、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system（Promega）を用いて精製した DNA と、DNA Ligation Kit <Mighty Mix>（TaKaRa）および T4 PNK（TaKaRa）を混合し、

16°Cにて2時間以上反応させ、PCR産物の5'末端リン酸化およびライゲーションを同時に行い環状DNAを作製した。

作製した環状DNAをコンピテントセル (pF1KOF株) に形質転換した後、100µ/mL アンピシリンを含むLB寒天培地上で37°Cにて一晩培養してから、コロニーをピックアップしてさらに100µ/mL アンピシリンを含むLB液体培地中で37°Cにて一晩培養した。Mini prepキット (Roche) にてプラスミドDNAを精製し、サンガー法でシーケンスを確認した。野生型EHD1および1414delG変異型cDNAは、EcoRI認識配列を付加したForwardプライマー5'-TTTT-GAATTC-ATGTTTCAGCTGGGTCAGC-3' とXhoI認識配列を付加したReverseプライマー5'-TTTT-CTCGAG-TCACTCATGTCTGCGCTTG-3'を用いたPCRで増幅した。これらをEcoRI/XhoI制限酵素で切断し、同様の制限酵素に

よって切断した pcDNA3.1(+)にライゲーションすることで N 末 Myc タグつきの
コンストラクトを作製した。細胞への遺伝子導入には Midi prep で精製したプラ
スミド DNA を使用した。また、Snapin はかずさ DNA 研究所より購入した Halo
タグつきのコンストラクトを Midi prep で精製して使用した。

<細胞培養と遺伝子導入>

HEK293T 細胞 (RIKEN Cell bank) は DMEM (Wako) +10% FBS (GIBCO)
培地を用いて、37°C、5% CO₂ 下で培養した。遺伝子導入は、Lipofectamine 2000
(Invitrogen) を用い、製品添付のプロトコルに従って 6-well plate スケールにて
実施した。遺伝子導入から 28 時間後に、1xPBS で洗浄後、ピペッティングによ
り細胞を回収した。4°Cにて 1000×g で 3 分間遠心分離後、上清を除去し、
300μL/well の 1% Triton X-100 -based lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 120

mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100 and protease inhibitor [Roche]) を加え、氷上にて 30 分間インキュベートした。4°Cにて 20,000×g で 30 分間遠心分離した後、上清をセルライセートとして回収した。Micro BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を使用してライセートのタンパク質濃度を測定し、lysis buffer を用いて各サンプルの濃度を揃えた後、1μg/サンプルの anti-Myc 抗体 (Millipore) および 50μL/サンプルの Dynabeads (Dyna/Invitrogen)を用い、Dynabeads のプロトコルに従って免疫沈降実験を行った。SDS-PAGE には 10-20% グラジエントゲル (Wako) を使用した。ウエスタンブロット (WB) に使用した一次抗体および二次抗体は、以下の通りである。anti-Myc (4A6, Millipore), anti-EHD1 (ab75886 および ab109747, Abcam), anti-Snapin (Protein Technologies, Abcam)、anti-Halo-tag (Promega)、anti-β-actin (AC-15, Sigma), goat anti-Mouse IgG-HRP および goat anti-Rabbit IgG-HRP (SantaCruz Biotechnology)。シグナル

の検出には、Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) および ImageQuant LAS500 (GE Healthcare) を使用した。

3-11. 統計解析

統計解析は SPSS Statistics ソフトウェア ver.20 (SPSS Japan) を用いて行った。

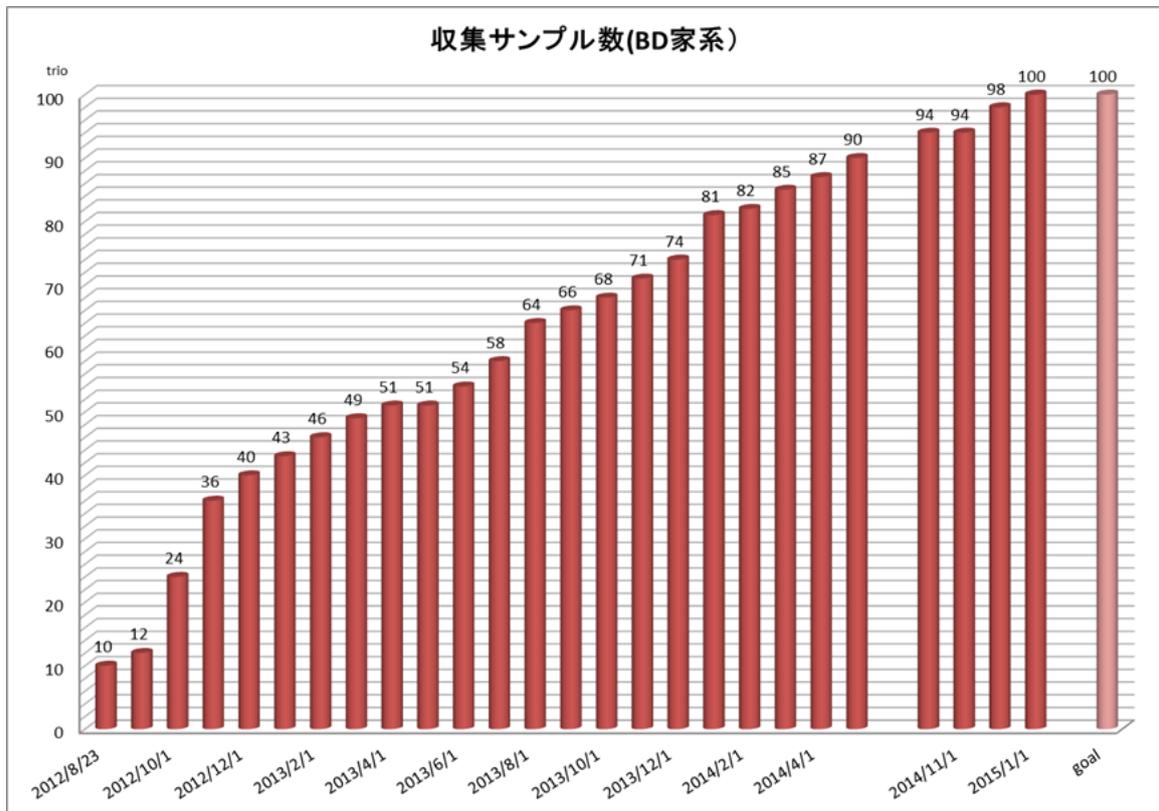
相関は、Spearman の相関係数を用いて調べた。P<0.05 を有意とした。

4. 結果

4-1. 被験者の特徴と収集された唾液サンプルの状態

図7は2012年8月より2015年1月までのサンプル収集の進捗状況をグラフにしたものである。縦軸は家系（トリオ数）である。最初の10家系は既に収集されていた血液サンプルである。

図7 サンプル収集の進捗状況



本研究にあたって収集したトリオサンプルは 118 家系（計 400 サンプル弱：
理化学研究所精神疾患動態チーム（以下、当研究室）血液 10 家系、当研究室唾
液 104 家系、山口大学唾液 4 家系）である。双極性障害と診断されなかったも
のを除くと、双極性障害家系 100 家系（トリオ）（約 300 サンプル+同胞）（血
液 10 家系、当研究室唾液 86 家系、山口大学唾液 4 家系）を収集した。筆者は、
2012 年 10 月よりサンプル収集関連業務を統括した。全応募者とメール（一部電
話、対面）による連絡をとり、応募者の中から候補者の選定を行った。面接、
診断は計約 50 トリオ（約 160 名）担当した。また、約 300 サンプルの匿名化を
し、全データおよび検体の管理を行った。

当研究室で収集した唾液、計 104 家系に関するサマリは以下である。

7 家系は唾液未返信、面接後辞退、面接不可等でトリオサンプルが揃わず使用不

可であった。104-7=97 家系はトリオサンプルが収集済みだが、うち 11 家系は面接にて双極性障害ではなく他疾患と診断されたため使用しなかった。97-11=86 家系が双極性障害家系（統合失調感情障害 Schizoaffective Disorder 双生児家系 1 家系）であったが、1 家系はトリオの 1 人が爪のサンプルであったため除外した。2 家系は DNA 量が不足しており、追加サンプルの取得もできなかったため除外した。

唾液 86 家系および血液 10 家系の計 96 家系に関して Hiseq による塩基配列決定が行われたが、1 家系は親子関係不明で解析に使用できず、使用できるデータは計 95 家系となった。そのうちその後のインフォマティクス解析が完了したものが 84 家系、うち 5 家系は双極性障害の家族歴を持つため、デノボ変異に注目した今回の研究からは除外し、79 家系として後の解析に進んだ（図 8-1、図 8-

2)。なお、双極性障害家族歴を持つ 5 家系の発端者にはデノボ変異は発見されなかった。

図 8-1 被験者の病型、性別

Type	BD I	BD II
	56	23
Sex	Male	Female
	32	47
Total	79	

内訳は I 型の男性 25 人、女性 31 人 II 型の男性 7 人、女性 16 人であった。

図 8-2 被験者群のキャラクター

Average age of...	
Patients (N=79)	36.9±9.2(16-56)
Onset	23.7±7.8(12-45)
Paternal age at proband's birth	31.1±3.8(24.3-42)
Maternal age at proband's birth	28.2±3.2(22.5-36.6)

§ average ± standard deviation (MIN-MAX)

4-2. 唾液採取時間による DNA 収集量の確認実験

In house コントロールサンプル（女性）を用いて、唾液①（食前、空腹時）唾液②（食後 1 時間）の同日 2 種類の条件にて唾液を採取し、それぞれの DNA 収

集量に差があるかどうか検討した。

それぞれ 2 回ずつ抽出し、50 μ l TE に溶解したものを NanoDrop にて濃度測定を行った。

結果は以下となった。

図 9-1 NanoDrop の結果

Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
①-1	132.14	1.68	0.62
①-2	132.85	1.68	0.61
②-1	159.02	1.74	0.96
②-2	172.55	1.74	0.93

右 ; 図 9-2a,b

A260 DNA 濃度測定

A230 有機化合物 (フェノール、アルコール等) 炭水化物 (糖質) 等の混入物

A280 蛋白質

図 9-2 NanoDrop の結果のプロット

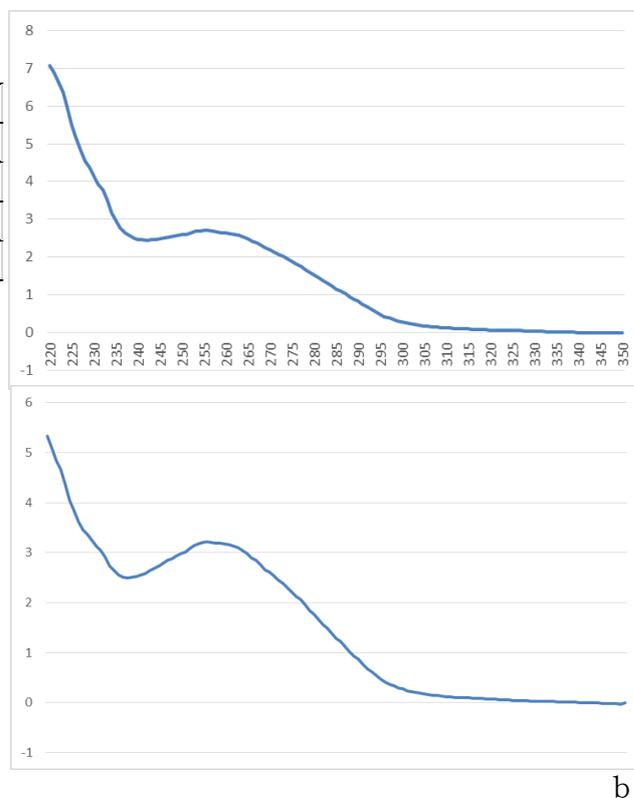


図 9-2a は唾液①、b は唾液②より抽出した DNA 溶液の吸光度の分布を示す。

A230、A280 の値は①、②と大きな差はないが、DNA の収量 (A260) は唾液②の方が高かった。採取方法を変えなければ、食後の方が DNA の質としては高くなる可能性がある。

4-3. 被験者 DNA 収量と質の検討

被験者から返送された Oragene・DNA/唾液混合液の状態は、容量は 1ml-5ml とかなりのばらつきを認め、色調は透明、白濁、黄褐色、褐色、または個体片の混合、粘性の増加等様々な様相を呈した。SureSelect によるエクソームキャプチャに必要な DNA 収量が最低 $3\mu\text{g}$ であったため、1 回の抽出で必要量に満たなかったサンプルに関しては複数回 (2 - 7 回) の抽出を必要とした。内容液が 0.5ml 未満のもの、空のもの、抽出の結果で総収量が $3\mu\text{g}$ に満たなかったものは被験

者に唾液の再採取と返送を依頼した。再採取の協力が得られたサンプルに関しても、最高2本までの唾液チューブ回収によって必要量のDNA収量を確保できた。DNAの収量は1回(Oragene・DNA/唾液混合液 500 μ l)につき、0.1から151.0 μ g とばらつきがあった。

DNAの質に関しては、エクソームキャプチャの推奨 A260/A280 は 1.8-2.0 であったが、NanoDrop で測定した初期の90サンプルの平均は 1.86(1.14-2.85)であり、25サンプルが推奨値を外れていた。2つのサンプルを除いては推奨値より ± 0.15 以上外れることはなく、これらは全て問題なく Hiseq によるシーケンスが完了した。A260/A280 が 1.14 であったサンプルは、キャプチャ後の収量も低く配列決定ができなかったため、再採取した別サンプルにて再解析を行ったが、後の工程では 2.85 であったサンプルは、特に問題がなかった。

一方で、CGH アレイに用いるゲノム DNA の推奨値は A260/A280 1.8-2.0、
A260/A230>1.0 であり、CGH アレイ実験ではコントロール DNA とのクオリティ
の差が結果に大きく影響する。初期の DNA 抽出では、トリオサンプルの
A260/A280 1.54/1.49/1.77、A260/A230 1.03/0.79/1.21 とクオリティが悪かった
にもかかわらず、次世代シーケンスは問題なく行われていた。DNA の調整を行
うにあたって一般的に、260/280 が低い場合は除蛋白を目的としフェノール・ク
ロロホルム (CIA) 抽出後、必ずエタノール沈澱を行う。260/230 が低い場合は
230 は蛋白ではなくその他の夾雑物が混入しているため、エタノール沈澱のみを
行う。今回は、上記操作では DNA 精度の上昇を認めなかったが、唾液からの再
抽出を行ったところ推奨範囲内のクオリティが得られたため、このサンプルを
使用し CGH アレイを行い、良好な解析結果が得られた。

4-4. エクソームデータのインフォマティクス解析により見出されたデノボ SNV 候補のリスト

個人単位では平均して 92.5%のエクソーム領域が 20 リード以上配列決定できていた。トリオ全員が 20 リード以上配列決定できている領域は平均 88.9%であった。エクソームデータのインフォマティクス解析により見出されたデノボ SNV 候補のリストを図 10 に示す。

図 10 エクソームデータの解析により抽出されたデノボ SNV の候補

ID#	Chr	Func.ensGene	ExonicFunc.ensGene	Gene.refGene
103	17	exonic	nonsynonymous SNV	PLCD3
105	4	exonic	synonymous SNV	MSANTD1
106	2	exonic	nonsynonymous SNV	PROC
107	1	exonic	nonsynonymous SNV	VAMP4
107 X		exonic	nonsynonymous SNV	SMS
110	1	exonic	frameshift insertion	MACF1
111	11	exonic	nonsynonymous SNV	DCHS1
115	3	exonic	nonsynonymous SNV	FYTTD1
116	11	exonic	synonymous SNV	PYGM
116	11	exonic	stopgain	EHD1
116	16	exonic	nonsynonymous SNV	SMG1
116	18	exonic	nonsynonymous SNV	DSEL
116	19	exonic	synonymous SNV	GPI
117	12	exonic	nonsynonymous SNV	CSAD
118	9	exonic	synonymous SNV	GRIN3A
118	14	exonic	nonsynonymous SNV	MYH6
119	11	exonic	nonsynonymous SNV	HEPACAM
120	11	exonic	nonframeshift insertion	PKP3
120	12	exonic	synonymous SNV	LGR5
120 X		exonic	nonsynonymous SNV	RLIM
121	10	exonic	nonsynonymous SNV	MASTL
122	6	exonic	synonymous SNV	VARS
122	18	exonic	nonsynonymous SNV	MC4R
123	8	exonic	nonsynonymous SNV	FAM135B
123	9	splicing		UNC13B
123	11	exonic	nonsynonymous SNV	CCKBR
123	22	exonic	nonsynonymous SNV	CCDC116
123	22	exonic	nonsynonymous SNV	BMS1P20,ZNF280B
127	4	exonic	nonsynonymous SNV	KLKB1
130	15	exonic	nonsynonymous SNV	DMXL2
204	11	exonic	frameshift deletion	OR5M8
204	11	exonic	frameshift insertion	OR5M8
205	1	exonic	stopgain	GSTM3
205	7	exonic	nonsynonymous SNV	GLI3
132	1	exonic	synonymous SNV	ATG4C
301	5	exonic	nonsynonymous SNV	MYO10
134	2	exonic	synonymous SNV	PGAP1
134	16	exonic	nonsynonymous SNV	CHTF18

135	4	exonic	nonsynonymous SNV	TMPRSS11D
135	12	exonic	nonsynonymous SNV	CAMKK2
209	2	exonic	nonsynonymous SNV	DOCK10
209	2	exonic	nonsynonymous SNV	DOCK10
212	14	exonic	nonsynonymous SNV	C14orf80
213	6	exonic	synonymous SNV	RREB1
213	11	exonic	stopgain	UVRAG
303	9	exonic	nonsynonymous SNV	XPA
214	17	exonic	nonframeshift insertion	BZRAP1
215	2	exonic	nonsynonymous SNV	CCDC88A
215	7	exonic	stopgain	KMT2C
215	10	exonic	nonsynonymous SNV	CDH23
215	14	exonic	nonsynonymous SNV	LIN52
217	13	exonic	stopgain	XPO4
219	1	exonic	nonsynonymous SNV	AZIN2
219	9	exonic	frameshift deletion	KLF4
220	2	exonic	nonsynonymous SNV	MOGAT1
221	17	exonic	nonsynonymous SNV	DDX42
223	7	exonic	synonymous SNV	CHPF2
311	1	exonic	nonsynonymous SNV	CLCN6
311	11	exonic	synonymous SNV	MYBPC3
311	11	exonic	nonsynonymous SNV	OR1S2
311	22	exonic	nonsynonymous SNV	LZTR1
312	6	exonic	nonsynonymous SNV	HIVEP2
312	19	exonic	synonymous SNV	LENG8
313	2	exonic	nonsynonymous SNV	ASXL2
314	6	exonic	nonsynonymous SNV	MDN1
316	15	exonic	synonymous SNV	HYPK
316	17	exonic	nonsynonymous SNV	DNAH9
317	4	exonic	nonsynonymous SNV	EXOC1
317	10	exonic	synonymous SNV	ANKRD16
319	15	exonic	synonymous SNV	AAGAB
319	22	exonic	nonsynonymous SNV	PDGFB
321	1	exonic	synonymous SNV	LMX1A
321	1	exonic	nonsynonymous SNV	LAMB3
321	6	exonic	synonymous SNV	AKAP12
321	19	exonic	nonsynonymous SNV	C19orf44
324	6	exonic	nonsynonymous SNV	PHF3
325	14	exonic	stopgain	DDHD1
325	20	exonic	nonsynonymous SNV	PLCG1

4-5. デノボ SNV の実験的確認と確認されたデノボ SNV のリスト

図 11 サンガー法により確認されたデノボ SNV のリスト

ID#	Gene Symbol	Type of BD	Chromosome	Mutation Type	Amino Acid Change
103	PLCD3	I	17	missense	p.A515V
105	MSANTD1	I	4	synonymous	p.G19G
106	PROC	I	2	missense	p.S9R
107	VAMP4	I	1	missense	p.R140H
	SMS	I	X	missense	p.K151R
110	MACF1	I	1	frameshift insertion	p.V266fs
111	DCHS1	I	11	missense	p.D990N
115	FYTTD1	I	3	missense	p.S161N
116	EHD1	I	11	frameshift deletionb	p.V472X
	SMG1	I	16	missense	p.Y3640C
	DSEL	I	18	missense	p.G761D
117	CSAD	I	12	missense	p.R194H
118	GRIN3A	I	9	synonymous	p.L969L
	MYH6	I	14	missense	p.D955V
119	HEPACAM	I	11	missense	p.D183G
120	PKP3	I	11	inframe insertion	p.S305delinsSH
	LGR5	I	12	synonymous	p.Y839Y
	RLIM	I	X	missense	p.S455F
121	MASTL	I	10	missense	p.S597F
122	FAM135B	I	8	missense	p.D800V
	UNC13B	I	9	splice site	-
	CCKBR	I	11	missense	p.D256G
	CCDC116	I	22	missense	p.G385A
123	MC4R	II	18	missense	p.V52A
127	KLKB1	II	4	missense	p.T512I
130	DMXL2	I	15	missense	p.L606S
132	ATG4C	I	1	synonymous	p.S207S
134	PGAP1	I	2	synonymous	p.T869T
	CHTF18	I	16	missense	p.P1101L
135	TMPRSS11D	I	4	missense	p.R378Q
	CAMKK2	I	12	missense	p.R311C
205	GSTM3	I	1	nonsense	p.R100X
	GLI3	I	7	missense	p.V577I
209	DOCK10	II	2	missense	p.S1531P
	DOCK10	II	2	missense	p.N1529S
212	C14orf80	II	14	missense	p.V21M
213	RREB1	II	6	synonymous	p.P43P
	UVRAG	II	11	nonsense	p.W131X
214	BZRAP1	I	17	inframe insertion	p.E1272delinsEE
215	CCDC88A	I	2	missense	p.R1146Q
	KMT2C	I	7	nonsense	p.K3601X
	CDH23	I	10	missense	p.P1401R
	LIN52	I	14	missense	p.E82Q

217	XPO4		13	nonsense	p.Y100X
219	AZIN2		1	missense	p.A185V
	KLF4		9	frameshift deletion	p.S327fs
220	MOGAT1		2	missense	p.T18K
221	DDX42		17	missense	p.N524Y
223	CHPF2		7	synonymous	p.V621V
301	MYO10		5	missense	p.A756V
303	XPA		9	missense	p.F255C
311	CLCN6		1	missense	p.H630Y
	MYBPC3		11	synonymous	p.T1114T
	OR1S2		11	missense	p.Q245P
	LZTR1		22	missense	p.S22P
312	HIVEP2		6	missense	p.A1835T
	LENG8		19	synonymous	p.G328G
314	MDN1		6	missense	p.K2825R
316	HYPK		15	synonymous	p.S103S
	DNAH9		17	missense	p.M3124V
317	EXOC1		4	missense	p.D62H
	ANKRD16		10	synonymous	p.Y280Y
319	AAGAB		15	synonymous	p.Y83Y
	PDGFB		22	missense	p.R108W
321	LMX1A		1	synonymous	p.S23S
	LAMB3		1	missense	p.G612E
	AKAP12		6	synonymous	p.H132H
	C19orf44		19	missense	p.L598V
324	PHF3		6	missense	p.K776T
325	DDHD1		14	frameshift deletionb	p.L881X
	PLCG1		20	missense	p.P619S

図 12 確認されたデノボ SNV のキャラクター

Splicing	1
Exonic	Silent
	14
	Nonsense
	4
	Frameshift Indel
	4
	Nonframeshift Indel
2	
Missense	
	46

図 13-1 確認された SNV と確認されなかった SNV、バリデーション率

ExonicFunction	GeneName	
nonsynonymous SNV	PLCD3	
nonsynonymous SNV	PROC	
nonsynonymous SNV	VAMP4	
nonsynonymous SNV	SMS	
nonsynonymous SNV	DCHS1	
nonsynonymous SNV	FYTTD1	
nonsynonymous SNV	SMG1	
nonsynonymous SNV	DSEL	
nonsynonymous SNV	CSAD	
nonsynonymous SNV	MYH6	
nonsynonymous SNV	HEPACAM	
nonsynonymous SNV	RLIM	
nonsynonymous SNV	MASTL	
nonsynonymous SNV	MC4R	
nonsynonymous SNV	FAM135B	
nonsynonymous SNV	CCKBR	
nonsynonymous SNV	CCDC116	
nonsynonymous SNV	BMS1P20	
nonsynonymous SNV	KLKB1	
nonsynonymous SNV	DMXL2	
nonsynonymous SNV	GLI3	
nonsynonymous SNV	MYO10	
nonsynonymous SNV	CHTF18	
nonsynonymous SNV	TMPRSS11D	
nonsynonymous SNV	CAMKK2	
nonsynonymous SNV	DOCK10	
nonsynonymous SNV	DOCK10	
nonsynonymous SNV	C14orf80	
nonsynonymous SNV	XPA	
nonsynonymous SNV	CCDC88A	
nonsynonymous SNV	CDH23	
nonsynonymous SNV	LIN52	
nonsynonymous SNV	AZIN2	
nonsynonymous SNV	MOGAT1	
nonsynonymous SNV	DDX42	
nonsynonymous SNV	CLCN6	
nonsynonymous SNV	OR1S2	
nonsynonymous SNV	LZTR1	
nonsynonymous SNV	HIVEP2	
nonsynonymous SNV	ASXL2	
nonsynonymous SNV	MDN1	
nonsynonymous SNV	DNAH9	
nonsynonymous SNV	EXOC1	
nonsynonymous SNV	PDGFB	
nonsynonymous SNV	LAMB3	
nonsynonymous SNV	C19orf44	validation rate
nonsynonymous SNV	PHF3	0.93
nonsynonymous SNV	PLCG1	45/48

synonymous SNV	MSANTD1	
synonymous SNV	PYGM	
synonymous SNV	GPI	
synonymous SNV	GRIN3A	
synonymous SNV	LGR5	
synonymous SNV	VAR5	
synonymous SNV	ATG4C	
synonymous SNV	PGAP1	
synonymous SNV	RREB1	
synonymous SNV	CHPF2	
synonymous SNV	MYBPC3	
synonymous SNV	LENG8	
synonymous SNV	HYPK	
synonymous SNV	ANKRD16	
synonymous SNV	AAGAB	validation rate
synonymous SNV	LMX1A	0.82
synonymous SNV	AKAP12	14/17
stopgain	EHD1	
stopgain	GSTM3	
stopgain	UVRAG	
stopgain	KMT2C	validation rate
stopgain	XPO4	1
stopgain	DDHD1	5/5
splicing	UNC13B	1/1
frameshift deletion	OR5M8	
frameshift deletion	KLF4	
frameshift insertion	MACF1	
frameshift insertion	OR5M8	validation rate
nonframeshift insertion	PKP3	0.66
nonframeshift insertion	BZRAP1	4/6

筆者は図 10 のデノボ変異の候補が実際に存在するかどうか、1 箇所ずつ全てをサンガー法により実験的に確認 (validate) し、計 71 箇所のデノボ変異が確認された。実験的にデノボ変異が確認された遺伝子のリストを図 11 に示す。また、確認されたデノボ変異の種類の内訳は図 12 のようになった。スプライシング部

位に 1 箇所、サイレント変異 (synonymous) が 14 箇所、ナンセンス変異が箇所、フレームシフトを伴う挿入または欠失 (indel) が 4 箇所、フレームシフトを伴わない挿入または欠失が 2 箇所、ミスセンス変異が 46 箇所同定された (図 12)。

トータル validation 率は 91% (71/78)であり、平均より確認率が低かったものは Synonymous 82%、Indel 66%である (図 13-1)。インフォマティクス解析におけるデノボ変異の抽出の際に、特異度を高めることを優先して厳格な基準を採用したため、今回の解析では見逃してしまったデノボ変異 (false negative) が多く存在した。

1 人あたりで見つかったデノボ SNV の個数は 1 人あたり 0-4 個にわたった。変異の内訳は図 12 の通りである。本研究において認められた SNV は計 71 箇所 (同一人が持つ同一遺伝子の隣接する 2 つの変異を含む) (42 家系) となり、これは 1 家系当たり平均 0.89 個である。

ASD や統合失調症に関する既報の WES 研究では、デノボ LOF (Loss Of Function : nonsense, splice site および frameshift 変異 : タンパク質の配列を大幅に破壊する変異)やデノボ protein-altering 変異 (LOF、missense 及びフレームシフトを伴わない indel 変異 : アミノ酸置換を伴う全ての変異) が患者群で多いことが報告されている^{20-22, 24, 25, 27, 28}。我々は、それらの変異が双極性障害においても有意に多いかどうか検討した。方法として、われわれが調査した群と、既報のコントロール群 (1,911 トリオ : Iossifov らによる ASD 研究における非罹患同胞のデータ) との間で、LOF または protein-altering デノボ変異と、synonymous デノボ変異 (タンパク質配列レベルで影響を及ぼさないため、多くは Benign と考えられる) の個数を比較した。双極性障害では、デノボ LOF と protein-altering 変異の頻度がコントロール群よりやや高かった (LOF 変異の OR= 1.48、protein-altering 変異の OR= 1.30)。しかし、コントロール群との間に統計的に有

意な差は認めなかった (LOF 変異にて $p = 0.244$ 、protein-altering 変異にて $p = 0.233$ 、片側 Fisher の正確確率検定)。

また、missense 変異に関して Polyphen2 を用いて¹⁷そのタンパク質機能変化の予測を行ったものを図 13-2 に示す。

図 13-2 Polyphen2 を用いたアミノ酸変化の影響の予測

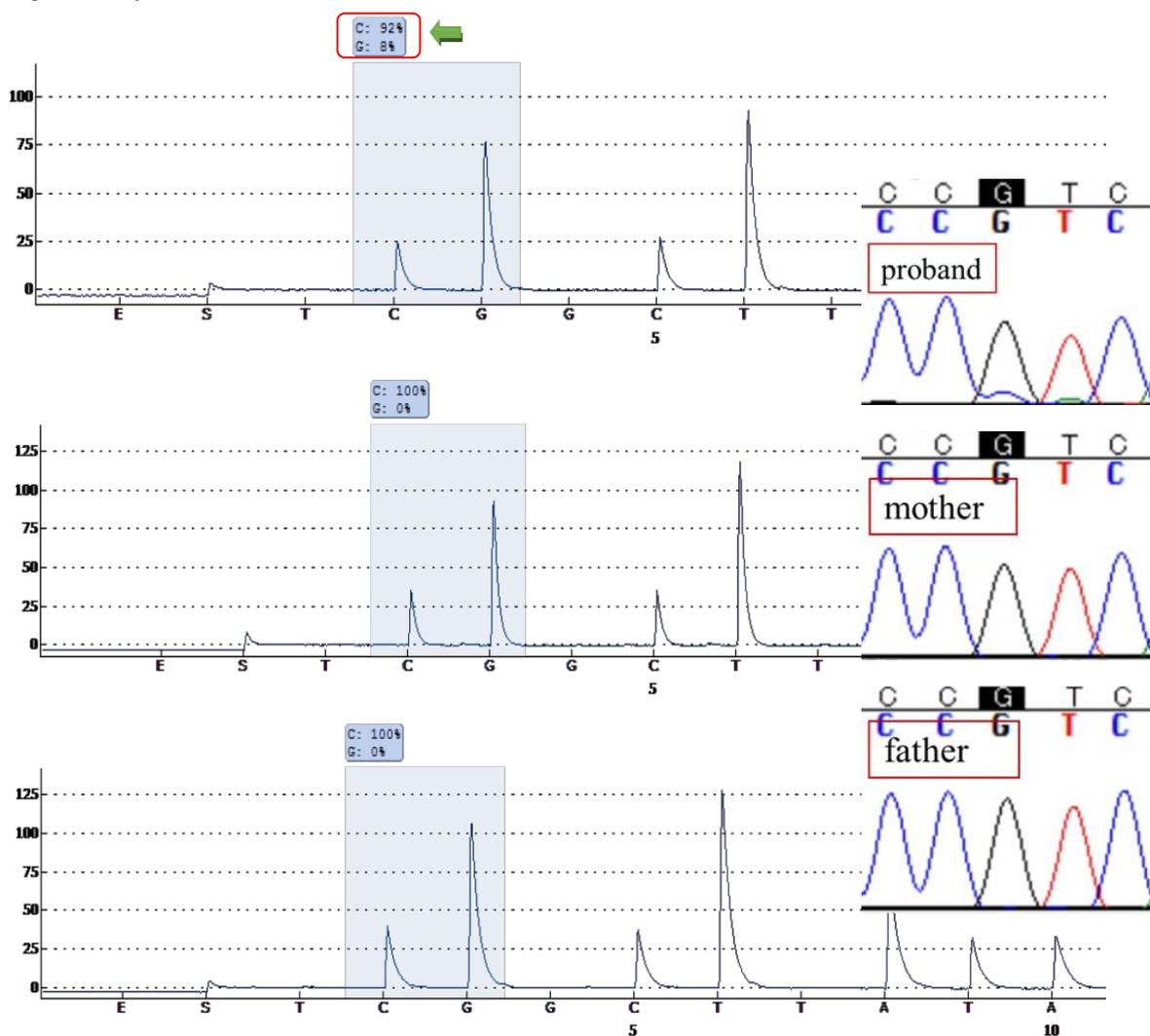
Gene Symbol	Amino Acid Change	Polyphen2 HumDiv	
		Prediction	Score
PLCD3	Ala515Val	Benign	0
MSANTD1			
PROC	Ser9Arg	Benign	0
VAMP4	Arg140His	Benign	0
SMS	Lys151Arg	probably damaging	0.989
MACF1			
DCHS1	Asp990Asn	probably damaging	0.997
FYTTD1	Ser161Asn	Benign	0
EHD1	Val472Stop		
SMG1	Tyr3639Cys	possibly damaging	0.938
DSEL	Gly761Asp	probably damaging	0.999
CSAD	Arg167His	Benign	0.002
GRIN3A			
MYH6	Asp955Val	probably damaging	1
HEPACAM	Asp183Gly	Benign	0.001
PKP3			
RLIM	Ser455Phe	possibly damaging	0.531
MASTL	Ser597Phe	Benign	0.003
FAM135B	Asp800Val	Benign	0
UNC13B			
CCKBR	Asp256Gly	Benign	0.124
CCDC116	Gly385Ala	probably damaging	0.974
MC4R	Val52Ala	possibly damaging	0.552
KLKB1	Thr512Ile	Benign	0.126
DMXL2	Leu606Ser	Benign	0.062
GSTM3	Arg10Stop		
GLI3	Val577Ile	probably damaging	0.975
ATG4C			
PGAP1			
CHTF18	Pro892Leu	Benign	0.002
TMPRSS11D	Arg378Gln	probably damaging	1
CAMKK2	Arg311Cys	probably damaging	1
PSMB11	Arg113Gln	probably damaging	0.965
DOCK10	Ser1531Pro	probably damaging	1
DOCK10	Asn1529Ser	Benign	0.217
C14orf80	Val60Met	probably damaging	0.962
RREB1			
UVRAG	Trp30Stop		
BZRAP1			
CCDC88A	Arg1146Gln	Benign	0.013
KMT2C	Lys3601Stop		
CDH23	Pro1394Arg	Benign	0.234
LIN52	Glu82Gln	probably damaging	0.979
XPO4	Tyr100Stop		
AZIN2	Ala185Val	Benign	0.217
KLF4			
MOGAT1	Thr18Lys	probably damaging	0.991
DDX42	Asn524Tyr	possibly damaging	0.589
CHPF2			
MYO10	Ala102Val	probably damaging	0.999
XPA	Phe255Cys		
CLCN6	His608Tyr	Benign	0.011
MYBPC3			
OR1S2	Gln245Pro	possibly damaging	0.642
LZTR1	Ser22Pro	Benign	0
HIVEP2	Ala1835Thr	probably damaging	0.999
LENG8			
MDN1	Lys2825Arg	Benign	0.002
HYPK			
DNAH9	Met3124Val	Benign	0
EXOC1	Asp62His	probably damaging	0.999
ANKRD16			
AAGAB			
PDGFB	Arg108Trp	probably damaging	1
LMX1A			
LAMB3	Gly612Glu	possibly damaging	0.518
AKAP12			
C19orf44	Leu566Val	probably damaging	1
PHF3	Lys590Thr	probably damaging	0.999
DDHD1	Leu853Stop		
PLCG1	Pro619Ser	Benign	0.168

4-6. 体細胞変異の変異率の測定

図 14 パイロシーケンス法により確認された 2 箇所の変異

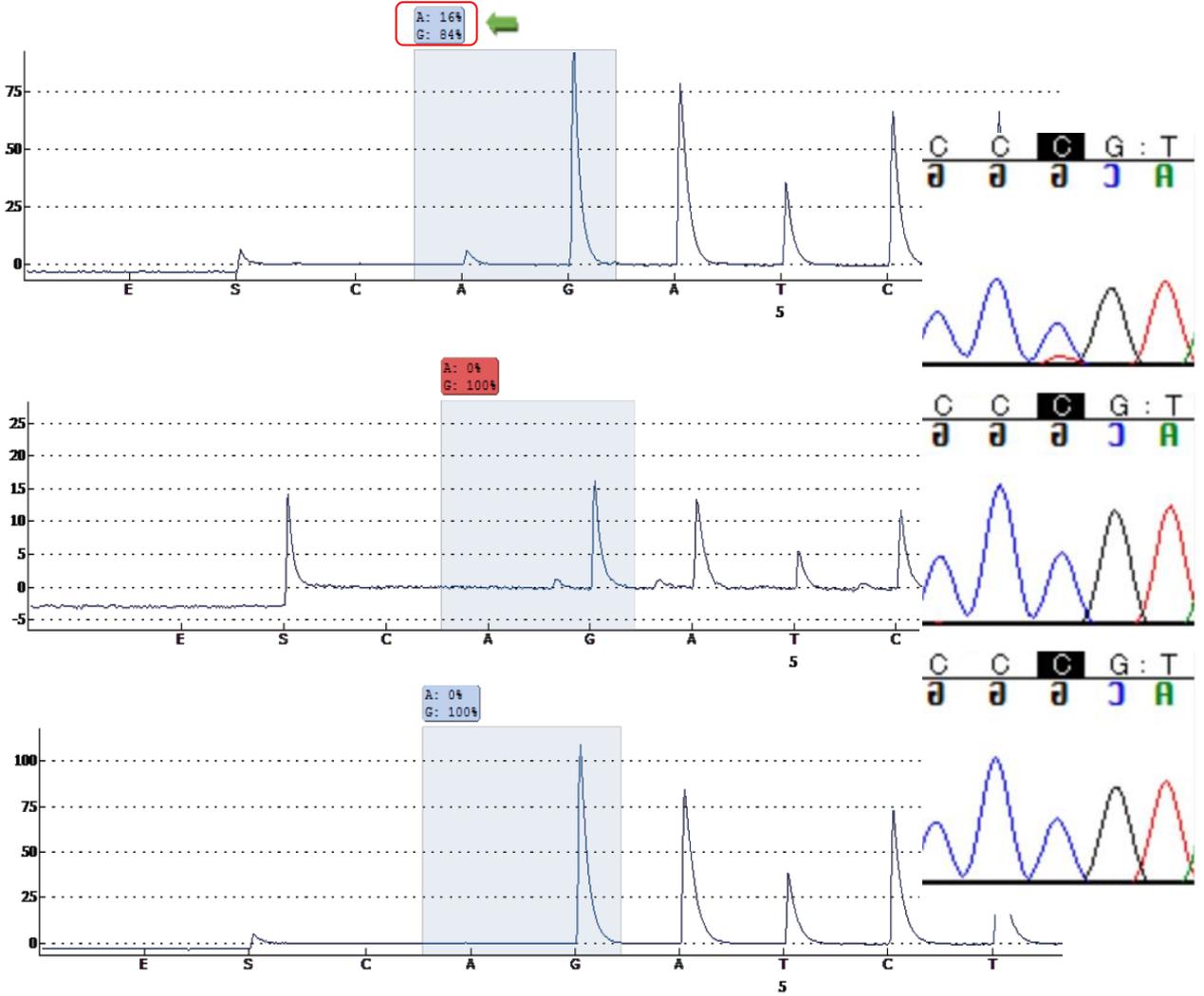
GOLGA4

Sequence to analyze: G/CGGGCTTTTAATACTTCT



RNF135

Sequence to analyze: G/AGGAATCCTTGGACACC



初期段階の予備的実験において、エクソームデータより抽出された *GOLGA4* 及び *RNF135* の 2 種類の遺伝子にあるデノボ SNV 候補をサンガー法にて塩基配列決定したところ、図 14 のような低いわずかなシグナルが観察された。これがアーチファクトなのか、モザイク（体細胞変異）が存在するのか確認するため、パイロシーケンサによるリアルタイムシーケンスを行った。結果、図 14 左のように、*GOLGA4* では 8% (C→G)（緑矢印）、*RNF135* では 16% (G→A)（緑矢印）の体細胞変異を認めた。これらの 2 種類の体細胞変異は一人の発端者より発見され、サンプルはともに唾液である。

4-7. EHD1 の機能解析-EHD1 と snapin の結合能の検討

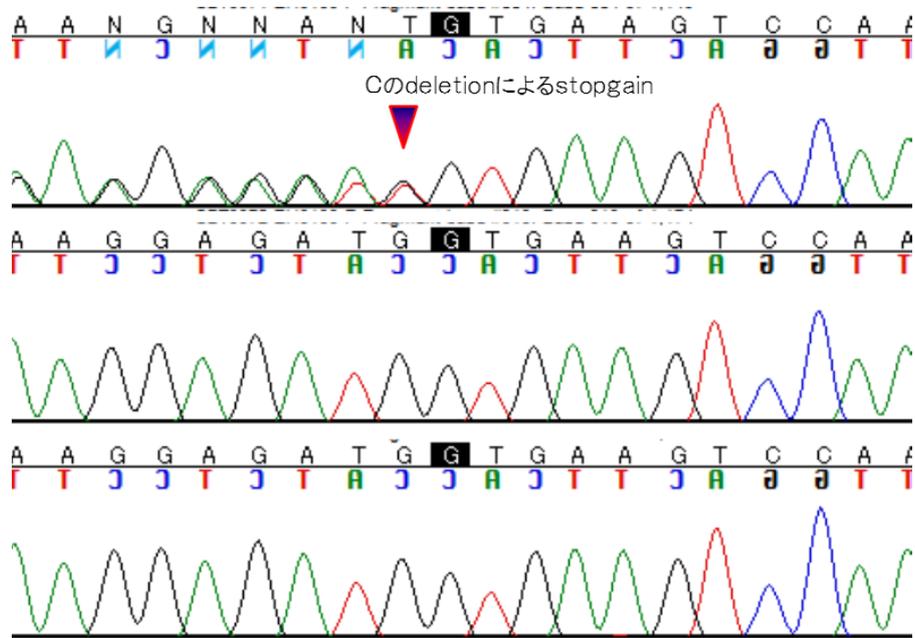


図 15 サンガー法により確認された EHD1 のデノゴ変異

EHD1 のシーケンス波形を上を示す。(図 15 上段：発端者、中段：母親、下段：

父親)

矢印の部分の C の欠損により、発端者のみ、それ以降のシーケンス波形が右に 1

つずつずれていることがわかる。

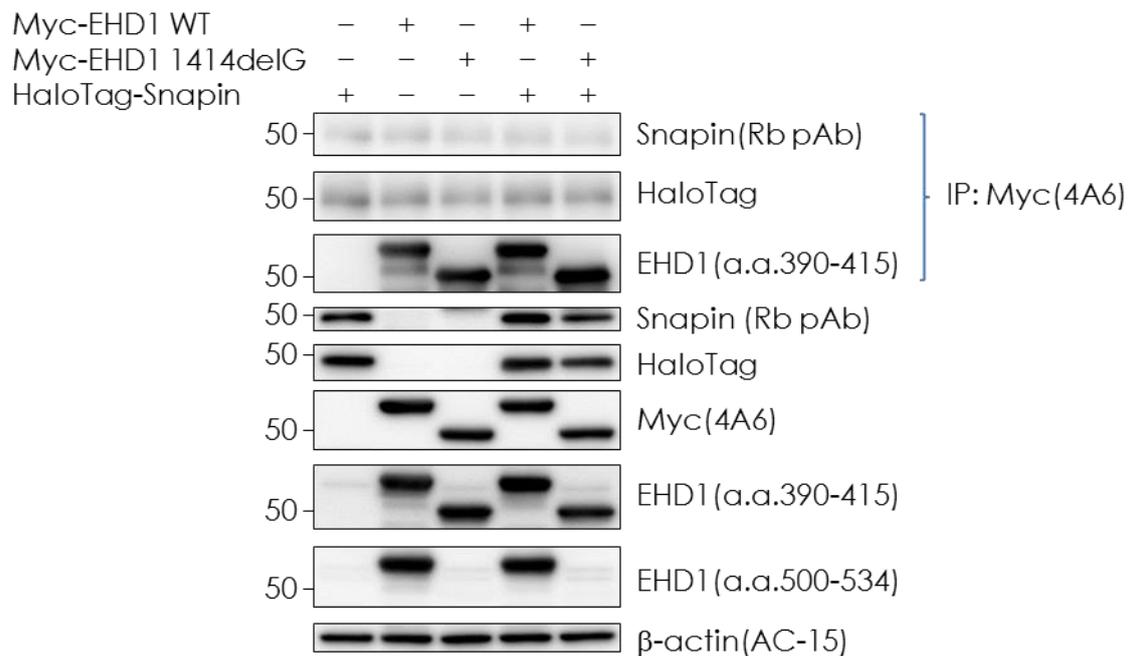


図 16 ウェスタンブロットの結果

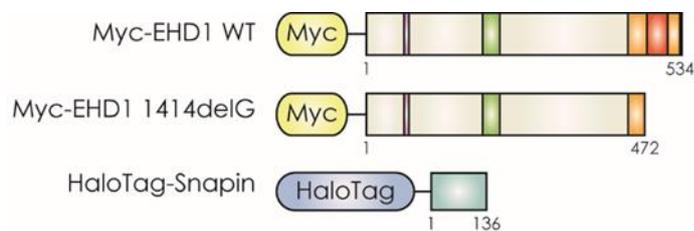


図 17 タグを付加したそれぞれのタンパク質の模式図

今回用いた 2 種類の anti-EHD1 抗体はそれぞれ、a.a.390-415 と a.a.500-534 をエピトープとしており、後者は EH ドメインを欠失したタンパク質を認識しない。

WB の結果 (図 16) から、1414delG 変異により、EH ドメインを欠失したタンパ

ク質が作られることが確認できた。Wei らの報告の通りであれば、野生型 EHD1 は Snapin と結合し、今回用いた EHD1 変異体では結合が認められないという結果になると予想された。しかし、変異体だけでなく、野生型 EHD1 と Snapin の結合が認められなかったため、これ以上の機能解析実験は実施しなかった。

4-8. エクソームデータのインフォマティクス解析により見出されたデノボ CNV 候補の実験的確認

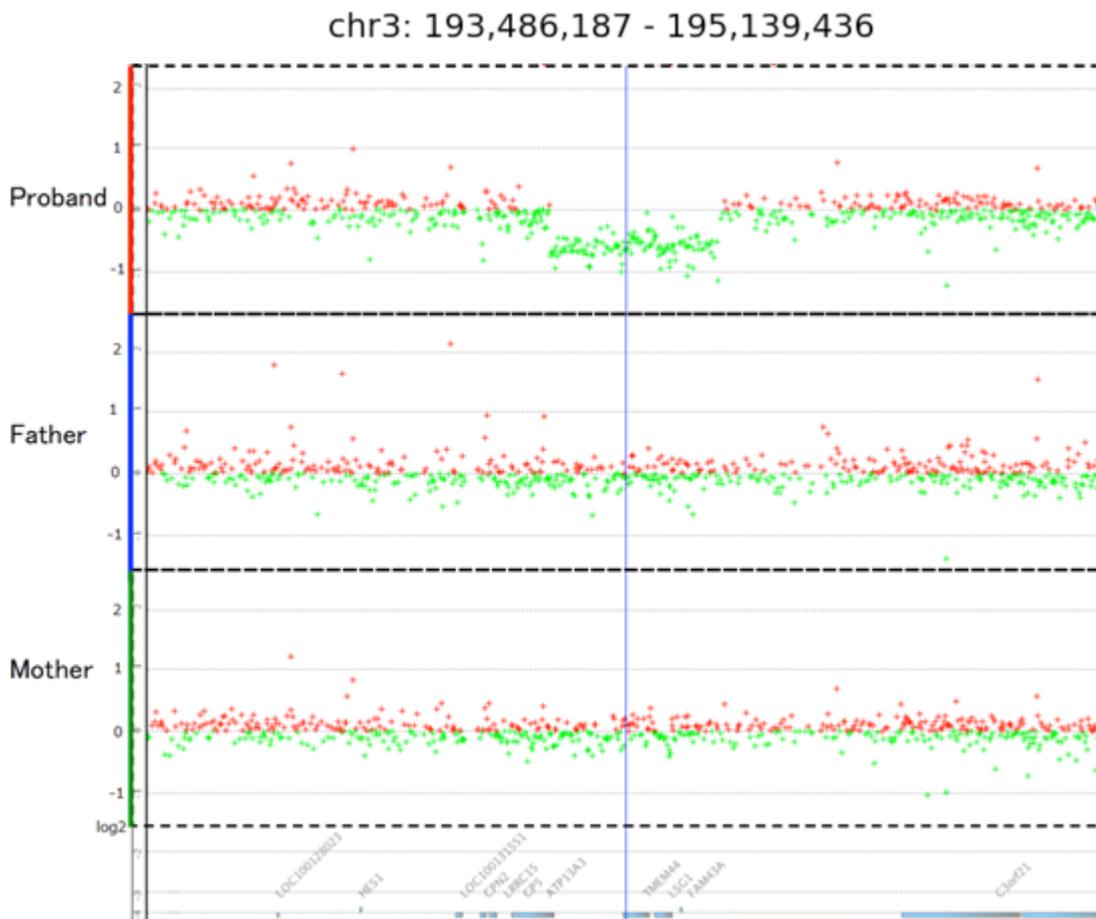


図 18 CGH アレイによって確認された 3q29 領域のデノボ CNV

我々はエクソームデータの解析により、3q29 領域に~0.2 Mbp の欠失が存在することを示す結果を得た。CoNIFER によって抽出したこの CNV 候補は、*ATP13A3*、*TMEM44*、*LSG1*、*FAM43A* 遺伝子を含む。この欠失を CGH マイクロ

アレイ法により実験的に確認した (図 18 : 欠失が両親には認められず、患者本人にのみ認められた。確認された CNV は heterozygous である。)。エクソームデータの解析により同定されたデノボ CNV はこの 1 家系のみ、1 か所のみであった。

4-9. デノボ SNV の個数と両親の年齢、発症年齢との関係

図 19 に示すのは以下である。

- a) functional(protein-altering) デノボ SNV の個数と、罹患者の発症年齢の分布
- b) デノボ SNV の個数 (全体) と子 (罹患者) の出生時父親の年齢の分布
- c) デノボ SNV の個数 (全体) と子 (罹患者) の出生時父親の年齢の分布

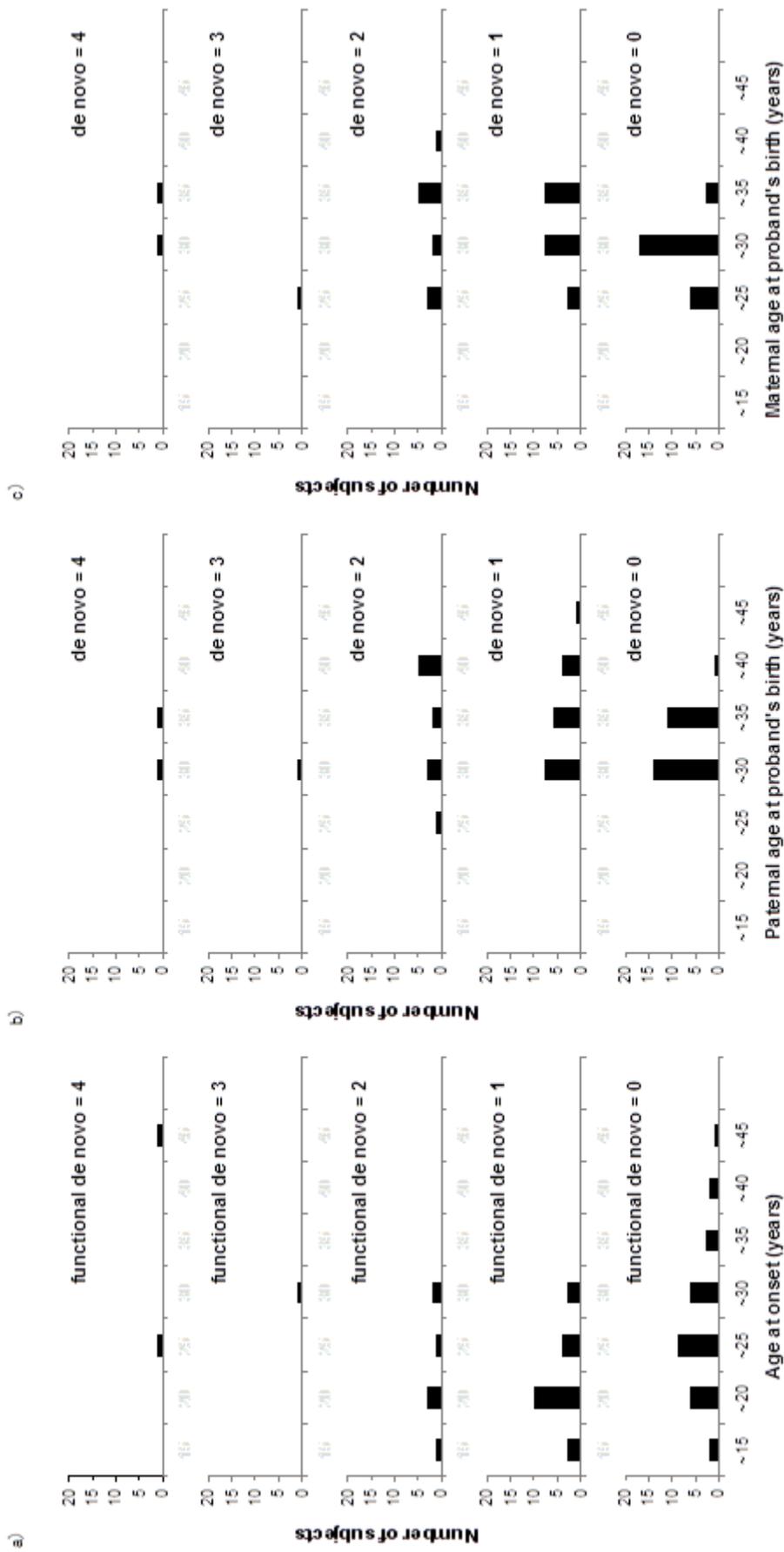
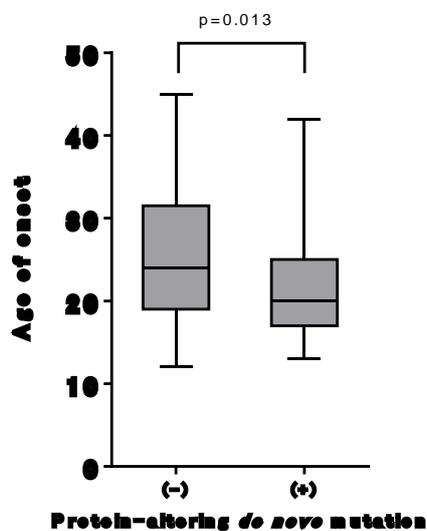


図 19 デノボ SNV の個数と年齢の関係

まず、我々は発端者の発症年齢とアミノ酸置換を伴う (protein-altering) デノボ変異の存在の関係を調べた。図 20 は、アミノ酸置換を伴うデノボ変異を持っている患者と持っていない患者で発症年齢を比較した箱ひげ図である。二つの群で発症年齢の平均値を比較すると、デノボ変異を持っている群の方が有意に低いことが示された (両側 t 検定、 $p=0.013$ 、発症平均年齢 \pm SD = 21.6 ± 6.1 デノボあり、 25.9 ± 8.8 デノボなし)。箱は中間値の分布を示し、ヒンジは 25% と 75% の分割線、上下のひげは最大値と最小値を示す。

図 20 protein-altering デノボ変異の有無と発症年齢の関係



一方で、患者の出生時の母親の年齢とデノボ変異の個数、父親の年齢とデノボ変異の個数には有意な相関は認めなかった（それぞれ Spearman の相関係数 $\rho = 0.087$ ($p=0.447$)、 $\rho = -0.038$ ($p=0.742$)）。これは既報⁴⁴とは異なる結果であったが、本研究では既報と比べサンプルサイズが小さいため、十分な検出力が得られなかった可能性が否定できない。また、双極性障害 I 型、II 型それぞれのみの解析においても、デノボ変異の数と患者出生時の父親、母親の年齢の間に有意な相関は認めなかった。

4-10. DAVID を用いたデノボ SNV の Gene Ontology (GO) 解析

続いて、the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, v6.7)^{43,44} を使用し、デノボ SNV が存在する遺伝子の GO 解析を行った。

ここでは、確認されたデノボ SNV のうち、より影響の大きく機能的変化が伴い

やすいと考えられる、アミノ酸置換を伴うデノボ変異と、Loss Of Function 変異に関して解析を行った。protein-altering SNV が存在する遺伝子の GO 解析を図 21 に示す。

図 21 protein-altering デノボ SNV が存在する遺伝子の GO 解析

Type			protein-altering	
Number of genes				
Number of analyzed members			N=79	
Term	Genes	Number of genes	P-Value	Benjamini
Molecular Function				
GO:0004435~phosphoinositide phospholipase C activity	PLCG1, CCKBR, PLCD3	3	0.003	0.353
GO:0004629~phospholipase C activity	PLCG1, CCKBR, PLCD3	3	0.004	0.283
GO:0005524~ATP binding	MYO10, DNAH9, SMG1, CHTF18, MYH6, MASTL, EHD1, CLCN6, MDN1, DDX42, CAMKK2	11	0.014	0.532
GO:0032559~adenyl ribonucleotide binding	MYO10, DNAH9, SMG1, CHTF18, MYH6, MASTL, EHD1, CLCN6, MDN1, DDX42, CAMKK2	11	0.015	0.463
GO:0030554~adenyl nucleotide binding	MYO10, DNAH9, SMG1, CHTF18, MYH6, MASTL, EHD1, CLCN6	11	0.022	0.503
GO:0005509~calcium ion binding	PLCG1, MACF1, PLCD3, EHD1, DCHS1, PROC, CAMKK2, CDH23	8	0.023	0.462
GO:0032553~ribonucleotide binding	MYO10, DNAH9, SMG1, CHTF18, MYH6, MASTL, DOCK10, EHD1, CLCN6, MDN1, DDX42, CAMKK2	12	0.023	0.416
GO:0032555~purine ribonucleotide binding	MYO10, DNAH9, SMG1, CHTF18, MYH6, MASTL, DOCK10, EHD1, CLCN6, MDN1, DDX42, CAMKK2	12	0.023	0.416
GO:0001883~purine nucleoside binding	MYO10, DNAH9, SMG1, CHTF18, MYH6, MASTL, EHD1, CLCN6, MDN1, DDX42, CAMKK2	11	0.024	0.382
GO:0001882~nucleoside binding	MYO10, DNAH9, SMG1, CHTF18, MYH6, MASTL, EHD1, CLCN6, MDN1, DDX42, CAMKK2	11	0.025	0.360
GO:0004620~phospholipase activity	PLCG1, CCKBR, PLCD3	3	0.028	0.359
GO:0008081~phosphoric diester hydrolase activity	PLCG1, CCKBR, PLCD3	3	0.028	0.339
GO:0017076~purine nucleotide binding	MYO10, DNAH9, SMG1, CHTF18, MYH6, MASTL, DOCK10, EHD1, CLCN6, MDN1, DDX42, CAMKK2	12	0.031	0.344
GO:0016298~lipase activity	PLCG1, CCKBR, PLCD3	3	0.039	0.384
GO:0000166~nucleotide binding	DNAH9, SMG1, MYH6, CAMKK2, XPA, MYO10, CHTF18, MASTL, CLCN6, EHD1, DOCK10, MDN1,	13	0.040	0.368
Biological Process				
GO:0030195~negative regulation of blood coagulation	PDGFB, KLKB1, PROC	3	0.002	0.740
GO:0050819~negative regulation of coagulation	PDGFB, KLKB1, PROC	3	0.003	0.582
GO:0030193~regulation of blood coagulation	PDGFB, KLKB1, PROC	3	0.005	0.669
GO:0050818~regulation of coagulation	PDGFB, KLKB1, PROC	3	0.006	0.657
GO:0048729~tissue morphogenesis	MACF1, MYH6, GLI3, KLF4	4	0.015	0.879
GO:0006259~DNA metabolic process	XPA, CCDC88A, PDGFB, UVRAG, SMG1, CHTF18	6	0.016	0.83
GO:0030030~cell projection organization	DNAH9, CCDC88A, MACF1, PDGFB, CDH23	5	0.022	0.885
GO:0048569~post-embryonic organ development	KLF4, CDH23	2	0.032	0.931

GO タームは、 $P < 0.05$ を有意として抜粋した。CC(Cellular Component)項目では有意にエンリッチしている GO タームは認めなかった。次に、LOF 変異の GO 解析も同様に行ったが、有意にエンリッチしている GO タームは認めなかった。

5. 考察

5-0. サンプル募集に関する考察

今回の募集はホームページ、雑誌、講演会等での宣伝等により行い、メールによる応募を受け付けた。理化学研究所一般公開、患者会の講演会等で実際に対面にて参加を呼びかけたことに応じる形で参加候補となった者は少数あったが、いずれも両親（または患者本人）の承諾が得られない、双極性障害の診断でないなどの理由から最終的に研究の被験者として採用されることは稀であった。また今回、郵送によるサンプル収集という方法を用いたが、被験者となった参加者の居住地は日本全国に渡り、南は沖縄県の離島、北は北海道まで幅広い地域から唾液採取キットの返送があった。本研究におけるサンプル収集を通じて、得た考察は以下のようなものである。

利点；研究所より遠方に居住する者でも応募可能、面接可能である。

欠点；応募する者がインターネットを使用できる年齢層や環境に限定される。

(但し1名のみ手紙での応募があった。)

発端者は1時間程度の電話面接に応じられることが条件であり、精神症状の

安定とある程度の意欲を必要とする。また、対面面接でないため相手の身なり

や表情等の情報が得られず、診断が不正確になる可能性がある。

とはいうものの、今回2012年8月よりサンプル収集を開始し、約2年で100

トリオ(300人)の双極性障害罹患患者及びその両親のDNAサンプルを収集する

ことができ、この双極性障害トリオサンプルコホートは日本では他に類をみな

い規模のものである。何より、煩雑な手順も厭わず研究の発展を信じご協力下

さった全ての被験者の方に多大な感謝と敬意を表したい。

5-1. 対象とサンプル

5-1-1. 対象

対象の構成に関しては男女比 32 人対 47 人と女性の比率がやや高かったが(女性が 59%)、双極性障害 I 型では男性 25 人、女性 31 人(女性が 55%) と大きな差はなく、II 型では男性 7 人、女性 16 人(女性が 69%) と女性は II 型で多く、疫学調査の結果と同様の傾向を示してと一致していた。

5-1-2. 唾液サンプルの量と質

唾液によるサンプル収集は採血による収集と比較して侵襲性、疼痛の大幅な削減を図ることができ、作業も簡便で、遠方の被験者からでもサンプル収集をすることができるという大きなメリットがある。一方で、採取環境は被験者に任されており一定でなく、採取量のばらつきや、不純物の混入、操作法の間違いなどが起こりやすく、収集 DNA の量や質に影響を与えるというデメリットが

ある。Oragene・DNA プロトコルによると Oragene・DNA/唾液混合液 4ml から採取できる平均 DNA 量は 110 μ g となっているが、最低 15 μ g～最大 300 μ g に及び、同じ検体から採取しても DNA 量は日によって変化すると記載されている。

DNA 収集量は被験者がそれぞれの採取場所にて採取した唾液量+Oragene 保存液 1.9ml となるが、その量と性状にはかなりのばらつきがあった（結果参照）。

しかし、DNA の収量としては、再採取が必要となったものはあったが、抽出したほぼすべてのサンプルにおいて Hiseq によるシーケンスに必要な量を確保することができた。抽出後の DNA の質も、塩基配列決定に使用するには問題のないものであった。

末梢血と唾液における DNA の質の差異に関しては、DNA の質に関しては両者ともに主に白血球成分由来の DNA であるため、本研究においてそれらの差異による大きな影響はないと考えた。

唾液中の DNA 含有細胞は白血球のみであり、これは顎下腺から分泌される唾液の 20-25%で、他の唾液腺からは分泌されない。

その他、唾液による DNA サンプル採取に影響する因子として口腔内細菌、食物残渣等の血液では混合しない物質のコンタミネーションによるものが考えられる。唾液中に夾雑物が残存したとしても、エクソームキャプチャの工程でヒトゲノム DNA のエクソン領域のみキャプチャされるため、ヒトと相同性の高い配列でない限り、DNA の配列決定にはほとんど影響を及ぼさないと考えられた。食物残渣や他の混合物による塩基配列への影響は我々の知る限り、認められなかった。しかし、口腔内細菌の影響に関しては、1 サンプルにおいてのみ、バクテリア由来と考えられるシーケンスが無視できない量でコンタミネーションしているものを認めた。Oragene キットプロトコルには溶液内にバクテリアの増殖を抑制する成分が含まれていると記載されているが、こういったことは一部起

こりうるようである。

5-2. 同定されたデノボ SNV 及びデノボ CNV に関する検討

5-2-1 体細胞変異に関して

本研究と主旨は異なるものの、1人の患者に2つの遺伝子に1箇所ずつの体細胞変異と思われる変異が実験的に確認された。体細胞変異とは後天的変異であり、配偶子形成時に生じると考えられるデノボ変異とは異なり、体細胞のDNA内で起こり、変異が起きた細胞が分裂してできる細胞にのみ受け継がれる。原因は、放射線や細胞障害等といわれており、主にがん細胞などで認められる。

今回体細胞変異が認められた細胞は患者の唾液中の白血球である可能性が高いため（DNAの74%は白血球由来）白血球の体細胞変異と言える。この患者は双極性障害I型であり、身体疾患の既往はなく、喫煙歴なし、飲酒歴は機会飲酒であった。本研究において確認された体細胞変異と疾患との関連は不明であ

る。

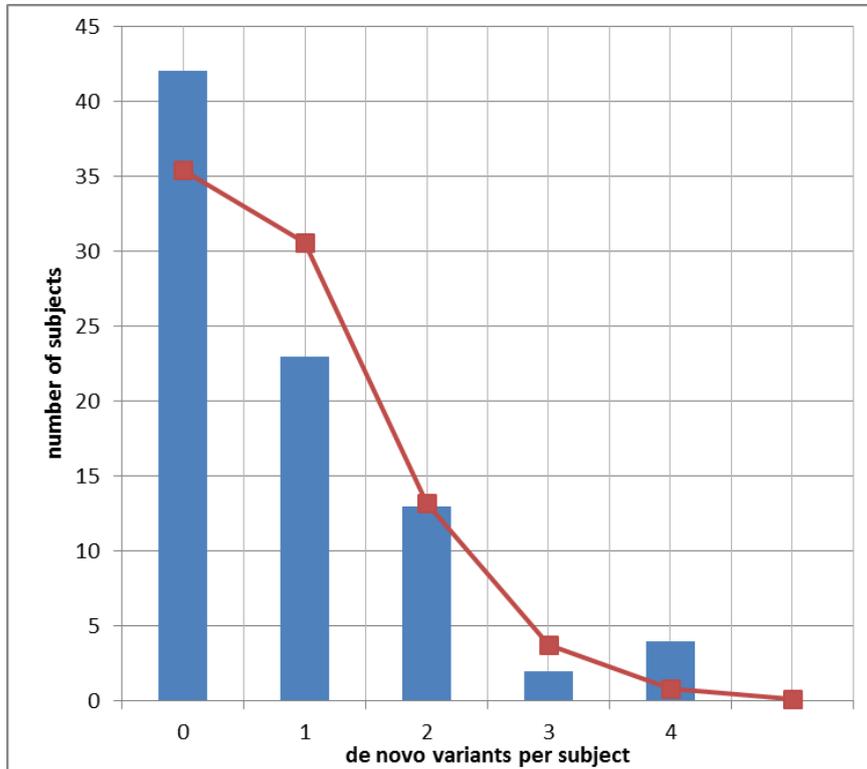
なお、これらの変異については、少数の体細胞変異候補に対する予備的な検討しか行っていないため、図 11、12、13 に示したデノボ変異のリストには含まれていないものである。

5-2-2. デノボ変異の個数の検討

《SNV に関する検討》

本研究で見いだされたデノボ SNV の分布は図 22-1 のようになっており Poisson 分布におおよそ従っており、これまでの報告と同様の傾向を示している。

図 22-1 1人当たりのデノボ変異の個数と人数の関係



1人あたりの平均デノボ SNV の個数は 0.89 であり、自閉症スペクトラム(0.94)

や非罹患同胞(0.84)¹⁶、統合失調症の 0.90¹⁸ と同様の結果であった。また、アミノ

酸置換を伴うデノボ変異に関しては1人あたり 0.72 個であった。

しかし、今回のフィルタリング条件は厳格な基準を採用したため、実際には

存在するが見逃しているデノボ SNV 候補 (false negative) が存在する可能性が

考えられる。今回用いた基準を満たさないものの中にも真のデノボ変異が存在することは否定できず、実際のデノボ変異の存在数は更に多い可能性がある。

この見逃した SNV 候補の数を推測するため、我々が過去に N=59（トリオ）の時点でデノボ変異を探索し解析した以下のデータを示す。

59 トリオの発端者は女性 36 名、男性 23 名で、I 型 46 名、II 型 13 名であった。発端者の平均年齢は 36.8 ± 8.8 歳（15-56 歳）であった。

フィルター条件は公共の遺伝子変異データベース（dbSNP137 または NHLBI Exome Sequencing または 1000 ゲノムプロジェクトにおいて Minor Allele Frequency[MAF]>0.01 である変異は除外した。そして、患者で 8 リード以上が変異アリルを示し、両親で 90%以上のリードがリファレンス配列のアリルを示している時、それをデノボ変異と定義した。その他の条件は本研究とほぼ変わらない。

解析された 59 トリオの内、34 家系に 64 か所のデノボ変異の候補が抽出された。そのうち 33 家系 52 か所のデノボ変異がサンガー法によって確認された (図 22-2)。バリデーション率は 82% であり、それぞれの変異の種類によるバリデーション率の内訳は、91% (34/37) non-synonymous、50% (7/14) synonymous、83% (5/6) INDELs、100% nonsense (5/5) 及び splicing (1/1) であった。1 人あたりの変異の数は 0 から 4 個に渡り Poisson 分布に従った。52 個の変異には 45 個のアミノ酸置換を伴うデノボ変異が含まれ、39 個は SNVs (34 non-synonymous、4 nonsense 及び 1 splicing) で、6 個は insertion/deletions:INDELs (3 frameshift, 2 amino acid insertion 及び 1 stop codon)、他の 7 個は synonymous SNV であった。一人当たりのデノボ変異の数は 0.88 個、でアミノ酸置換を伴うデノボ変異に関しては 0.76 個となった。

図 22-2 59 トリオの初期解析時に確認されたデノボ SNV のリスト

Gene Symbol	Polyphen2 HumDiv		Polyphen2 HumVar	
	Prediction	/Score	Prediction	/Score
<i>PLCD3</i>	B	0	B	0
<i>MSANTD1</i>				
<i>PROC</i>	B	0	B	0
<i>THYN1</i>				
<i>VAMP4</i>	B	0	B	0
<i>SMS</i>	D	0.989	P	0.838
<i>MACF1</i>				
<i>DCHS1</i>	D	0.997	D	0.98
<i>FYTTD1</i>	B	0	B	0.001
<i>NCOR2</i>				
<i>EHD1</i>				
<i>SMG1</i>	P	0.938	P	0.526
<i>DSEL</i>	D	0.999	D	0.941
<i>CSAD</i>	B	0.002	B	0.007
<i>KRTAP3-2</i>	P	0.91	P	0.58
<i>GRIN3A</i>				
<i>MYH6</i>	D	1	D	0.999
<i>HEPACAM</i>	B	0.001	B	0.005
<i>PKP3</i>				
<i>RLIM</i>	P	0.531	B	0.108
<i>MASTL</i>	B	0.003	B	0.002
<i>FAM135B</i>	B	0	B	0.001
<i>UNC13B</i>				
<i>CCKBR</i>	B	0.124	B	0.138
<i>CCDC116</i>	D	0.974	P	0.754
<i>MC4R</i>	P	0.552	B	0.248
<i>KLKB1</i>	B	0.126	B	0.033
<i>DMXL2</i>	B	0.062	B	0.024
<i>GSTM3</i>				
<i>GLI3</i>	D	0.975	B	0.08
<i>ATG4C</i>				
<i>CARD9</i>	P	0.952	B	0.278
<i>PGAP1</i>				
<i>CHTF18</i>	B	0.002	B	0.003
<i>TMPRSS11D</i>	D	1	D	0.978
<i>CAMKK2</i>	D	1	D	0.998
<i>PSMB11</i>	D	0.965	P	0.551
<i>DOCK10</i>	D	1	D	0.997
<i>C14orf80</i>	D	0.962	P	0.778
<i>RREB1</i>				
<i>UVRAG</i>				
<i>BZRAP1</i>				
<i>CCDC88A</i>	B	0.013	B	0.006
<i>KMT2C</i>				
<i>CDH23</i>	B	0.234	B	0.343
<i>LIN52</i>	D	0.979	P	0.871
<i>XPO4</i>				
<i>ADC</i>	D	1	D	0.998
<i>KLF4</i>				
<i>MOGAT1</i>	D	0.991	P	0.817
<i>DDX42</i>	P	0.589	P	0.544
<i>CHPF2</i>			B	

B: benign, P: possibly damaging, D: probably damaging

一方で、解析家系を N=84 に増やした際の解析結果は以下となった。

84 家系の発端者の内訳は男性 36 名、女性 48 名であり、I 型 61 名、II 型 23 名であった。発端者の年齢は平均 36.8 ± 9.1 歳（16-56 歳）であった。

フィルター条件は上記（N=59 時）と同様である。84 家系の解析では、49 家系に 99 箇所（95 の遺伝子）にデノボ変異候補が抽出された。99 のデノボ変異候補の内、44 家系に 77 箇所の変異がサンガー法により確認された（図 22-3）。バリデーション率は 78% であった。変異の種類におけるバリデーション率は 86% (51/59) nonsynonymous, 62% (14/25) synonymous、62% (5/8) INDELs, 100% nonsense (6/6) 及び splicing (1/1) であった。確認されたデノボ変異の数は 0 から 5 個に渡り、Poisson 分布に従った。この 77 箇所（76 遺伝子）の変異は 63 箇所（62 遺伝子）のアミノ酸置換を伴うデノボ変異が含まれ、58 は SNV (51 nonsynonymous, 6 nonsense 及び 1 splicing)、6 箇所が INDELs (3 frameshift、

2 amino acid insertion、1 stop codon) 他の 14 箇所は synonymous SNV であった。

一人あたりに確認されたデノボ変異の個数は全体で 0.91 個であり、アミノ酸置換を伴う変異に関しては 0.73 個であった。

このように、フィルター条件の変更によって抽出されないデノボ変異は増加したものの、1 人あたりのデノボ変異の個数としては変化していないことがわかる。よって、本研究にて算出された一人あたりのデノボ変異の個数を既報の数値と比較するのは妥当であると考えられる。

図 22-3 84 トリオの初期解析時に確認されたデノボ SNV のリスト

Gene Symbol	Amino Acid Change	Polyphen2 HumDiv	
		Prediction	Score
PLCD3	Ala515Val	benign	0
MSANTD1			
PROC	Ser9Arg	benign	0
THYN1			
VAMP4	Arg140His	benign	0
SMS	Lys151Arg	probablydamaging	0.989
MACF1			
DCHS1	Asp990Asn	probablydamaging	0.997
FYTTD1	Ser161Asn	benign	0
NCOR2			
EHD1	Val472Stop		
SMG1	Tyr3639Cys	possiblydamaging	0.938
DSEL	Gly761Asp	probablydamaging	0.999
CSAD	Arg167His	benign	0.002
KRTAP3-2	Asp23Asn	possiblydamaging	0.91
GRIN3A			
MYH6	Asp955Val	probablydamaging	1
HEPACAM	Asp183Gly	benign	0.001
PKP3			
RLIM	Ser455Phe	possiblydamaging	0.531
MASTL	Ser597Phe	benign	0.003
FAM135B	Asp300Val	benign	0
UNC13B			
CCKBR	Asp256Gly	benign	0.124
CCDC116	Gly885Ala	probablydamaging	0.974
MC4R	Val52Ala	possiblydamaging	0.552
KLKB1	Thr512Ile	benign	0.126
DMXL2	Leu608Ser	benign	0.062
GSTM3	Arg10Stop		
GLB	Val577Ile	probablydamaging	0.975
ATG4C			
CARD9	Glu326Lys	possiblydamaging	0.952
PGAP1			
CHTF18	Pro892Leu	benign	0.002
TMPRSS11D	Arg378Gln	probablydamaging	1
CAMKK2	Arg311Cys	probablydamaging	1
PSMB11	Arg113Gln	probablydamaging	0.965
DOCK10	Ser1531Pro	probablydamaging	1
DOCK10	Asn1529Ser	benign	0.217
C14orf80	Val80Met	probablydamaging	0.962
RREB1			
UVRAG	Trp30Stop		
BZRAP1			
CCDC88A	Arg1146Gln	benign	0.013
KMT2C	Lys3601Stop		
CDH23	Pro1394Arg	benign	0.234
LIN2	Glu82Gln	probablydamaging	0.979
XPO4	Tyr100S top		
ADC	Ala185Val	probablydamaging	1
KLF4			
MOGAT1	Thr18Lys	probablydamaging	0.991
DDX42	Asn524Tyr	possiblydamaging	0.589
CHPF2			
MYO10	Ala102Val	probablydamaging	0.999
XPA	Phe255Cys	benign	0.052
CLCN6	His808Tyr	benign	0.011
LCT	Pro227Leu	benign	0.001
MYBP3			
OR1S2	Gln245Pro	possiblydamaging	0.642
LZTR1	Ser22Pro	benign	0
HIVEP2	Ala1835Thr	probablydamaging	0.999
LENG8			
MDN1	Lys2825Arg	benign	0.002
HYPK			
DNAH9	Met3124Val	benign	0
EXOC1	Asp62His	probablydamaging	0.999
ANKRD16			
AAGAB			
PDGFB	Arg108Trp	probablydamaging	1
LMX1A			
LAMB3	Gly612Glu	possiblydamaging	0.518
AKAP12			
C19orf4	Leu566Val	probablydamaging	1
LAMA5	Arg1931Gln	possiblydamaging	0.797
PHF3	Lys590Thr	probablydamaging	0.999
DDHD1	Leu853Stop		
PLCG1	Pro619Ser	benign	0.168

《CNVに関する検討》

CNVに関しては既報では1トリオあたり0.13個⁴²とされているが、今回は79人の解析で1か所認めただので、1トリオあたり0.012個となった。トリオ当たりの個数としては我々のコホートでは少ないが、CNVあり対なし=1対78であり、Georgievaら⁷の報告では14対354、Malhotraら⁸の報告では8対177であることと比較すると、統計的には有意差はないと考えられる。(前者 $\rho=0.223$ 、後者 $\rho=0.192$ 、片側Fisherの正確確率検定)。しかしながら、今回のデノボCNVの検出はエクソームデータを元に行ったため、アレイCGHに比べると検出感度は低いと考えられる。

今回見いだされたデノボCNVは3q29領域に確認された。この領域は2005年にWillattらが3q29微細欠失症候群（自閉症や精神遅滞を伴う症候群）として報告した領域に近く、連鎖解析にて双極性障害や統合失調症との関連も報告さ

れている。今回我々が確認した CNV は、双極性障害に関連するとして報告されている既報⁴の 3q29 内領域より~1.3 Mbp 程度上流にあるものであり、この欠失は 3q29 微細欠失症候群の関連領域に対して何らかの調節要因として機能している可能性はある。

精神疾患と 3q29 領域の欠失に関しては、他に ASD、知的障害、てんかんで報告されており、その患者/健常者での頻度は 0.082/0.0014%と患者において高い⁵⁴。

5-2-3. 年齢との相関

まず発症年齢とデノボの個数に関しては、アミノ酸置換を伴うデノボ変異を持っている群の方が有意に発症年齢の低いことが示された。この結果はデノボ CNV が早期発症の双極性障害と強く関連しているという既知の報告と一致している。¹⁰ 同様の結果が ASD や統合失調症でも得られているが、これらの疾患では、父親の年齢が高いことが発症のリスクとなること、また子孫を残す確率が

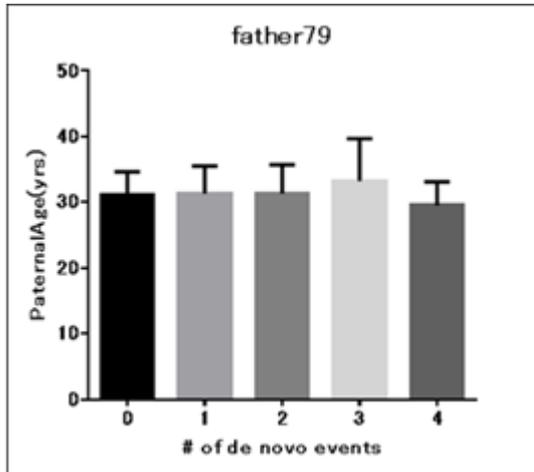
顕著に低いにも関わらず世界的に一定の確率で存在していることが知られている。これらのことから、ASD や統合失調症においてはデノボ変異としてリスク因子が定期的に補われていると考えられている。若年発症の重症な双極性障害でも、同様の可能性が考えられる。

本研究では父親の年齢の上昇とともにデノボ変異の個数が増えるという既知の傾向は認められなかった (図 23)。これはサンプルサイズが少ないことが主な原因であると考えられる。

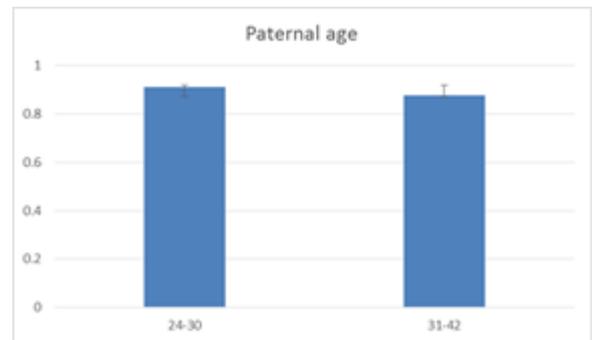
また、母親の年齢とデノボ変異の個数に関しては、特に有意な傾向はなく、既知のデータと矛盾しない結果となった。

図 23 デノボ SNV の個数と父親の年齢の解析

A)



B)



5-3 デノボ変異が見いだされた遺伝子の考察

5-3-1. GO 解析

先行研究では、細胞内のカルシウムシグナルと双極性障害の関連が指摘されている⁵⁵。GWAS では、*CACNA1C*⁶や他のカルシウムチャネル関連遺伝子と双極性障害患者の関連が報告されており^{44,45}、リチウムはカルシウムシグナルに影響することが知られている⁵⁶。

今回の GO 解析にて、有意な集積が認められたタームの中に、Ca²⁺関連パスウェイを認めたことも、双極性障害とカルシウムシグナリングの関連を支持していると考えられる。

LOF 変異についても個々の遺伝子に着目し、注目すべきものについて述べる。最も機能的に破壊的影響が強いと考えられるナンセンス変異が同定されたのは *EHD1* (EH domain containing protein 1)、*GSTM1* (glutathione S-transferase μ 3)、*UVRAG* (UV radiation resistance associated gene)、*KMT2C* (Lysine(K)-Specific

Methyltransferase 2C)、*XPO4* (exportin 4)、*DDHD1* (DDHD domain containing 1)

の6つの遺伝子であった。このうち、*EHD1*に関しては既に述べた。他に *KMT2C*

遺伝子は、*ASD* 及び統合失調症にてそのアミノ酸置換を伴うデノボ変異が同定

されている^{15,18,47}。これまで報告されているクロマチン調節遺伝子と精神疾患の

関連も支持する^{47,51}。

Frameshift insertion 変異が同定された *MACF1* は GO 解析にて Ca^{2+} パスウェイ

と関連を示したが、*MACF1* タンパクは *GSK3 β* により調節を受け、この酵素は

リチウムの作用機序に関わると言われている⁵⁷。

また、splicing 部位の変異が同定された *UNC13B* に関しては、GO タームでは

Ca^{2+} 関連とは示されないものの、カルモジュリンとの複合体を形成する、カル

シウムイオン結合タンパクである⁵⁸。

5-3-2. EHD1 機能解析

今回の実験では、既報⁴²の野生型 EHD1 と Snapin の結合が認められなかった。

野生型 EHD1 と Snapin の結合が観察されなかった理由として、免疫沈降実験に

用いたバッファ中の Ca^{2+} 濃度の影響が考えられる。EHD1 は Ca^{2+} 結合ドメイン

である EH ドメインを介して Snapin と結合することから、今回のような Ca^{2+} を

含まないバッファ中では結合が外れてしまい検出できなかった可能性がある。

また、Wei ら⁴²の行った免疫沈降実験結果からは、両者の結合が非常に弱いもの

であることが示唆され、セルライゼートを用いた免疫沈降では Snapin の発現量

を大過剰にしなければ EHD1 との結合を検出することが難しい可能性も考えら

れた。

5-4. リミテーション

ここでは本研究の限界についてまとめる。まず、今回解析したサンプル数は

79 トリオと十分とは言えず、その解析結果には限界がある。また、本研究のサンプル収集は電話面接にて行ったが、電話面接での診断には正確性という観点では限界がある。しかし双極性障害は成人発症である上に、その周期性から診断までに年単位の時間を要する疾患である。両親は高齢化しトリオサンプルの収集自体が困難である中、本研究では遠方の患者からも協力を募り多数のサンプルを収集することを優先した。唾液サンプルが参加者本人のものかどうかはトリオのヒトDNAの塩基配列決定により両親と本人の血縁関係の確認が取れば確定されるため、ゲノムDNAの個人特異性に関しては保証されている。

唾液採取環境は被験者それぞれ異なり、口腔内環境も様々である。サンプル内へのバクテリアその他の物質のコンタミネーションは不可避である。しかし、エクソームキャプチャ時にヒトゲノムDNAのみキャプチャされるというエクソーム解析の性質上、それらが塩基配列決定に及ぼす影響は考えにくかった。と

ころが、1 サンプルのみはバクテリアの塩基配列が解読されていたものを認めた。

さらに、デノボ変異のフィルター条件によりデノボ変異候補の個数は変化する

ことから、本研究の条件に当てはまらずに見逃したデノボ変異も存在する可能

性が考えられ、その数の比較には限界がある。検索条件に洩れたと考えられる

デノボ変異候補の数に関しては先に考察済みである。今回の検索は網羅的探索

的なものであり、今後、確認されたデノボ変異の内でもより疾患の発症と関連し

ている可能性の高いものを同定することが重要となる。

GO 解析に関しては、 p 値 <0.05 による有意な集積は認めたものの、多重比較

に対して Bonferroni 補正等を経た上で有意な GO タームは認めず、この結果の正

確性には限界がある。

5-5. 今後の展望

これまで、双極性障害のトリオ家系は国内ではほとんど集められていなかった。これは、双極性障害は成人発症の疾患であり、両親は遠方に住んでいることも多く、トリオサンプルを集めることが容易でないという事情と関連している。世界的には、NIMH や、イギリスの研究チームでトリオ家系が集められているが、多くは多発家系であり、孤発例は意外と集められていないようである。

よって、本研究によって収集した双極性障害トリオ家系のコホートは日本では他に類をみず、世界的にも希少価値の高いものである。よって、さらなるサンプルサイズの増加を試み、今回得られた結果の洗練が望まれる。また、まれな遺伝子変異の同定は、動物モデル研究、iPS 細胞研究など、全ての研究のスタート地点ともなる。今回同定された 71 のデノボ SNV のうち、LOF 変異など、影響の大きい遺伝子変化について、iPS 細胞・動物モデル等の機能モデルを作成し、

解析することにより、最終共通経路となるような神経回路を探る試みが期待される。そのためには今回得られたデノボ変異の中から、より疾患と関連している候補遺伝子を選び出し、更なる追跡を行うことが必要となる。今回見つかった6種類のナンセンス変異を持つ遺伝子や、他の注目すべき遺伝子に関しては、別の患者コホートとコントロールコホートを使用しリシーケンスを行い、変異が再度認められる遺伝子を見つける等のさらなる追跡が必要であると考えられる。

また、更なるトリオサンプルの収集により、今回確認されたデノボ変異が別の双極性障害トリオにおいても認められるなどの再現的な結果が望まれる。

サンプル収集の時点で、早期発症の双極性障害患者のトリオを積極的に収集するという方法により、発症年齢との相関をより明確に立証することができる可能性がある。

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、並々ならぬご尽力を頂いた下記の方々に深く感謝申し上げます。

RIKEN Kato lab

Nana Matoba Tomoyo Sawada An-a Kazuno Mizuho Ishiwata Atsuko Komori

Masako Kojima Yuki Kageyama

Atsushi Takata Takaoki Kasahara Tadafumi Kato and all other lab members



<http://www.brain.riken.go.jp/labs/mdmd/members.html> (2015/11/8)

RIKEN RRC Keisuke Fukumoto Fujiko Sakai

the Univ. of Tokyo Miki Bundo Yuki Kawakubo Yukiko Kano

Dokkyo Univ. Kumiko Fujii

Yamaguchi Univ. Kenichiro Harada Masako Hirotsu Koji Matsuo

and all participants



RIKEN's
Programs for
Junior Scientists

7. 参考文献

1. Goodwin, F. K. & Jamison, K. R. Manic-depressive illness. (Oxford University Press, 1990)
2. アメリカ精神医学会 DSMIV-TR 精神疾患の診断・統計マニュアル改訂版 (医学書院 2002 年)
3. Berk M, Dodd S. Bipolar II disorder: a review. *Bipolar Disord* 2005; 7: 11-21.
4. Bertelsen A, Harvald B, Hauge M. A Danish twin study of manic-depressive disorders. *Br J Psychiatry* 1977; 130: 330-351.
5. Mühleisen TW, Leber M, Schulze TG, Strohmaier J, Degenhardt F, Treutlein J et al. Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nature communications* 2014; 5: 3339.
6. Sklar P, Smoller JW, Fan J, Ferreira MAR, Perlis RH, Chambert K et al. Whole-genome association study of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 558-569.
7. Green, E. K. et al. Copy number variation in bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, doi:10.1038/mp.2014.174 (2015).
8. Georgieva, L. et al. De novo CNVs in bipolar affective disorder and schizophrenia. *Hum Mol Genet* 23, 6677-6683, doi:10.1093/hmg/ddu379 (2014).
9. Girirajan, S. & Eichler, E. E. De novo CNVs in bipolar disorder: recurrent themes or new directions? *Neuron* 72, 885-887, doi:10.1016/j.neuron.2011.12.008 (2011)
10. Lee SH, Wray NR, Goddard ME, Visscher PM. Estimating missing heritability for disease from genome-wide association studies. *Am J Hum Genet* 2011; 88: 294-305.

11. A. Kong, et al. Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* 488, 471-475 (2012).
12. Frans, E., MacCabe, J. H. & Reichenberg, A. Advancing paternal age and psychiatric disorders. *World psychiatry : official journal of the World Psychiatric Association (WPA)* 14, 91-93, doi:10.1002/wps.20190 (2015).
13. Sanders SJ, Murtha MT, Gupta AR, Murdoch JD, Raubeson MJ, Willsey AJ et al. De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 2012; 485: 237-241.
14. I. Iossifov et al., De novo gene disruptions in children on the autistic spectrum. *Neuron* 74, 285-299 (2012).
15. B. J. O'Roak et al., Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485, 246-250 (2012).
16. Iossifov I, O' Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* 2014; 515: 216-221
17. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods* 7(4):248-249 (2010).
18. Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, Williams HJ, Dwyer S, Gormley P et al. De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* 2014; 506: 179-184.
19. J. de Ligt et al., Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. *The New England journal of medicine* 367, 1921-1929 (2012).
20. A. Rauch et al., Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study.

- Lancet (London, England) 380, 1674-1682 (2012).
21. Miller, B. et al. Meta-analysis of paternal age and schizophrenia risk in male versus female offspring. *Schizophr Bull* 37, 1039-1047, doi:10.1093/schbul/sbq011 (2011).
 22. Malaspina, D. et al. Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Archives of general psychiatry* 58, 361-367 (2001).
 23. Reichenberg, A. et al. Advancing paternal age and autism. *Archives of general psychiatry* 63, 1026-1032, doi:10.1001/archpsyc.63.9.1026 (2006).
 24. Hultman, C. M., Sandin, S., Levine, S. Z., Lichtenstein, P. & Reichenberg, A. Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Mol Psychiatry* 16, 1203-1212, doi:10.1038/mp.2010.121 (2011).
 25. Power RA, Kyaga S, Uher R, MacCabe JH, Långström N, Landen M et al. Fecundity of patients with schizophrenia, autism, bipolar disorder, depression, anorexia nervosa, or substance abuse vs their unaffected siblings. *JAMA Psychiatry* 2013; 70: 22-30.
 26. Mansour H, Kandil K, Wood J, Fathi W, Elassy M, Ibrahim I et al. Reduced Fertility and Fecundity among Patients with Bipolar I Disorder and Schizophrenia in Egypt. *Psychiatry Investig* 2011; 8: 214-220.
 27. Malhotra D., et al., High frequencies of de novo CNVs in bipolar disorder and schizophrenia. *Neuron* 72, 951-963 (2011).
 28. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.* 2009;4(1):44-57.
 29. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths

- toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):1-13.
30. Kato T. Whole genome/exome sequencing in mood and psychotic disorders. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2015 Feb;69(2):65-76
 31. M. Pirooznia, F. S. Goes, P. P. Zandi, Whole-genome CNV analysis: advances in computational approaches. *Frontiers in genetics* **6**, 138 (2015).
 32. C. Cruceanu *et al.*, Family-based exome-sequencing approach identifies rare susceptibility variants for lithium-responsive bipolar disorder. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* **56**, 634-640 (2013).
 33. K. A. Strauss *et al.*, A population-based study of KCNH7 p.Arg394His and bipolar spectrum disorder. *Hum Mol Genet* **23**, 6395-6406 (2014).
 34. A. Fiorentino *et al.*, Analysis of ANK3 and CACNA1C variants identified in bipolar disorder whole genome sequence data. *Bipolar disorders* **16**, 583-591 (2014).
 35. Ament SA, Szelinger S, Glusman G, Ashworth J, Hou L, Akula N et al. Rare variants in neuronal excitability genes influence risk for bipolar disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 3576-3581.
 36. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic acids research* **38**, e164, doi:10.1093/nar/gkq603 (2010)
 37. Fromer, M. et al. Discovery and statistical genotyping of copy-number variation from whole-exome sequencing depth. *American journal of human genetics* **91**, 597-607, doi:10.1016/j.ajhg.2012.08.005 (2012)
 38. Fromer, M. & Purcell, S. M. Using XHMM Software to Detect Copy Number

- Variation in Whole-Exome Sequencing Data. *Current protocols in human genetics* / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.] 81, 7.23.21-27.23.21, doi:10.1002/0471142905.hg0723s81 (2014).
39. Poultney, C. S. et al. Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *American journal of human genetics* 93, 607-619, doi:10.1016/j.ajhg.2013.09.001 (2013).
 40. Krumm, N. et al. Copy number variation detection and genotyping from exome sequence data. *Genome research* 22, 1525-1532, doi:10.1101/gr.138115.112 (2012).
 41. Purcell, S. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics* 81, 559-575, doi:10.1086/519795 (2007).
 42. Wei S, Xu Y, Shi H, Wong S-H, Han W, Talbot K et al. EHD1 is a synaptic protein that modulates exocytosis through binding to snapin. *Mol Cell Neurosci* 2010; 45: 418-429.
 43. R. Chudal, et al., Parental age and the risk of bipolar disorders. *Bipolar Disord.* Feb 6 (2014).
 44. D. Curtis, et al., Case-case genome-wide association analysis shows markers differentially associated with schizophrenia and bipolar disorder and implicates calcium channel genes. *Psychiatry Genet.* 21, 1-4 (2011).
 45. V. Moskvina, et al., Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common risk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Mol. Psychiatry* 14, 252-260 (2009).
 46. Noor A, Lionel AC, Cohen-Woods S, Moghimi N, Rucker J, Vincent JB et al. Copy number variant study of bipolar disorder in Canadian and UK

- populations implicates synaptic genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2014 Jun;165B(4):303-13. doi: 10.1002/ajmg.b.32232. Epub 2014 Apr 3.
47. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* 2014; 515: 209-215.
 48. Girard SL, Gauthier J, Noreau A, Xiong L, Zhou S, Jouan L et al. Increased exonic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia. *Nat Genet* 2011; 43: 860-863.
 49. Xu B, Ionita-Laza I, Roos JL, Boone B, Woodrick S, Sun Y et al. De novo gene mutations highlight patterns of genetic and neural complexity in schizophrenia. *Nat Genet* 2012; 44: 1365-1369.
 50. Gulsuner S, Walsh T, Watts AC, Lee MK, Thornton AM, Casadei S et al. Spatial and temporal mapping of de novo mutations in schizophrenia to a fetal prefrontal cortical network. *Cell* 2013; 154: 518-529.
 51. McCarthy SE, Gillis J, Kramer M, Lihm J, Yoon S, Berstein Y et al. De novo mutations in schizophrenia implicate chromatin remodeling and support a genetic overlap with autism and intellectual disability. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 652-658.
 52. Yap CCC, Lasiecka ZM, Caplan S, Winckler B. Alterations of EHD1/EHD4 protein levels interfere with L1/NgCAM endocytosis in neurons and disrupt axonal targeting. *J Neurosci* 2010; 30: 6646-6657.
 53. Krumm, N. et al. Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nature genetics* 47, 582-588, doi:10.1038/ng.3303 (2015).
 54. Rees, E. et al. Analysis of copy number variations at 15

- schizophrenia-associated loci. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 204, 108-114, doi:10.1192/bjp.bp.113.131052 (2014).
55. Warsh, J.J. Andreopoulos, S., and Li P.P. (2004). Role of intracellular calcium signaling in the pathophysiology and pharmacotherapy of bipolar disorder: current status. *Clinical Neuroscience Research* 4, 201–213.
56. Kato T. (2008). Molecular neurobiology of bipolar disorder: a disease of ‘mood stabilizing neurons’? *Trends Neurosci.* 31, 495-503.
57. Jope, R. S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends in pharmacological sciences* 24, 441-443, doi:10.1016/s0165-6147(03)00206-2 (2003).
58. Junge, H. J. et al. Calmodulin and Munc13 form a Ca²⁺ sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell* 118, 389-401, doi:10.1016/j.cell.2004.06.029 (2004).

8. 図の凡例

図 1

躁病エピソードの DSM-IV 診断基準。

DSM-IV-TR による躁病エピソードの診断基準を示す。DSM-IV は、アメリカ精神医学会が定義した精神疾患の国際的な診断基準である。大うつ病エピソードと躁病エピソードを繰り返すものを双極 I 型障害と呼ぶ。本図は「DSM-IV-TR 精神疾患の診断・統計マニュアル改訂版」(医学書院 2002 年) から引用した。

図 2

軽躁病エピソードの DSM-IV 診断基準。

DSM-IV-TR による軽躁病エピソードの診断基準を示す。大うつ病エピソードと軽躁病エピソードを繰り返すものを双極 II 型障害と呼ぶ。本図は「DSM-IV-TR 精神疾患の診断・統計マニュアル改訂版」(医学書院 2002 年) から引用した。

図 3

大うつ病エピソードの DSM-IV 診断基準。

DSM-IV-TR による大うつ病エピソードの診断基準を示す。本図は「DSM-IV-TR 精神疾患の診断・統計マニュアル改訂版」(医学書院 2002 年) から引用した。

図 4

双極性障害 I 型、II 型の DSM-IV 診断基準。

上からそれぞれ、双極 I 型障害、双極 II 型障害の診断基準を示す。本図は「DSM-IV-TR 精神疾患の診断・統計マニュアル改訂版」(医学書院 2002 年) から引用した。

図 5-1

被験者募集のために作成したポスター及びチラシ。

左は理化学研究所一般公開におけるポスター、中央は患者会における募集のチラシ、右は講演会における募集のチラシを示す。

図 5-2

被験者の方々に送付しご記入頂いた臨床情報フォーム。

患者とその両親に送付し、ご記入頂いた問診票の内容を示す。

図 6

EHD1 遺伝子、*EHD1* タンパクの模式図。

A)*EHD1* 遺伝子の塩基配列である。リファレンス配列 (WT) からの G の欠失により、ストップコドンが発生することを示した模式図を示す。

B)*EHD1* タンパクの構造を示す。*EHD1* タンパクは EH domain により、snapin と結合する。(Wei ら)

図 7

サンプル収集の進捗状況。

サンプル収集の進捗状況を示したグラフを示す。本研究におけるサンプル収集は 2012 年 8 月より開始された。最初の時点での 10 サンプルはあらかじめ研究室に収集されていた血液の 10 トリオである。筆者が本研究のサンプル収集を引き継いだのが 2013 年 1 月であり、その後 2014 年 5 月までに計 100 トリオの双極性障害トリオサンプルを収集した。

図 8-1

被験者の病型、性別。

被験者の病型（Ⅰ型かⅡ型か）の内訳、及び性別の内訳を示す。本研究のコホートは一般的な有病率と矛盾しなかった。

図 8-2

被験者群のキャラクター。

被験者群の平均年齢、平均発症年齢、平均の患者出生時父親の年齢、患者出生時母親の年齢を示す。数値は平均±標準偏差（最低値-最高値）を表す。

図 9-1

Nanodrop の結果。

吸光光度計（NanoDrop）にて計測した、インハウスコントロールサンプルのゲノム DNA の吸光度（260/280、260/230）の値を示す。

上から順に食前空腹時の抽出 1、食前空腹時の抽出 2、食後 1 時間の抽出 1、食後 1 時間の抽出 2 の値である。

図 9-2a、2b

Nanodrop の結果のプロット。

2a は唾液①（食前空腹時）のゲノム DNA の吸光度をプロットしたグラフである。2b は唾液②（食後 1 時間）のゲノム DNA の吸光度をプロットした。

図 10

エクソームデータの解析により抽出されたデノボ SNV の候補。

Hiseq による解析にて得られたエクソームデータを、インフォマティクス解析し、

抽出されたデノボ変異の候補遺伝子とその場所のリストを示す。計 78 箇所のデノボ SNV 候補が同定された。

図 11

サンガー法により確認されたデノボ SNV のリスト。

図 10 のデノボ変異候補をサンガー法による塩基配列にて確認した。存在が確認されたデノボ変異のリストを示す。計 71 箇所 (42 家系) にデノボ SNV が同定された。

図 12

確認されたデノボ SNV のキャラクター。

同定されたデノボ SNV の種類とそれぞれの数を示す。

1 つの遺伝子上に 2 か所の変異が確認されたもの (DOCK10) に関しては、それぞれの変異を 1 か所と数え合計 2 個としている。

図 13-1

確認されたデノボ SNV と確認されなかったデノボ SNV、バリデーション率。

遺伝子名の列にて、確認されたデノボ SNV を赤、確認されなかったデノボ SNV を灰色で示す。黄色はサンガー法で確認された変異のシグナルが若干低かったもので、本研究では確認された SNV として扱った。

また、バリデーション率 (確認率) をそれぞれの変異の種類ごとに計算した値を示した。

図 13-2

Polyphen2 を用いたアミノ酸変化の影響の予測。

Missens 変異に関して、今回同定されたデノボ変異によるアミノ酸変化にてどれくらいの機能変化をもたらすか Polyphen2 を使用し評価した。

図 14

パイロシーケンス法により確認された 2 箇所の体細胞変異。

初期の 10 トリオの解析にて、*GOLGA4*、*RNF135* の 2 つの遺伝子に、サンガー法によって変異かどうか判別しづらい低いシグナルが観察された（右、上から発端者、母親、父親）。このシグナルがデノボ変異かどうか確認するため、パイロシーケンスによるリアルタイムシーケンスを行った（左：上から発端者、母親、父親）。ひとつ目 *GOLGA4* では、リファレンス配列では C、変異型では G（図の sequence to analyze）の配列を持つアリの混合物にパイロシーケンサが 1 塩基ずつ dNTP を添加していき、発光の強さを計測し、どれくらいの割合で変異型が含まれているか計算する。灰色網の部分で、発端者の C の波形は両親より低くなっている。一方でその後の G の波形は両親のほうが高くなっている。変異のあるポジションの後ろの配列が GGG であるため、変異分の G の発光とその後の G3 つ分の発光が重なって計測されているため、G の高さは 3 倍以上に高くなっているが、それを差し引いて比をとると 8% の変異型が含まれていることがわかる（緑矢印）。

RNF135 も同様にして 16% の変異型 G→A が含まれていることがわかった。（緑矢印）

図 15

サンガー法により確認された *EHD1* のデノボ変異。

EHD1 のサンガー法によるシーケンス波形である。発端者においてのみ、heterozygous の 1414G 欠損が認められ（矢頭）、シーケンス波形がそこから 1 つ

ずつ左にずれて重複しているのがわかる。

図 16

ウエスタンブロットの結果。

列は左から HaloTag-Snapin 単独、Myc-EHD1 WT 単独、Myc-EHD1 変異型単独、Myc-EHD1WT+HaloTag-Snapin、Myc-EHD1 変異型+HaloTag-Snapin の免疫沈降のシグナルを示す。Snapin、HaloTag はいずれも認識せず、Wei らの報告とは異なる結果となった。(上 2 行) 今回用いた 2 種類の anti-EHD1 抗体は a.a.390-415 と a.a.500-534 をエピトープとしており、後者は EH ドメインを欠失したタンパク質を認識しない。a.a.390-415、Snapin、HaloTag、Myc はそれぞれを保有するタンパク質を認識している。(3-6 行目) a.a.500-534 は変異型 EHD1 を認識せず、WT の EHD1 のみ認識しているため、変異体 EHD1 は EH ドメインを欠失したタンパク質であることが判明した。一番下の行の β -actin は positive control である。

図 17

タグを付加したそれぞれのタンパク質の模式図。

上から順に、Myc タグを付加した EHD1 タンパク (WT : a.a.1-534) の構造の模式図、Myc タグ付加した変異型 EHD1 (1414delG) タンパク (WT の EHD1 より C 末端が短い : a.a.1-472) の構造の模式図、Halo タグを付加した snapin の模式図を示す。

図 18

CGH アレイにより確認された 3q29 領域のデノボ CNV。

Comparative Genomic Hybridization (Two color) を行い、色素強度を測定したものを数値化し、LogRatio : Log_{10} (Cyanin5 色素強度/Cyanin3 色素強度) を求め、

その Log_2 をとったものを各プローブの位置ごとにプロットした結果である。プロットは GeneSpring ソフトウェアを用いて行った。赤のドットは Log_2 (コントロールゲノムの LogRatio)、緑のドットは Log_2 (サンプルゲノムの LogRatio) を示す。

横軸の領域は 3 番染色体 193486187-195139436 の範囲であり、上から患者、父親、母親のアレイデータ、一番下はその領域に存在する遺伝子を示している。患者において中央に緑のシグナルが赤とずれている部分が同定されている。GeneSpring ソフトウェアでは、コピーナンバー1 の場合、コピーナンバー2 のドットは表示されない。また、コピーナンバー0 (homozygous の欠失) の場合は緑のドットが-3 から-4 の位置に単独で表示される。これらのことより、今回の結果はコピーナンバー1=欠失 (heterozygous) と判断された。

この欠失は両親には認めず、デノボ CNV であることが確認された。

図 19

デノボ SNV の個数と年齢の関係。

- a) Protein-altering(アミノ酸置換を伴う)デノボ変異の個数と、患者発症年齢のプロットである。横軸は 5 歳毎に分類した年齢、縦軸はアミノ酸置換を伴うデノボ変異の個数を示す。本研究では明らかな相関は認めなかったものの、デノボ変異の有無にてコホートを 2 分した解析にて有意差を認めた(図 20)。
- b) デノボ変異と患者出生時父親年齢のプロットである。横軸は 5 歳毎に分類した患者出生時の父親の年齢、縦軸はデノボ変異の総数を示す。本研究では明らかな相関は認めなかった。
- c) デノボ変異と患者出生時母親年齢のプロットである。横軸は 5 歳毎に分類した患者出生時の母親の年齢、縦軸はデノボ変異の総数を示す。本研究では明らかな相関は認めなかった。

図 20

Protein-altering デノボ変異の有無と発症年齢の関係。

アミノ酸置換を伴うデノボ変異を持っている患者と持っていない患者で発症年齢を比較した箱ひげ図である。二つの群で発症年齢の平均値を比較すると、デノボ変異を持っている群の方が有意に低いことが示された(両側 t 検定、 $p=0.013$ 、発症平均年齢 \pm SD = 21.6 ± 6.1 デノボあり、 25.9 ± 8.8 デノボなし)。箱は中間値の分布を示し、ヒンジは 25%と 75%の分割線、上下のひげは最大値と最小値を示す。

図 21

Protein-altering デノボ SNV が存在する遺伝子の GO 解析。

アミノ酸置換を伴う (protein-altering) SNV が存在する遺伝子の GO 解析を示す。the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, v6.7)を使用し、デノボ SNV が存在する遺伝子の GO 解析を行った。ここでは、確認されたデノボ SNV のうち、より影響の大きく機能的変化が伴いやすいと考えられる、アミノ酸置換を伴うデノボ変異と、Loss Of Function 変異に関して解析した。

図 22-1

1 人当たりのデノボ変異の個数と人数の関係。

デノボ変異の個数 (横軸) と、患者の数 (縦軸) の関係を示す。確認されたデノボ変異の個数は一人当たり 0-4 個に渡り、その分布は Poisson 分布 (赤線) におおよそ従っている。

図 22-2

59 トリオの初期解析時に確認されたデノボ SNV のリスト。

全体のバリデーション率は 82%であった。一人当たりのデノボ変異の数は 0.88 個で、アミノ酸置換を伴うデノボ変異に関しては 0.76 個であった。

図 22-3

89 トリオの初期解析時に確認されたデノボ SNV のリスト。

全体のバリデーション率は 78%であった。一人当たりに確認されたデノボ変異の個数は全体で 0.91 個であり、アミノ酸置換を伴う変異に関しては 0.73 個であった。

図 23

デノボ SNV の個数と父親の年齢の解析。

A) デノボ変異の個数と患者出生時父親の年齢のプロット

B) 父親の年齢を 30 歳以上と未満に分けた時のデノボ変異の平均個数の比較

本研究では父親の年齢の上昇とともにデノボ変異の個数が増えるという既知の傾向は認められなかった。