

博士論文（要約）

Genome- and Epigenome-Wide Association Studies of

Panic Disorder in the Japanese Population

（日本人におけるパニック症の

ゲノム・エピゲノムワイド関連解析）

杉本（嶋多）美穂子

論文の内容の要旨

論文題目 Genome- and Epigenome-Wide Association Studies of Panic Disorder in the Japanese Population

(日本人におけるパニック症のゲノム・エピゲノムワイド関連解析)

氏名 杉本（嶋多） 美穂子

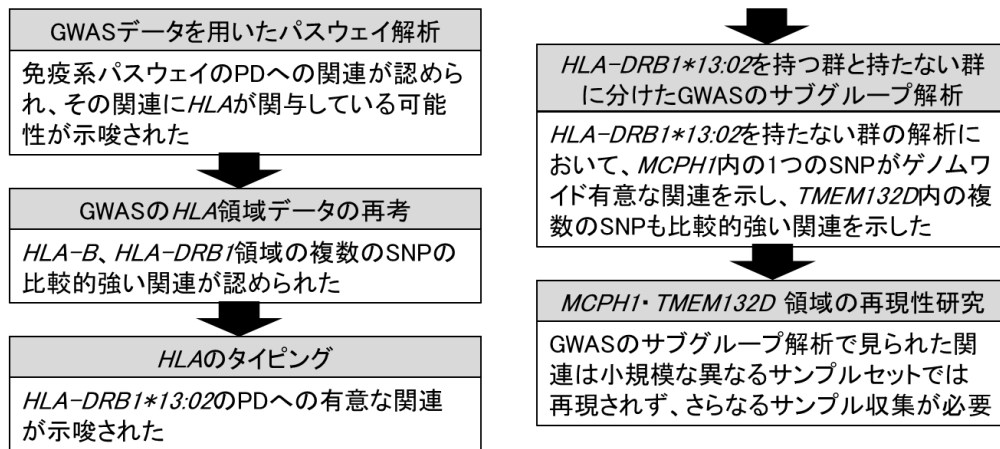
【研究の背景】

本研究が対象とするパニック症（PD）は不安障害の一つであり、一旦発症すると強い不安感のために日常生活に支障をきたす疾患である。パニック症の生涯罹患率は2-2.5%と高率であり、その社会的負荷は大きい。パニック症には遺伝要因が関連しており、遺伝率は約40%と推定されている。候補遺伝子アプローチを用いた先行研究で報告されている遺伝要因は、再現性が得られるものに乏しい。ゲノム全域にわたり配置された単一塩基多型（SNP）を用いて、遺伝要因を網羅的に探索するゲノムワイド関連解析（GWAS）からは、ヨーロッパ系集団におけるリスク遺伝子、*TMEM132D* が同定・再現されているものの、日本人での再現性は得られていない。そこで我々はすでに日本人のパニック症に関するGWASを実施し、特に強い関連を示すSNPに着目した解析を行い、*BDKRB2* といった遺伝子が疾患と関連する可能性を見出した。しかしながら、これら以外にも明らかになっていない遺伝要因が存在すると推察されたため、さらなる遺伝要因を探索するべくGWASのデータを用いたゲノム研究を実施した（第一部）。さらにパニック症の発症には遺伝要因と環境要因ともに重要であることから、代表的なエピジェネティクスのメカニズムの一つであるDNAのメチル化についてゲノムワイドな探索を実施した（第二部）。

【第一部：GWASデータを用いたパニック症の新たな遺伝要因の探索】

これまでの多くのGWAS研究では、関連解析の結果特に低いP値を示すSNPに着目した解析が実施されてきた。しかし実際には、個々のオッズ比が小さいSNPでもそのようなSNPの影響が複数合わさって疾患に関連している可能性がある。そこで本研究ではパニック症のGWASの結果を用いて、複数のSNPの機能的な組み合わせに着目したパスウェイ解析を実施した。

<研究の方法・結果>



上図のような流れで研究を実施した。初めに GWAS データを用いたパスウェイ解析を実施し、免疫系パスウェイのパニック症への関連を同定した。これら免疫系のパスウェイの関連にはヒト白血球抗原 (*HLA*) が寄与している可能性があるとの結果が得られたことから、GWAS の *HLA* 領域のデータを再検証した。その結果、*HLA-B* と *HLA-DRB1* 領域の複数の SNP がゲノムワイド有意ではないものの比較的高い関連 ($P < 1 \times 10^{-4}$) を示したため、これら 2 つの *HLA* 遺伝子についてアリル頻度を決定し関連解析を実施した。その結果、パニック症で *HLA-DRB1*13:02* の頻度が有意に高くなっているという結果を得た (パニック症: $N = 744$, control: $N = 1418$, $P = 2.50 \times 10^{-4}$, odds ratio (OR) = 1.54)。

先行研究から *HLA* が関与している疾患においては、その関連する *HLA* アリルを持つ患者と持たない患者で表現型や遺伝的背景が異なる可能性があるとして報告されている。そこでそのような可能性について探索することを目的とし、パニック症と関連が認められた *HLA-DRB1*13:02* の有無で GWAS データを層別したサブグループ解析を実施した。*HLA-DRB1*13:02* を持たない群での解析の結果、*MCPHI* 遺伝子内の 1 つの SNP がゲノムワイド有意な関連を示した (パニック症: $N = 438$; control: $N = 1,341$, $P = 4.23 \times 10^{-8}$, OR = 1.61)。さらに、ヨーロッパ系集団で遺伝要因として同定されている *TMEM132D* 内の複数の SNP が日本人においても関連する傾向を示した。一方、これらの SNP は *HLA-DRB1*13:02* を持つ群の解析においては関連を示さなかった。これらの結果の再現性を確認するため、さらに異なるサンプルセット (現在収集途中) を用いた再現性研究を暫定的に実施した。*MCPHI* 並びに *TMEM132D* 領域について、SNP imputation の結果その領域内で最も強い関連を示す SNP を対象としてタイピング・関連解析を実施した。その結果、現在のサンプルセットでは GWAS のサブグループ解析で認められた関連を再現することができなかった。

<考察と結論>

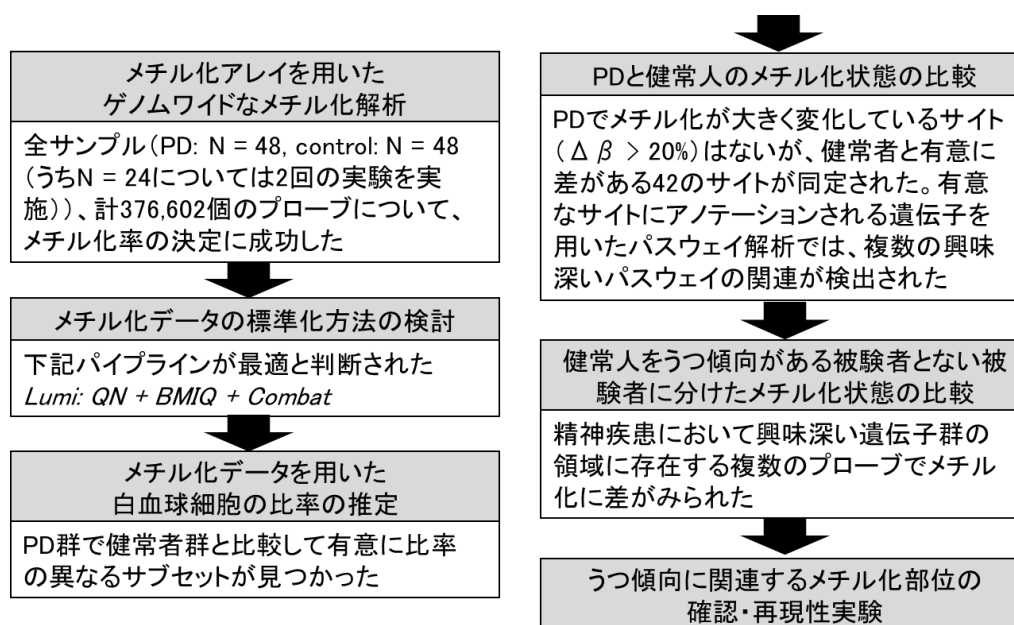
本研究は管見によればパニック症と *HLA* の関連についての初めての報告である。パニック症

と免疫系の関連を示唆する先行研究は少ないが、近年、統合失調症や双極性障害といった他の精神疾患と免疫系、特に *HLA* との関連が多数報告されている。*HLA* を含む免疫系がどのようにパニック症と関連しているかを明らかにするには、他集団のサンプルを用いた *HLA* の関連の探索や *HLA* の機能解析など、さらなる研究が必要である。さらに *HLA-DRB1*13:02* の有無でサンプルを分けた層別解析の結果、*HLA-DRB1*13:02* を持たない群において *MCPHI* 領域や *TMEM132D* 領域の SNP の関連が認められた。*MCPHI* は小頭症に関連する遺伝子として報告されており、*TMEM132D* は白人集団でパニック症に関連する遺伝子として同定されていることから、本研究の結果は興味深い。*MCPHI* ならびに *TMEM132D* 領域内の SNP の関連は小規模なサンプルセットで暫定的に実施した解析では再現されなかったが、今後さらにサンプルを増やした解析を実施していきたい。

【第二部：パニック症のエピゲノムワイド関連解析】

パニック症は遺伝要因と環境要因が相互に作用し合い発症にいたっていると考えられる。DNA メチル化は環境要因によっても変化することが報告されており、精神疾患と関連している可能性があると考えられている。そこでパニック症に関連する DNA メチル化部位を網羅的に探索するためにゲノムワイドメチル化解析を実施した。さらにサブ解析として、健常者のうつ傾向のゲノムワイドメチル化解析も実施した。

<研究の方法・結果>



ゲノムワイドメチル化解析には、メチル化アレイ (Infinium® Human Methylation 450K BeadChip) を使用し、パニック症 48 例、健常者 48 例 (うち 24 例については同一サンプルで 2 回の実験を実施) のメチル化を探索した。解析対象とした全サンプル、計 376,602 個のプロープについて、

メチル化率 (β 値 ($0 \leq \beta \leq 1$)) の決定に成功した。メチル化アレイについては、実験で得られるデータの適切な標準化が必須であることが報告されているが、最適な標準化パイプラインを決定した先行研究は乏しい。そこで、初めに 1 サンプルにつき 2 回アレイの実験を繰り返した結果を利用し、最適と思われる標準化の方法 (Lumi: QN+BMIQ+Combat) を決定した。次にメチル化のデータから白血球細胞のサブセットの比率を推定しパニック症群と健常者群の比較を行った。その結果、パニック症群で健常者群と比較して有意に比率の異なるサブセットが見つかった。

次に、パニック症と健常者のメチル化率の比較を実施したところ、パニック症と健常者でメチル化率の大きな差異があるサイト ($\Delta \beta > 20\%$) は検出されなかったが、統計学的には有意に差がある 42 のサイトが同定された。これら有意なサイトにアノテーションされる遺伝子を用いたパスウェイ解析では、16 のパスウェイがパニック症に関連する可能性があるとの結果が得られた。

また、上記パニック症の解析に加え、副次的な解析として健常者をうつ傾向の尺度である CES-D を用いて、うつ傾向の高い群と低い群の 2 群に分け、メチル化に違いのあるサイトがあるかを探索した。その結果、複数の CpG サイトが関連する傾向を示した。さらに以下の条件 (P 値 < 0.05 かつメチル化の差 $> 5\%$) を満たすプローブの多く (15/369) が脳神経系との関連が報告されている遺伝子群の領域に存在するという結果が得られた。以上の結果からこれらの関連が見られた領域に存在し、最も強い関連を示す CpG サイトについてパイロシーケンス法を用いて確認・再現性実験を実施した。

<考察と結論>

本研究はパニック症における DNA メチル化を網羅的に探索した初めての研究である。パニック症において DNA のメチル化率が健常人と大きく異なっている部位はないものの、興味深いパスウェイ上の遺伝子領域のメチル化の小さな差異が、複数合わさって疾患に関連している可能性が示唆された。このような小さな差異を伴うメチル化部位が多数疾患に関連している可能性があるという結果は、統合失調症や大うつ病など他の精神疾患でも報告されている。本研究での再現性研究に用いたサンプルセットは例数が少なかったため、今後さらにサンプルを増やした解析も有用である可能性がある。