

博士論文（要約）

双極性障害家系のゲノム解析

的場 奈々

## 背景

---

双極性障害は、躁状態とうつ状態を繰り返す精神疾患であり、躁状態の重症度により I 型と II 型に分類される。本邦における生涯有病率は約 1%とされている<sup>1,2</sup>。

一卵性及び二卵生双生児を対象とした研究で双極性障害の広義の遺伝率は約 85%にのぼること<sup>3-5</sup>、家系解析からは罹患同胞がいる場合に第一度近親者の発症リスクが 18-19 倍高くなることが<sup>6,7</sup>報告されている。このような疫学研究から、遺伝要因が双極性障害の発症リスクになることが示唆され、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) やコピー数変異 (CNV) 解析等の遺伝学的解析が多数行われてきた<sup>8-10</sup>。しかしながら、これまでのところ疾患をロバストに説明できるような因子は同定されておらず、遺伝的メカニズムは未だ解明されていない。

近年、次世代シーケンサの登場により、ゲノムワイドに稀な変異を検出することが可能となった。双極性障害においても、多発家系を対象とした研究で関連が示唆される稀な変異が報告されてきている<sup>11,12</sup>。一方、双極性障害と遺伝学的背景を共有していると考えられる統合失調症<sup>13,14</sup>や自閉症スペクトラム障害<sup>15,16</sup>では、*de novo* 変異と疾患の関連が報告されている。双極性障害における *de novo* 変異の研究は、CNV を対象として行われており<sup>17,18</sup>、一塩基置換 [SNV] や挿入欠失 [INDEL] といった点変異の解析は行われていない。

本研究では、双極性障害患者および非罹患の両親 (トリオ) を対象にエクソーム解析を行い、双極性障害患者でみられる *de novo* 変異や非罹患の両親から子に伝達される稀な変異と双極性障害との関連性について検討した。

## 解析対象

---

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。

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.)<sup>19</sup> 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。

構造化面接では、うつや躁状態エピソードの期間や程度の質問に「はい」または「いいえ」等で答えることで診断がおこなわれる。この診断は精神科医による電話インタビューの形式で実施した。

収集した家系のうち、孤発家系 (診断時点で両親のどちらにも双極性障害あるいは統合失調症の診断がなされない) 79 家系について以降の解析を行った。

また、比較解析用に、表 1 に示した既報の自閉症スペクトラム障害患者とその非罹患同胞、統合失調感情障害患者、統合失調症患者の解析データ (*de novo* 変異リスト, FastQ データ) を入手した。

表 1：本研究で使したデータ一覧

データセット	トリオ数
双極性障害（本研究）	79 (I型：56；II型：23)
自閉症スペクトラム障害 <sup>16</sup>	2,508
自閉症スペクトラム障害患者の非罹患同胞 <sup>16</sup>	1,911
統合失調感情障害 <sup>20,21</sup>	64
統合失調症 <sup>21-25</sup>	944
自閉症スペクトラム障害患者の非罹患同胞 <sup>26</sup>	31

## シーケンスおよびデータ処理

ゲノム DNA は、両親および患者の唾液あるいは血液から抽出し、Covaris S2 (Covaris Inc., Woburn, MA, USA)による超音波照射により 150bp に断片化した。ライブラリ調整には SureSelect<sup>XT</sup> Human All Exome V4 または V5 (+mitochondria) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) のキットを用いた。シーケンスは HiSeq2000/2500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) を使用し、101bp のペアエンド方式でシーケンスした。

シーケンスにより得られた塩基配列（リード）は、FASTX-Toolkits ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)) の FASTQ Quality Filter によりクオリティの低いもの (Q20 未満の塩基配列がリードの 20%を超えるもの) を除き、bwa<sup>27</sup> mem を用いてリファレンス配列 (GRCh37+decoy) にマッピングした。Picard (<http://picard.sourceforge.net/>) により重複リードを除外したのち、GATK<sup>28</sup> の IndelRealigner 機能を用いて INDEL 領域の再アライメント (GATK) を行った。再アライメント対象の領域として、既知のサイト (1KG phase 1 indels, Mills and 1000G Gold standard) のほか、各家系 (トリオ) 毎のプライベートサイトを設定した。

SNV および INDEL は、GATK UnifiedGenotyper を用いてトリオ毎にコールし、GATK のベストプラティクス<sup>29</sup> にそって、クオリティの低い変異を除外した。

CNV はシーケンスリードの depth 情報をもとに、CoNIFER<sup>30</sup>、XHMM<sup>31,32</sup> の 2 つのソフトウェアを用いてコールした。偽陽性を防ぐため、両ソフトウェアで共通してコールされ、エクソームのターゲット領域 (SureSelect の probe ターゲット) が少なくとも 3 箇所含まれる領域を抽出した。

得られたリードの平均 depth は 65.16 で、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。

SNV、INDEL は ANNOVAR<sup>33</sup> により機能注釈付けし、dbSNP138、ExAC 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、本研究における双極性障害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。

## 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<sup>16,20,21,23,24</sup>。

双極性障害患者での *de novo* 変異のタイプ別の割合について検討するため、79 家系で同定した LoF 型, PA 型の *de novo* 点変異の個数(それぞれ 9 個, 56 個)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 型の変異が双極性障害患者群で多い傾向にあった。

次に、検出力をあげるため、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 64 人分の *de novo* 変異リストを 2012 年 Xu らの論文<sup>20</sup> および 2014 年 McCarthy らの論文<sup>21</sup> から取得し、統合解析を行った。その結果、双極性障害の中でもより重症型の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 LoF, PA 型の *de novo* 変異が有意に多く含まれていた (LoF :  $P=0.030$ , O.R. = 2.30 ; PA :  $P=0.021$ , O.R. = 1.87) 。

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

---

次に、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 ( $n = 75$ ) をもつ遺伝子の特徴を調べるため、オントロジー解析を行った。

DAVID<sup>34,35</sup> (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” (関連遺伝子 11 個,  $P=0.0035$ ) を含む 10 個のターム (カテゴリ) 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、10 個のカテゴリについて、遺伝子サイズ等によるバイアスを考慮したシミュレーション解析を実施した。まず、自閉症スペクトラム障害患者の非罹患同胞<sup>16</sup> がもつ PA 型の *de novo* 変異 ( $n = 1,147$ ) からランダムに抽出した 75 個のデータセットを 10,000 組用意した。次に、該当するカテゴリが実測値より多く含まれる回数を計測し、統計的有意差の有無を確認した。その結果、上述の calcium ion binding の GO タームを含む 7 つの GO 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

---

双極性障害が多因子疾患であること<sup>8</sup>や、高い遺伝率を説明するための要因として、*de novo* 変異だけではなく、両親のもつ変異の継承が考えられる。

特に、カルシウムシグナリング経路が双極性障害の病態における key factor であるというこれまでの報告<sup>36-39</sup>、および *de novo* PA 型変異のオントロジー解析の結果を受け、カルシウムに関わる 115 個の GO のカテゴリに属する遺伝子上の PA 型 singleton 変異の伝達パターンについて検討した。

まず、両親のもつ singleton 変異を、子への伝達の有無 (transmitted:  $n=2,572$ ; untransmitted:  $n=2,592$ ) で分類した。Transmitted 変異の数と untransmitted の数の比率は、LoF 型、LoF を除く PA 型、Synonymous 変異いずれも差を認めなかった。

次に、各 GO カテゴリに属する遺伝子に変異が生じていた場合に、Transmitted/untransmitted 別にその個数を計測、二項検定により伝達パターンに偏りがないかを評価した。

*De novo* 変異の解析では、重症型躁状態を伴う双極 I 型患者で "calcium binding" との関連を認めたが、inherited 変異ではその傾向は見られなかった。

一方、軽躁状態のみを伴う双極 II 型障害患者の非罹患両親がもつ PA 型の singleton 変異は、5 つのカルシウム関連の GO カテゴリで過剰伝達を認めた ( $P < 0.05$ )。これは、同様に解析した健常対照群<sup>7</sup>では認めなかった。

## 総論

---

本研究では、79 組の双極性障害弧発家系のエクソーム解析を行い、71 個の *de novo* 点変異を同定した。

双極スペクトラム障害（特に重症型である双極 I 障害および統合失調感情障害）の疾患リスクに PA 型の *de novo* 変異が寄与しており、それらの *de novo* 変異をもつ遺伝子や双極 II 型患者の非罹患の両親がもつ稀な変異が、カルシウムに関わる遺伝子上に多く含まれることを明らかにした。

## 参考文献

---

1. Merikangas, K. R. *et al.* Lifetime and 12-month prevalence of bipolar spectrum disorder in the National Comorbidity Survey replication. *Arch. Gen. Psychiatry* **64**, 543–52 (2007).
2. 川上憲人. 精神疾患の有病率等に関する大規模疫学調査研究: 世界精神保健日本調査セカンド. (2014).
3. McGuffin, P. *et al.* The heritability of bipolar affective disorder and the genetic relationship to unipolar depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **60**, 497–502 (2003).
4. Bienvenu, O. J., Davydow, D. S. & Kendler, K. S. Psychiatric ‘diseases’ versus behavioral disorders and degree of genetic influence. *Psychol. Med.* **41**, 33–40 (2011).
5. Tenesa, A. & Haley, C. S. The heritability of human disease: estimation, uses and abuses. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 139–49 (2013).
6. Gershon, E. S. *et al.* Transmitted factors in the morbid risk of affective disorders: A controlled study. *J. Psychiatr. Res.* **12**, 283–299 (1975).
7. Tsuang, M. T., Winokur, G. & Crowe, R. R. Morbidity risks of schizophrenia and affective disorders among first degree relatives of patients with schizophrenia, mania, depression and surgical conditions. *Br. J. Psychiatry* **137**, 497–504 (1980).
8. Baum, A. E. *et al.* A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **13**, 197–207 (2008).
9. Ferreira, M. a R. *et al.* Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat. Genet.* **40**, 1056–8 (2008).
10. Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat. Genet.* **43**, 977–83 (2011).
11. Cruceanu, C., Alda, M. & Turecki, G. Lithium: a key to the genetics of bipolar disorder. *Genome Med.* **1**, 79 (2009).
12. Ament, S. A. *et al.* Rare variants in neuronal excitability genes influence risk for bipolar disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 3576–81 (2015).
13. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* **381**, 1371–1379 (2013).
14. Lichtenstein, P. *et al.* Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet* **373**, 234–9 (2009).

15. O’Roak, B. J. *et al.* Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat. Genet.* **43**, 585–9 (2011).
16. Iossifov, I. *et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**, 216–221 (2014).
17. Malhotra, D. *et al.* High frequencies of de novo CNVs in bipolar disorder and schizophrenia. *Neuron* **72**, 951–63 (2011).
18. Green, E. K. *et al.* Copy number variation in bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* (2015). doi:10.1038/mp.2014.174
19. Sheehan, D. V *et al.* The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J. Clin. Psychiatry* **59 Suppl 2**, 22–33;quiz 34–57 (1998).
20. Xu, B. *et al.* De novo gene mutations highlight patterns of genetic and neural complexity in schizophrenia. *Nat. Genet.* **44**, 1365–9 (2012).
21. McCarthy, S. E. *et al.* De novo mutations in schizophrenia implicate chromatin remodeling and support a genetic overlap with autism and intellectual disability. *Mol. Psychiatry* **19**, 652–8 (2014).
22. Fromer, M. *et al.* De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* **506**, 179–84 (2014).
23. Girard, S. L. *et al.* Increased exonic de novo mutation rate in individuals with schizophrenia. *Nat. Genet.* **43**, 860–3 (2011).
24. Gulsuner, S. *et al.* Spatial and temporal mapping of de novo mutations in schizophrenia to a fetal prefrontal cortical network. *Cell* **154**, 518–29 (2013).
25. Takata, A. *et al.* Loss-of-function variants in schizophrenia risk and SETD1A as a candidate susceptibility gene. *Neuron* **82**, 773–80 (2014).
26. O’Roak, B. J. *et al.* Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat. Genet.* **43**, 585–9 (2011).
27. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–60 (2009).
28. McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–303 (2010).
29. DePristo, M. a *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **43**, 491–8 (2011).

30. Poultney, C. S. *et al.* Identification of small exonic CNV from whole-exome sequence data and application to autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 607–19 (2013).
31. Fromer, M. & Purcell, S. M. Using XHMM Software to Detect Copy Number Variation in Whole-Exome Sequencing Data. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* **81**, 7.23.1–7.23.21 (2014).
32. Fromer, M. XHMM: discovery and genotyping of copy number variation ( CNV ) from exome read depth Copy number variation ( CNV ).
33. Wang, K., Li, M. & Hakonarson, H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **38**, e164 (2010).
34. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009).
35. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. a. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
36. Berridge, M. J., Downes, C. P. & Hanley, M. R. Neural and developmental actions of lithium: A unifying hypothesis. *Cell* **59**, 411–419 (1989).
37. Mikoshiba, K. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 86–89 (1993).
38. Mühleisen, T. W. *et al.* Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nat. Commun.* **5**, 3339 (2014).
39. Sklar, P. *et al.* Whole-genome association study of bipolar disorder. *Mol. Psychiatry* **13**, 558–569 (2008).