

論文内容の要旨

論文題目 コピー数多型および一塩基多型の全ゲノム関連解析による
 日本人パニック障害の疾患感受性遺伝子の探索

指導教員 笠井 清登 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

氏名 河村 代志也

1. 序文

パニック障害 (PD) とは, パニック発作等を示す精神障害であり, 家族研究や双生児研究から遺伝的関与が想定されている。本研究では, マイクロアレイを利用し, 補完法 (imputation) による一塩基多型 (SNP) の全ゲノム関連研究 (GWAS) とメタ解析を行い, また, コピー数多型 (CNV) の GWAS を行った。

2. 方法

2. 1. 対象は, PD 患者 595 名と対照 626 名からなる日本人 1,221 名であり, 診断には MINI 精神疾患簡易構造化面接法を用いた。このうち, 合併症のない PD 患者は 265 名であった。また, メタ解析に用いる Otowa ら (2009) の対象は, PD 患者 200 名と対照 200 名の日本人 400 名であった。

本研究は, 東京大学大学院医学系研究科ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の承認 (No. 639) を受け, 書面による説明同意を行った上で実施した。

2.2. SNP 遺伝子型決定および CNV 検出

末梢白血球から分離精製した DNA を Genome-Wide Human SNP array 6.0 にハイブリッドさせ、Birdseed と PennCNV で CNV を検出した。

2.3. 品質管理 (QC)

2.3.1. サンプル品質管理

対象あたりの SNP 遺伝子型決定成功率 (CR) < 0.95, 3 型の SNP 遺伝子型の判別度合 (CQC) < 0.4, 不明確な性別, 重複サンプルや第一度・第二度近親, 日本人集団からの逸脱, および, 対象あたりの CNV 数 = 1,000 に該当する対象を除外した。

2.3.2. SNP データ・クリーニング

SNP あたりの CR < 0.95, 劣性対立遺伝子頻度 (mAF) < 0.01, ハーディ・ワインバーグ平衡検定の P 値 (P -HWE) < 0.001, Y 染色体の SNP を除外した。

2.3.3. CNV データ・クリーニング

CNV 長 < 100 Kb, 信頼性得点 (LOD) < 10, CNV あたりのプローブ数 < 10, X 染色体と Y 染色体の CNV を除外した。また, Birdsuite と PennCNV による CNV 検出一致率 > 0.90 の common CNV クラスタ, および, 共通領域に 2 つ以上のプローブが存在しない common CNV クラスタを除外した。

2.4. 統計解析

SNP GWAS では, 患者群と対照群の間の SNP の対立遺伝子 (allele) の頻度の違いを χ^2 -test によって検定した。その際, HapMap データを利用した combined imputation and association analysis を行った。性染色体については女性の X 染色体 SNP のみを解析した。サブグループ解析では, 合併症のない患者群と対照群の間の同様の SNP GWAS を行った。

SNP メタ解析では, fixed-effects model か random-effects model を採用した。

CNV GWAS では, CNV を rare CNV と common CNV に分類した上で, rare CNV には global burden analysis を行い, common CNV には, 重なる CNV を同一クラ

スターとみなした上で、患者群と対照群の間の GWAS を実施した。サブグループ解析では、合併症のない患者群と対照群の間の同様の CNV GWAS を行った。

すべての統計解析には PLINK software version 1.07 を用いた。

3 . 結果

3 . 1 . 品質管理の結果

サンプル QC によって計 60 名が除外された。残った 1,161 名の対象は、患者群 560 名と対照群 601 名であった。また、常染色体の 632,902 SNPs と X 染色体の 22,887 SNPs , および , 3,855 DELs と 4,763 DUPs の CNV がデータ・クリーニングを通過した。

サブグループ解析では、合併症のない患者群 265 名が品質管理を通過し、常染色体 632,867 SNPs , X 染色体 22,881 SNPs , および , 2,872 DELs と 3,707 DUPs の CNV がデータ・クリーニングを通過した。

メタ解析では、Otowa ら (2009) の患者群 177 名と対照群 178 名が品質管理を通過し、常染色体 309,128 SNPs と X 染色体 6,589 SNPs の共通 SNP がデータ・クリーニングを通過した。

3 . 2 . 補完法による SNP 全ゲノム関連解析

Combined imputation and association analysis によって、43 SNPs (サブグループ解析では 22 SNPs) が $P < 10^{-4}$ の範囲に見出された。PD 感受性遺伝子の候補を得るための候補 SNP を $P < 10^{-5}$ の範囲から選択したところ、 $P = 9.7 \times 10^{-6} \sim 5.7 \times 10^{-7}$ の範囲の 4 つの候補 SNP (部位) (rs6693836 (1q25.3) , rs11118918 (1q32.2) , rs17116165 (5q33.2) , rs6033574 (20p12.1)) が選択された。

3 . 3 . CNV 全ゲノム関連解析

Rare CNV には 383 DELs と 683 DUPs が、common CNV には 2,858 DELs と 2,974 DUPs が見出された。Common CNV は 32 DEL クラスタと 43 DUP クラスタを構成し、DEL・DUP 合計 CNV の 15 クラスタ、DEL の 15 クラスタ、DUP の 4 クラスタが CNV 検出一致率 > 0.90 を満たした。サブグループ解析では、rare CNV には 281 DELs と 514 DUPs が、common CNV には 2,092 DELs と 2,401 DUPs が見出され、common CNV は 28 DEL クラスタと 45 DUP クラスタを

構成し、DEL・DUP 合計 CNV の 14 クラスター、DEL の 11 クラスター、DUP の 8 クラスターが一致率 > 0.90 を満たした。

Rare CNV に対する global burden analysis の結果、DEL・DUP 合計 CNV、DEL、DUP について、患者対照間で、対象あたりの rare CNV 数の割合 (RATE) や rare CNV を持つ対象数の割合 (PROP) に有意差はみられなかった。

Common CNV クラスター GWAS の結果、DEL・DUP 合計 CNV で、部位 p11.2 ($P = 6.1 \times 10^{-3}$) と q13.32-q13.33 ($P = 7.1 \times 10^{-3}$) の 2 クラスターを見出し、候補 common CNV クラスターとした。

4. 考察

4.1. 品質管理に対する附言

Log quantile-quantile P -value plot (QQ plot) によれば genomic inflation factor (?) = 0.929 であり、QC 後の対象に集団構造化の影響は少ないと見積もられた。

4.2. SNP 解析による候補遺伝子

4 つの候補 SNP のうち、rs6693836 は 100 Kb 以内の近傍に遺伝子を持たなかった。Rs11118918 の 11 Kb 近傍には、遺伝子 *CD34* が存在した。

Rs17116165 は、遺伝子 *SAP30L* (SAP30-like) の 3' 端非翻訳領域 (3' UTR) に位置した。*SAP30L* の 3' UTR に存在する SNP が microRNA (miRNA) による翻訳調節機構に影響を及ぼし、このため蛋白 *SAP30L* が構成するヒストン脱アセチル化酵素複合体 (HDAC) の合成も影響を受け、結果的に HDAC が他の遺伝子を転写する効率に影響を与える可能性が推察された。

Rs6033574 は遺伝子 *SPTLC3* の intron 上に位置した。*SPTLC3* の intron にある SNP が serine palmitoyltransferase (SPT) の合成に影響を与え、その結果、sphingolipid 合成量の変化、5-HT_{1A} 受容体の結合能の変化をきたし、PD の発症につながる可能性が想定された。

サブグループ解析から見出された rs3906652 ($P = 2.0 \times 10^{-7}$) は、神経特異的に発現する *PPP2R2B* の intron 上に位置した。

メタ解析結果からは、候補 SNP に挙げるべき $P < 10^{-5}$ を満たす SNP は見出されなかった。

4.3. CNV 解析による候補遺伝子

Global burden analysis の結果から，rare CNV が PD 患者全体に与える影響は乏しいと判断された。部位 19q13.32–q13.33 の候補 common CNV クラスターの共通領域に，転写因子の遺伝子 *ZNF541* が存在した。この多型が転写活性を変化させて PD 発症に影響を与える可能性や，GABA_A や NMDA の受容体の機能変化を介した亜鉛と PD の関連を推定させた。なお，サブグループ解析による rare CNV も common CNV も全対象の解析結果と同様の傾向であった。

4.4. 本研究の課題

見つからない遺伝率を見つけるためには，より均質なサンプルの規模増大に努め，ハプロタイプ解析，遺伝子間や遺伝子・環境因子間の交互作用の解析，GWAS pathway 解析，次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列解析や全エクソーム配列解析が有効であると考えられた。

4.5. 限界

本研究では，低い *P* 値や弱いオッズ比の多型に対して検出力が不十分となりうる。Software の機能限界のため，性染色体については，女性対象の X 染色体 SNP の解析しか実施できていない。

5. 結論

補完法による SNP GWAS から 4 つの候補 SNP が，CNV GWAS から 2 つの候補 CNV が見出された。前者から *CD34*，*SAP30L*，*SPTLC3* が，後者から *ZNF541* が候補遺伝子に挙がった。しかし，今回のスクリーニング研究単独では，多重検定を調整後に統計的有意性を示さなかった。よって，見出された候補遺伝子多型について，新たな対象で反復研究を行うだけでなく，新たな研究手法を導入する必要がある。

(3,940 字)