

論文の要旨

論文題目 双極性障害家系のゲノム解析

氏 名 的場 奈々

背景

双極性障害（Bipolar Disorder [BD]）は、躁状態とうつ状態が繰り返しおこる精神疾患であり、躁状態の重症度により I 型と II 型に分類される。米国及び本邦における生涯有病率は約 1%とされている。

一卵性及び二卵生双生児を対象とした研究で BD の広義の遺伝率は約 85%にのぼることが示され、家系解析からも、罹患同胞がいる場合の発症リスクは 18-19 倍高くなると報告された。このため、ゲノムワイド関連解析（GWAS）など遺伝学的解析が多数行われ、*CACNA1C* などの遺伝子上の頻度の高い一塩基多型（SNP）と BD との関連が示唆されている。しかしながら、それらの SNP の効果量は小さく（ほとんどがオッズ比（=O.R.）1.2 未満）、また全ての common SNP を考慮しても遺伝率を完全に説明することができていない。

次世代シーケンサの登場により、稀な変異や *de novo* 変異の同定が可能となり、自閉症スペクトラム障害や統合失調症では、*de novo* 変異を対象とした研究で成果をあげている。しかし、BD 患者を対象とした *de novo* 変異の研究報告例はない。さらに、2015 年には、41 家系 200 人の BD 家系の全ゲノム解析の成果が報告され、ニューロンの興奮性に関わる遺伝子上の稀な変異が BD 患者で多いことが示された。

そこで本研究では、BD 患者および非罹患の両親（トリオ）についてエクソーム解析を行い、*de novo* 変異や両親から子に伝達される稀な変異と BD との関連性について検討した。

サンプル収集およびシーケンス

本研究は、国立研究開発法人理化学研究所 研究倫理第一委員会および山口大学倫理委員会において承認のもと実施した。

DNA サンプルは、双極性障害研究ネットワークニュースレター等を通してリクルートした参加者よりご提供いただいた。本研究への参加条件は、1) 精神科医によって「双極性障害」あるいは「躁うつ病」と診断されたことがあり、2) 構造化面接（M.I.N.I.）により双極 I 型障害あるいは II 型障害と診断され、3) 両親が健在で、患者本人と両親のインフォームドコンセントが得られた者とした。本研究では、孤発家系（診断時点で両親のどちらにも BD あるいは統合失調症の診断がなされない場合）の 79 家系について解析を実施した。

両親および患者の唾液あるいは血液からゲノム DNA を抽出し、SureSelect^{XT} Human All Exome V4 または V5 (+mitochondria) のキットを用いてエクソン領域の濃縮を行った。各ライブラリは HiSeq2000/2500 により 101bp のペアエンド方式によりシーケンスした。

ターゲット領域の平均カバレッジは 65.16, トリオ全員が 20 リード以上カバーできている領域は全体の 88.9%であった。

De novo 変異の同定

リファレンス配列として GRCh37+decoy を用い, GATK にて一塩基置換, 挿入欠失変異のコールを行った。コピー数変異 (copy number variation [CNV]) は CoNIFER, XHMM の 2 つのソフトウェアを用いてコールし, オーバーラップしたもののみを採用した。アノテーションに用いたトランスクリプトは Ensembl データを参照した。dbSNP138 等の公共データに登録されている変異で頻度の高いもの (Minor Allele Frequency [MAF] >0.01) および, 本研究における BD 患者または統合失調症に罹患しておらず血縁関係のない両親 158 名のうち複数に見られた変異は除外した。

最終的にバリデーションされた変異 (特に *de novo* 点変異) に関する検討事項を以降に示す。

Loss-of-Function および Protein-Altering 型の *de novo* 変異

自閉症スペクトラム障害等の精神神経疾患の研究において, 患者が非罹患同胞に比べて機能喪失型 (Loss-of-Function [LoF]) やアミノ酸配列に影響を与えるタイプ (Protein-Altering [PA]) の *de novo* 変異を多くもっていることが報告されていることから, BD 患者での *de novo* 変異のタイプについて検討した。

De novo LoF および PA 変異の個数を, 機能的影響が少ないと予想される *de novo* synonymous 変異の個数によって標準化し, 健常対照群 (自閉症スペクトラム患者の非罹患同胞) と比較したところ, LoF 及び PA 型の変異が BD 患者群で多い傾向が得られた (LoF : $p=0.244$, O.R.=1.48 ; PA : $p=0.233$, O.R.=1.30)。

また, 双極性スペクトラムの一つに分類され, 気分エピソードと気分症状を伴わない精神病症状の両方を呈する疾患である統合失調感情障害の患者の *de novo* 変異リストを 2012 年 Xu らの論文および 2014 年 McCarthy らの論文から取得し, 統合解析を行ったところ, 激しい躁うつ状態を伴う双極 I 型障害と, 統合失調感情障害患者を合わせた罹患群では, 健常対照群と比較して有意に LoF, PA 型の *de novo* 変異が多く含まれていた (LoF : $P=0.030$, O.R.=2.30 ; PA : $P=0.021$, O.R.=1.87)。

BD 患者と統合失調感情障害患者がもつ *de novo* 変異の入った遺伝子に重複はみられなかったが, *KMT2C* や *MACF1* などの遺伝子には, 統合失調症でも PA 型の *de novo* 変異もつ症例が認められた。これらは, 遺伝リスクを共有するとされる BD と統合失調症などの疾患から構成される, 気分—精神病スペクトラム障害と関連する遺伝子の候補になると推測される。

Protein-Altering 型の *de novo* 変異の遺伝子オントロジー解析

次に, 前項において特に有意な結果を示した双極 I 型障害患者と統合失調感情障害の PA 型の *de novo* 変異 ($n = 75$) をもつ遺伝子のオントロジー解析を行った。DAVID (The Database for Annotation,

Visualization and Integrated Discovery) knowledgebase より, Ensembl ID をキーとして Biological Process, Cellular Component, Molecular Function のカテゴリに属するオントロジータームを抽出し, エンリッチメント解析を実施したところ, “GO: 0005509 calcium ion binding”を含む 10 個のタームに *de novo* PA 変異をもつ遺伝子が有意に多く含まれた.

さらに, 上記の 10 個のタームについて, 健常対照群のデータを使用したシミュレーション解析を実施した. ここでは, 自閉症スペクトラム障害患者の非罹患同胞がもつ *de novo* PA 変異 ($n = 1,147$) からランダムにとりだした 75 個のデータセット 10,000 組について, 当該タームが実測値より多く含まれる数を計測し, 有意差の有無を求めた. その結果, 上述 calcium ion binding のタームに関連する遺伝子に, 双極 I 型障害または統合失調感情障害の患者がもつ *de novo* 変異が有意に ($P < 0.05$) 多いことを確認した.

両親から受け継いだ稀な変異についての検討

カルシウムシグナリング経路が BD の病態における key factor であるというこれまでの報告, 及び *de novo* PA 型変異のオントロジー解析でカルシウムイオン結合に関わる遺伝子群のエンリッチメントを認めたことを受け, 両親における singleton (79 トリオの両親 [=158 人] に 1 アリルしかないもの) PA 変異の発端者への伝達パターンについて, 特にカルシウムに注目して GO 解析を行った.

DAVID に登録されている“calcium”という語を含む 115 個の GO タームについて, 偶然よりも多い個数の GO タームで, singleton PA 変異の有意な過剰伝達が BD 患者にみられるかどうかを検討した. その結果, 双極 II 型障害で, 5 つのカルシウム関連の GO で singleton PA 変異の有意 ($P < 0.05$) な過剰伝達を認めた. この GO の数は偶然よりも多い個数であった. 一方, 双極 I 型障害患者, 健常対照群 (自閉症スペクトラム患者の非罹患同胞) では有意な過剰伝達を認めなかった.

総論

本研究では, 79 家系の BD 弧発家系のエクソーム解析を行い, 一人あたり 0.89 個の *de novo* 変異を同定した.

双極 I 障害患者および統合失調感情障害患者のもつ *de novo* 変異は, LoF, PA 型の変異を有意に多く含んでおり, オントロジー解析の結果, これらの変異をもつ遺伝子ではカルシウムイオン結合に関わるものがエンリッチしていた. 一方, 両親がもつ稀な変異についての患者への伝達パターンを検討したところ, カルシウムイオン関連遺伝子上の稀な PA 型変異が, 双極 II 型障害患者では有意に遺伝していることがわかった.

本研究を通して, common な変異だけでなく, *de novo* 変異を含む稀な変異が双極性障害の遺伝的リスクとなり, さらにカルシウムシグナルが重要な因子であるということが示唆されたが, recurrent な変異・遺伝子の探索などを含め, 効果量の大きな変異・遺伝子を同定するためにも, 独立サンプルの検証, サンプル数を増やしたコホートでの研究を今後進めていきたい.