

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 片岡 宗子

【背景と目的】

双極性障害とは、躁状態とうつ状態を繰り返す気分障害である。躁状態、うつ状態の両方が、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。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ゆく。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である DSM-5 (The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5) に従って行われる。双極性障害はⅠ型とⅡ型に分類され、Ⅰ型は大うつ病エピソードに躁状態を伴い、入院を必要とすることが多い。Ⅱ型は軽躁状態を伴うものである。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型障害では女性に優位である。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。

双生児研究では、双極性障害の一卵性双生児の一致率は80%と報告されている。DNA マイクロアレイの開発により、詳細な遺伝子変化を検索できるようになると、頻度の高い（マイナーアليل頻度5%以上）の1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）をハイスループットに解析することが可能となった。そこで2007年頃より全ゲノム関連解析（GWAS : Genome-wide Association Study）が盛んに行われ、*CACNA1C*等、疾患関連候補の多型（SNP : Single Nucleotide Polymorphism）が多数同定されたが、各多型の疾患に対する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いえなかった。

このように、これまで様々な研究が双極性障害と遺伝との関係を示唆してきたにも関わらず、決定的な原因となる遺伝子は特定されておらず、「missing heritability」ともよばれている。近年、次世代シーケンサーの開発により、ヒトゲノムがより安価かつよりハイスル

ーブットに解読できるようになった。2012 年、Sanders らは、Simons Simplex Collection (SSC) のトリオ家系を用いてエクソーム解析を行い、およそ 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。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を意味する。最近では統合失調症や精神発達遅滞においても、デノボ変異の疾患への関与が多数報告されている。

本研究は、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かどうか探索することを目的として開始した。

【方法】

〔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（トリオ）で研究に参加できる被験者の募集を行った。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、を候補者とし電話面接した。面接後、書類及び唾液サンプルを返送して頂き、以下の 3) の基準を満たす者のみを採用した。(3) 熟練した精神科医師が MINI (M.I.N.I international neuropsychiatric interview) を用い構造化面接を行い、DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition) に従って双極 I 型障害または II 型障害と診断された者。) 特に除外条件はなく、被験者は全て日本人である。

〔サンプル採取とゲノム DNA 抽出〕本研究では主に、被験者が自ら採取した唾液サンプルを用いた。唾液からのゲノム DNA 抽出は Oragene 唾液採取キット (DNA genotek) のプロトコルに従って行った。一部は、上腕末梢血管から一般の手順により採血された末梢血由来のゲノム DNA を用いた。

〔ゲノム DNA のエクソーム解析〕エクソン領域のキャプチャとライブラリ作製の工程は、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。エクソン領域のキャプチャには SureSelect^{XT} Human All Exon キット (Agilent Technologies) を用いた。塩基配列決定には、HiSeq2000 または 2500 (Illumina) を用いた。

〔デノボ変異の実験的確認〕エクソームデータからインフォマティクス解析により抽出されたデノボ SNV が、実際に存在するかどうかサンガー法を用いて実験的確認を行った。また、パイロシーケンス法によりデノボ体細胞変異の確認、CGH アレイ法によりデノボ CNV の実験的確認を行った。同定されたデノボ SNV については DAVID : the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery を用いた Gene Ontology (GO) 解析

を行った。

〔デノボ変異の機能的解析〕我々は、確認されたデノボ SNV の中で、nonsense 変異であり GO 解析においてカルシウムイオン関連パスウェイにも含まれている *EHD1* 遺伝子の変異に着目した。この変異を持つミュータント cDNA を作成し、その発現様式と機能的変化 (snapin との結合能の欠損) を調べる試みを行った。

【結果】

本研究にあたって収集したトリオサンプルは 118 家系 (同研究室血液 10 家系、同研究室唾液 104 家系、他施設唾液 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) を収集した。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除外し、79 家系として後の解析に進んだ。尚、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。双極性障害 I 型が 56 人、II 型が 23 人、男性が 32 人、女性が 47 人であった。また、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。患者の平均年齢は 36.9 歳、平均発症年齢は 23.7 歳であった。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。

初期の解析にて認めた、*GOLGA4*、*RNF135* の 2 か所のデノボ体細胞変異の候補を、パイロシーケンス法を用い実験的確認した。変異は両方とも確認され、変異率はそれぞれ 8%、16% であった。

本研究において確認された SNV は計 71 箇所 (42 家系) であり、これは 1 家系当たり平均 0.89 個であった。1 人あたりに見つかったデノボ SNV の個数は 0-4 個にわたった。CNV に関しては、エクソームデータにて計 1 か所 (1 家系) のデノボ CNV (- 0.2 Mbp の欠失) が抽出され、この CNV は 3q29 領域に存在し、CGH アレイにより実験的にも確認された。続いて、デノボ SNV の数と被験者年齢の相関を解析した。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すると、発症年齢の平均値は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。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。

デノボ SNV の GO 解析では、Molecular Function の項目にて計 15 の有意な GO タームのエンリッチメントを認めた。上位 6 番目にはカルシウムイオン関連パスウェイのエンリッチメントが含まれた。

EHD1 の機能解析実験では、変異体の cDNA より発現した蛋白質は野生型の *EHD1* を発現させたものより短いことが確認された。しかし *snapin* との結合の有無に関しては確認することができなかった。

【考察】

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が高い。そして、79 トリオのエクソーム解析は、双極性障害としては世界初のものである。唾液サンプルによる遺伝子解析は黎明期であるが、本研究により精神疾患においてもエクソーム解析が問題なく行えることが証明され、将来的なサンプル収集の可能性が広がった。

一人あたりの平均デノボ SNV の個数は、既報の自閉症スペクトラムや非罹患同胞、統合失調症のデータと一致する結果であった。DAVID によりエンリッチメントを認めた GO タームの中には GWAS 等で双極性障害と関連すると報告されているカルシウムイオン関連パスウェイのタームを認め、先行研究のカルシウムイオンと疾患の関連を支持した。

また、今回我々が確認した CNV は、双極性障害関連として報告されている 3q29 内領域より 1.3 Mbp 程度上流に存在し、関連の可能性はある。

今後の展望として、更なるサンプルサイズの増加による本結果の洗練または再現が望まれる。また、今回同定された 71 のデノボ SNV の中でより変異の影響が強力である Loss of function 変異等について、iPS 細胞・動物モデルなどの機能モデルを作製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。

(3998 文字)