

## 統合失調症の発症に大きな効果をもつ de novo 変異の同定

渡部雄一郎

新潟大学大学院医歯学総合研究科 精神医学分野

### 【研究の背景】

海外では統合失調症患者・両親家系の大規模サンプルを用いて、ゲノム中のすべてのエクソンをシーケンスする全エクソーム解析が行われるようになり、de novo 変異が統合失調症の発症に大きな効果をもつことが示されている (Singh et al., 2022)。一方、国内からは患者・両親 18 家系を対象とした 1 報のみであり (Nishi et al., 2017)、日本はこの分野で大きな後れを取ってしまっている。

De novo 変異には生殖細胞系列の変異と体細胞変異が含まれるが、これまで体細胞変異の検出は困難であった。近年、解析手法の進展によって体細胞変異が精神疾患の病態に関与している可能性が示唆され注目を集めている (Nishioka et al., 2019)。

統合失調症死後脳を用いた、コピー数変異解析 (Sakai et al., 2015)、LINE-1 の増加 (Bundo et al., 2014)、全エクソーム解析 (Kim et al., 2021) などが報告されているが、統合失調症の体細胞変異に関する研究は緒についたばかりである。

### 【目 的】

統合失調症の発症に大きな効果を持つ de novo 変異 (生殖細胞系列変異と体細胞変異) を明らかにすることを目的として、本研究を実施した。

### 【方 法】

本研究は新潟大学遺伝子倫理審査委員会承認されており、対象者からは書面にて研究参加の同意を得た。

統合失調症患者・両親 60 家系 (6 家系は罹患同胞 2 人を含む) を対象とした。すなわち、患者 66 人 (男性 33 人、平均年齢 31 歳)、父 60 人 (平均年齢 60 歳)、母 60 人 (平均年齢 57 歳) の計 186 人である。

これら 186 人について通常深度の全エクソーム解析を行った。患者 66 人については高深度の全エクソーム解析も行った。エクソン濃縮には SureSelect Human All Exon V4/5/6 kit (アジレント・テクノロジー) または Twist Comprehensive Exome Panel (ツイスト・バイオサイエンス) を用いた。シーケンスには HiSeq 2000/2500 または NovaSeq 6000 (イルミナ) を用いた。

シーケンスリードのアラインメントやクオリティコントロールには Genome Analysis Toolkit (GATK) best practice (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) を用いた。データのクオリティコントロールには FastQC v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) を用いた。シーケンスリードは Burrows-Wheeler Aligner v0.7.17 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) を用いて hg38 参照ゲノムにマッピングした。PCR 重複は Picard v2.24.0 (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) を用いて除去した。GATK v4.1.9.0 HaplotypeCaller を用いて変異をコールした。

生殖細胞系列 de novo 変異の候補は Triodenovo v0.06 (<https://genome.sph.umich.edu/wiki/Triodenovo>) と DNMFiter 0.0.1 (<https://github.com/yongzhuang/DNMFiter>) を用いて検出した。体細胞 de novo 変異の候補は GATK v4.1.9.0 Mutect2 を用いて検出した。

以下の条件を満たす変異を選択した。Genome Aggregation Database (gnomAD) v2.1.1 (non-neuro) Exomes (<http://gnomad.broadinstitute.org/>)、Tohoku Medical Megabank Organization (ToMMo) 38KJPN

(<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp>)、Trans-Omics for Precision Medicine freeze 8 database (<https://bravo.sph.umich.edu/freeze8/hg38/>) においてアレル頻度が 0.1%未満の稀な変異。SnPEff v4.3 (<http://snpeff.sourceforge.net/>) によって、機能的意義が高度、中等度、または軽度だがスプライス領域と予測された変異。

選択された生殖細胞系列と体細胞 de novo 変異の候補は、それぞれサンガーシーケンスと超高深度ターゲットシーケンスによって確認した。超高深度ターゲットシーケンスには Miseq (イルミナ) を用いた。

## 【結 果】

通常深度の全エクソーム解析の平均深度は 118 であり、標的領域の 95%は 15 リード以上でカバーされた。稀な生殖細胞 de novo 変異の候補として 256 個が検出され、136 個が一塩基置換、120 個が挿入・欠失であった。63 個の一塩基置換と 35 個の挿入・欠失が選択され、それぞれ 55 個 (87%) と 7 個 (35%) がサンガーシーケンスにより確認された。

高深度の全エクソーム解析については、患者 35 人 (罹患同胞 1 ペアを含む) のデータ解析を終え、平均深度は 346 であり、標的領域の 96%は 15 リード以上でカバーされた。稀な体細胞 de novo 変異の候補として 259 個が検出され、252 個が一塩基置換、7 個が挿入・欠失であった。25 個の一塩基置換と 3 個の挿入・欠失が選択され、それぞれ 24 個 (96%) と 2 個 (67%) が超高深度ターゲットシーケンスにより確認された。超高深度ターゲットシーケンスの平均深度は 79940 であった。超高深度ターゲットシーケンスの変異アレル割合は 0.1%~32%であり、高深度の全エクソーム解析の変異アレル割合と強い相関を示した ( $R^2 = 0.95$ )。

生殖細胞および体細胞 de novo 変異が存在する遺伝子のなかには、統合失調症、双極性障害、または神経発達障害のリスク遺伝子として報告されているものが複数含まれていた。これらの変異をもつ患者については診療録調査を行い、詳細な臨床情報を得ている。

## 【考 察】

統合失調症患者・両親 60 家系において生殖細胞 de novo 変異を 62 個、患者・両親 34 家系において体細胞 de novo 変異を 26 個同定した。これらの変異が存在する遺伝子のなかには、統合失調症のリスク遺伝子として報告されているものが複数含まれていた。したがって、今回同定された変異の中には真のリスク変異が含まれているものと考えられる。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

解析の対象とする家系をさらに増やすことによって、統合失調症の発症に大きな効果をもつ真のリスク変異を特定できるものと考えられる。これにより、統合失調症の病態を解明し、根本的治療法を開発するための分子基盤が得られるという意義がある。

## 【参考・引用文献】

- Bundo M et al. Increased *l1* retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 2014; 81: 306-313.
- Kim MH et al. Low-level brain somatic mutations are implicated in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2021; 90: 35-46.
- Nishi A et al. De novo non-synonymous TBL1XR1 mutation alters Wnt signaling activity. *Sci Rep* 2017; 7: 2887.
- Nishioka M et al. Somatic mutations in the human brain: implications for psychiatric research. *Mol Psychiatry* 2019; 24: 839-856.
- Sakai M et al. Assessment of copy number variations in the brain genome of schizophrenia patients. *Mol Cytogenet* 2015; 8: 46.
- Singh T et al. Rare coding variants in ten genes confer substantial risk for schizophrenia. *Nature* 2022; 604: 509-516.