

多発家系 iPS 細胞とアレル特異的発現解析による双極性障害の遺伝的要因の探索

高松岳矢

琉球大学大学院 医学研究科 分子・細胞生理学講座

【研究の背景】

双極性障害の病態はほとんど不明である。双極性障害は強い遺伝性を示すが、発症に大きな影響をもつ遺伝的要因はほぼ同定されていない。ここ 10 年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) は統計学的に疾患に関連する多くの common SNPs を見出したものの、分子メカニズム研究に直結する、影響力の大きな変異の同定については方法論も確立していない。近年の次世代シーケンシングの発展により、双極性障害も大規模なシーケンス研究がなされている (Cruceanu et al., 2018; Goes et al., 2016; Jia et al., 2021)。しかしながら、これまで主に対象であったコード領域から期待した結果が得られなかったこと等から、双極性障害ではノンコーディングの転写調節領域に重要な病因が隠れている可能性が示唆されている (Ament et al., 2015; Jia et al., 2021; Sul et al., 2020)。ここで現在問題なのが、膨大な調節領域から原因変異を見出す方法であり、特定の対象や領域に着目する合理的なアイデアが必要と考えられる。

そこで我々は (1) significant な連鎖領域をもち、影響力の大きい遺伝的要因の共有が期待される同一家系内患者を対象とし、(2) その領域の遺伝子に対して、全ゲノム解析と iPS 細胞由来神経細胞の RNAseq を統合したアレル特異的発現解析を行うことで、双極性障害に強い影響をもつシス調節変異を高効率・高感度に発見できると考え、本研究を行なった。

これまで我々は沖縄県で家系調査を行い、双極性障害と反復性うつ病が多発する大規模家系を見出し、パラメトリック連鎖解析により 1p36-35 に有意な連鎖を持つことを発見した。1p36-35 は先行研究で連鎖が報告された領域であり (Zubenko et al., 2003, Schumacher et al., 2005)、原因となる遺伝子変異が眠っている可能性がある。続いて、我々は全ゲノム解析を行い、家系内患者の共有する 1p36-35 の極めて稀なハプロタイプを決定した。もし疾患ハプロタイプにシス発現調節異常を起こす変異があれば、mRNA のアレル間の発現比は不均衡になるはずである。そこで本研究は、iPS 細胞由来神経系細胞の RNAseq から、全ゲノム解析のヘテロサイトを目印にアレル特異的発現解析を行い、ハプロタイプ内に異常なシス発現調節を受ける遺伝子を同定する。双極性障害では知る限りシス調節制御の研究は報告がなく、全く新しい知見が見出される可能性がある。

【目 的】

双極性障害と反復性うつ病の多発家系内患者が共有する 1p36-35 連鎖領域から、異常なシス発現調節を受ける遺伝子を同定することを目的とする。

【方 法】

琉球大学倫理審査委員会の承認と参加者のインフォームドコンセントを得て実施した。直系 3 世代の家系内患者 3 名と家系内非罹患者 1 名の iPS 細胞を用いた。iPS 細胞を dual SMAD 阻害により神経系細胞 (ニューロンとグリア) に分化誘導した。ニューロスフェア、ニューロン 7 日目、22 日目のタイムコース 3 点で RNA を回収した。RNA を Illumina NovaSeq でシーケンスし、リードを既得の全ゲノムデータをもとにアレル依存的なバイアスを排除する WASP (Geijn ら, Nat Methods, 2015) でマッピングし、GATK でカウントした。3 世代 3 名の患者に共通するアレル不均衡を示す遺伝子を BH 法で多重検定し絞り込んだ。さらにその遺伝子のアレル不均衡をチップ式デジタル PCR システムでバリデーションし、遺伝子を同定した。

【結 果】

アレル特異的発現解析により、本家系では遺伝子 X が患者ハプロタイプのみ有意に発現低下していることを発見した (FDR = 2.3×10^{-6})。遺伝子 X はミトコンドリア代謝に関わる遺伝子であった。

【考 察】

本家系の疾患ハプロタイプ内のシス転写調節の変異により、ミトコンドリア関連遺伝子 X の発現が低下し、発症に影響した可能性がある。家系を対象にしたアレル特異的発現解析という本手法は転写調節領域にある候補遺伝子の同定に有用と思われる。本研究は proof-of-concept として、この研究領域に研究手法を提案する明瞭な結果を得ることができた。今後さらなる検討を行い、遺伝子 X と疾患との関係を明らかにする。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ミトコンドリア機能異常と双極性障害の関連は、これまでも重要な病態仮説として注目されている。本研究の成果はミトコンドリア病態仮説を補完し、将来的な臨床アプローチや臨床研究に影響を与える可能性がある。また我々の研究が進展し遺伝子 X と疾患との関係が証明できれば、分子メカニズムが明らかになった初めての双極性障害例として、病態研究が飛躍的に進展するだけでなく、疾患 iPS 細胞を用いた本質的な創薬や患者層別化などへ発展性と臨床貢献性は非常に大きい。

【参考・引用文献】

- Cruceanu, C., Schmouth, J.F., Torres-Platas, S.G., Lopez, J.P., Ambalavanan, A., Darcq, E., Gross, F., Breton, B., Spiegelman, D., Rochefort, D., Hince, P., Petite, J.M., Gauthier, J., Lafreniere, R.G., Dion, P.A., Greenwood, C.M., Kieffer, B.L., Alda, M., Turecki, G., Rouleau, G.A., 2018. Rare susceptibility variants for bipolar disorder suggest a role for G protein-coupled receptors. *Mol Psychiatry* 23, 2050–2056.
- Goes, F.S., Pirooznia, M., Parla, J.S., Kramer, M., Ghiban, E., Mavruk, S., Chen, Y.C., Monson, E.T., Willour, V.L., Karchin, R., Flickinger, M., Locke, A.E., Levy, S.E., Scott, L.J., Boehnke, M., Stahl, E., Moran, J.L., Hultman, C.M., Landen, M., Purcell, S.M., Sklar, P., Zandi, P.P., McCombie, W.R., Potash, J.B., 2016. Exome Sequencing of Familial Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry* 73, 590–597.
- Jia, X., Goes, F.S., Locke, A.E., Palmer, D., Wang, W., Cohen-Woods, S., Genovese, G., Jackson, A.U., Jiang, C., Kvale, M., Mullins, N., Nguyen, H., Pirooznia, M., Rivera, M., Ruderfer, D.M., Shen, L., Thai, K., Zawistowski, M., Zhuang, Y., Abecasis, G., Akil, H., Bergen, S., Burmeister, M., Chapman, S., DelaBastide, M., Jureus, A., Kang, H.M., Kwok, P.Y., Li, J.Z., Levy, S.E., Monson, E.T., Moran, J., Sobell, J., Watson, S., Willour, V., Zollner, S., Adolfsson, R., Blackwood, D., Boehnke, M., Breen, G., Corvin, A., Craddock, N., DiFlorio, A., Hultman, C.M., Landen, M., Lewis, C., McCarroll, S.A., Richard McCombie, W., McGuffin, P., McIntosh, A., McQuillin, A., Morris, D., Myers, R.M., O'Donovan, M., Ophoff, R., Boks, M., Kahn, R., Ouwehand, W., Owen, M., Pato, C., Pato, M., Posthuma, D., Potash, J.B., Reif, A., Sklar, P., Smoller, J., Sullivan, P.F., Vincent, J., Walters, J., Neale, B., Purcell, S., Risch, N., Schaefer, C., Stahl, E.A., Zandi, P.P., Scott, L.J., 2021. Investigating rare pathogenic/likely pathogenic exonic variation in bipolar disorder. *Mol Psychiatry*.
- Ament, S.A., Szelinger, S., Glusman, G., Ashworth, J., Hou, L., Akula, N., Shekhtman, T., Badner, J.A., Brunkow, M.E., Mauldin, D.E., Stittrich, A.B., Rouleau, K., Detera-Wadleigh, S.D., Nurnberger, J.I., Jr., Edenberg, H.J., Gershon, E.S., Schork, N., Bipolar Genome, S., Price, N.D., Gelinas, R., Hood, L., Craig, D., McMahon, F.J., Kelsoe, J.R., Roach, J.C., 2015. Rare variants in neuronal excitability genes influence risk for bipolar disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 3576–3581.
- Sul, J.H., Service, S.K., Huang, A.Y., Ramensky, V., Hwang, S.G., Teshiba, T.M., Park, Y., Ori, A.P.S., Zhang, Z., Mullins, N., Olde Loohuis, L.M., Fears, S.C., Araya, C., Araya, X., Spesny, M., Bejarano, J., Ramirez, M., Castrillon,

G., Gomez-Makhinson, J., Lopez, M.C., Montoya, G., Montoya, C.P., Aldana, I., Escobar, J.I., Ospina-Duque, J., Kremeyer, B., Bedoya, G., Ruiz-Linares, A., Cantor, R.M., Molina, J., Coppola, G., Ophoff, R.A., Macaya, G., Lopez-Jaramillo, C., Reus, V., Bearden, C.E., Sabatti, C., Freimer, N.B., 2020. Contribution of common and rare variants to bipolar disorder susceptibility in extended pedigrees from population isolates. *Transl Psychiatry* 10, 74.

Zubenko, G.S., Maher, B., Hughes, H.B., 3rd, Zubenko, W.N., Stiffler, J.S., Kaplan, B.B., Marazita, M.L., 2003. Genome-wide linkage survey for genetic loci that influence the development of depressive disorders in families with recurrent, early-onset, major depression. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 123B, 1-18.

Schumacher, J., Kaneva, R., Jamra, R.A., Diaz, G.O., Ohlraun, S., Milanova, V., Lee, Y.A., Rivas, F., Mayoral, F., Fuerst, R., Flaquer, A., Windemuth, C., Gay, E., Sanz, S., Gonzalez, M.J., Gil, S., Cabaleiro, F., del Rio, F., Perez, F., Haro, J., Kostov, C., Chorbov, V., Nikolova-Hill, A., Stoyanova, V., Onchev, G., Kremensky, I., Strauch, K., Schulze, T.G., Nurnberg, P., Gaebel, W., Klimke, A., Auburger, G., Wienker, T.F., Kalaydjieva, L., Propping, P., Cichon, S., Jablensky, A., Rietschel, M., Nothen, M.M., 2005. Genomewide scan and fine-mapping linkage studies in four European samples with bipolar affective disorder suggest a new susceptibility locus on chromosome 1p35-p36 and provides further evidence of loci on chromosome 4q31 and 6q24. *Am J Hum Genet* 77, 1102-1111.