

論 文 要 旨

Comprehensive analysis of the genes responsible for neuroacanthocytosis in mood disorder and schizophrenia

気分障害及び統合失調症患者における 神経有棘赤血球症関連遺伝子の包括的解析

下 洋 央

【序論および目的】

神経有棘赤血球症は、神経症候と有棘赤血球症を併せ持つ病態に対して包括的に使用される用語である。その中で、movement disorder を呈する群の多くは、有棘赤血球舞踏病 (chorea-acanthocytosis, ChAc) と McLeod 症候群 (McLeod syndrome, MLS) で占められる。我々は、ChAc の病因遺伝子 *VPS13A* 上に、疾患変異をヘテロ接合性に有す保因者に気分障害が認められる家系を報告した。*VPS13A* は、約 244kb の非常に大きなゲノムから構成されているため、今まで系統的に研究されていなかった。また、MLS は、統合失調症、気分障害などの精神症状を高率に呈することが知られている。そこで、神経有棘赤血球症とこれらの精神障害の相関が示唆され、今回、気分障害と統合失調症患者における神経有棘赤血球症遺伝子の包括的解析に関する研究を行った。

【材料および方法】

85 名のお気分障害患者において、*VPS13A* 及び MLS の病因遺伝子である *XK* のリシークエンシングを行った。86 名の統合失調症患者においては、*XK* のリシークエンシングを行った。さらに、患者で認められた変異について、その有無を健常者 100 対立遺伝子以上でも解析した。また、72 名のお気分障害患者において、*VPS13A* 及び *XK* のコピー数変異解析を行った。86 名の統合失調症患者においては、*XK* のコピー数変異解析を行った。(尚、本研究は鹿児島大学医学部遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得ている。)

【結 果】

気分障害患者の *VPS13A* のリシークエンシングでは、10 種類の新規の非同義的変異と 17 種類の新規の同義的変異を同定した。その中で、健常者には認められなかった非同義的変異は 3 種類で、同義的変異は 8 種類であり、いずれもヘテロ接合性に認められた。これらの非同義的変異は哺乳類の種間で保存されていた。S2302N、L2338V の変異は、*VPS13A* の遺伝子産物である chorein の小胞体輸送関連タンパク質共通構造である VPSAP 内に認められた。また、GAT triplet repeat の多型を同定したが、気分障害との相関は認められなかった。

気分障害患者の *VPS13A* のコピー数バリエーション解析では、1 名のお気分障害患者に、*VPS13A* の疾患変異である exon60-61 欠失変異をヘテロ接合性に認めた。

気分障害患者の *XK* のリシーケンシングでは、新規の非同義的変異である Y321C をヘテロ接合性に女性患者 1 名に認め、健常者には認めなかった。蛋白質 *XK* は、10 個の膜貫通領域を持っている。この変異は、その領域内に認め、哺乳類の種間で保存されていた。

統合失調症患者の *XK* のリシーケンシングでは、新規の同義的変異である c. 509-13C>G をヘテロ接合性に女性患者 1 名に認め、健常者には認めなかった。この変異は、intron2-exon3 junction のピリミジンリッチ領域に認めた。

XK のコピー数バリエーション解析では、気分障害及び統合失調症患者において、欠失、重複などの変異は認めなかった。

【結論及び考察】

本研究は、サンプル数が少なかったため、統計学的有意差を認めなかった。しかし、気分障害患者や統合失調症患者において、*VPS13A* や *XK* 遺伝子上に疾患変異や遺伝子産物の機能と関係する可能性がある変異をヘテロ接合性に持つ者を認めたことから、神経有棘赤血球症関連遺伝子は、気分障害及び統合失調症の病因に関与している可能性がある。本研究は、common disease である気分障害や統合失調症において、いくつかの rare variants が認められたので、“multiple rare variants-common disease” 仮説を裏付けていると思われる。今後は、検体数を増やした解析、蛋白質の機能解析が必要だと考えられる。

(Neuroscience Research in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 110 号	学位申請者	下 洋央
審査委員	主査	出雲 周二	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	熊本 一朗	副査 高嶋 博
	副査	古川 龍彦	副査 橋口 照人
<p>欧文タイトル Comprehensive analysis of the genes responsible for neuroacanthocytosis in mood disorder and schizophrenia</p> <p>和文タイトル 気分障害及び統合失調症における神経有棘赤血球症関連遺伝子の包括的解析</p> <p>公表 (予定) 学術誌 (誌名・巻・頁・発行年月) Neuroscience Research in press</p> <p>神経有棘赤血球症は、神経症候と有棘赤血球症を併せ持つ病態に対して包括的に使用される用語である。その中で、movement disorder を呈する群の多くは、有棘赤血球舞踏病 (ChAc) と McLeod 症候群 (MLS) で占められる。先に、共著者らは、ChAc の病因遺伝子 <i>VPS13A</i> 上に、疾患変異をヘテロ接合性に有す保因者に気分障害が認められる家系を報告している。しかし、<i>VPS13A</i> は、エクソン数 73 で、全長約 244kb にわたる非常に大きな遺伝子であり、現在まで、疾患関連性に関しては、系統的に研究されていなかった。また、病因遺伝子が <i>XK</i> である MLS は、統合失調症、気分障害などの精神症状を高率に呈することが知られている。そこで、今回、学位申請者らは、神経有棘赤血球症とこれらの精神障害の相関を示唆し、気分障害と統合失調症患者における神経有棘赤血球症遺伝子の包括的解析に関する研究を行った。その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。</p> <p>1) 気分障害患者の <i>VPS13A</i> のリシークエンシングでは、健常者には認められなかった新規の 3 種類の非同義的変異、2 種類の同義的変異、6 種類のイントロン変異を同定した。H196R、R208Q の非同義的変異は、疾患変異の可能性が強く示唆された。また、新規の GAT triplet repeat の多型を同定した。</p> <p>2) 気分障害患者の <i>VPS13A</i> のコピー数変異解析では、1 名のみ気分障害患者に、<i>VPS13A</i> の疾患変異である exon 60-61 欠失変異をヘテロ接合性に認めた。</p> <p>3) <i>VPS13A</i> において疾患変異の可能性が高い非同義的変異の H196R、R208Q と疾患変異である exon 60-61 欠失変異は気分障害患者にしか認められず、これら病的変異を合計してその頻度を健常者と比較すると統計学的に有意差を認めた ($P=0.02$)。</p> <p>4) <i>XK</i> のリシークエンシングでは、気分障害患者では 1 種類の新規の非同義的変異を、統合失調症患者では 1 種類の新規のイントロン変異を認めた。健常者と比較して統計学的有意差は認めなかったが、疾患変異と気分障害及び統合失調症の関連があると示唆された。</p> <p>5) <i>XK</i> のコピー数変異解析では、気分障害及び統合失調症患者において、欠失、重複などの変異は認めなかった。</p> <p>本研究は、気分障害患者や統合失調症患者において、<i>VPS13A</i> や <i>XK</i> 遺伝子上に疾患変異や遺伝子産物の機能と関係する可能性がある変異をヘテロ接合性に持つ者を認めたことから、神経有棘赤血球症関連遺伝子は、気分障害及び統合失調症の病因に関与している可能性があり、興味深い。以上より、本研究は、common disease であるこれらの精神障害において、いくつかの rare variants が認められたので、"multiple rare variants-common disease" 仮説を裏付けており、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。</p>			

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 118 号	学位申請者	下 洋央
審査委員	主 査	出雲 周二	学 位
	副 査	熊本 一朗	副 査
	副 査	古川 龍彦	副 査
			博士 (医学・歯学・学術)
			高嶋 博
			橋口 照人

主査および副査の5名は、平成23年1月21日、学位申請者 下 洋央 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 有棘赤血球舞蹈病 (ChAc) は、主に常染色体劣性遺伝形式を呈するということだが、他の遺伝形式も見られるのか。

(回答) ChAc のほとんどは常染色体劣性遺伝形式として報告されているが、中には常染色体優性遺伝形式を呈する家系例の報告もある。しかし、疾患変異がヘテロ接合性に一つしか見つからなかったために、常染色体優性遺伝として考えられている家系例もあり、コピー数変異 (CNV) 等の通常のシーケンシングでは見つからないもう一つの未知の変異が見逃されている可能性がある。

質問2) 気分障害患者における *VPS13A* 遺伝子の非同義的変異は、機能喪失性変異と機能獲得性変異のどちらの機序を病因として想定しているか。すなわちハプロ不全やドミナントネガティブのようなことを考えているのか。

(回答) 今回の研究での気分障害患者においては、タンパク質解析に必要な赤血球膜を抽出していなかったために、chorein の発現量を測定することができなかったが、他の ChAc 患者では、赤血球膜を対象としたウエスタンブロットで chorein のバンドを全く認めず、chorein の機能喪失が病因と考えられている。そのような機能喪失を生じる *VPS13A* の変異をヘテロ接合性に有す保因者が部分症状として気分障害を呈する家系があり、保因者の chorein の発現は、正常者と比較して約半分に減少している。このようなことから、気分障害患者ではハプロ不全を起こすような機能喪失性変異が原因となっている可能性が高いと考えられる。

質問3) ChAc と McLeod 症候群 (MLS) の頻度、臨床症候の違いを説明せよ。

(回答) 両疾患とも稀な疾患であり、正確な疫学調査はいまだなく現在調査中である。ChAc に関しては、全世界で200例ほどの症例報告のうち、100例以上は日本国内の症例といわれおり、比較的日本人に多い疾患と言われている。舞蹈運動や有棘赤血球症、尾状核の萎縮、てんかん、精神症状などの臨床症候は両者とも認めることが多く鑑別困難であるが、MLS では、Kell 抗原陰性であることから鑑別可能である。また、統合失調症の幻覚や妄想のような精神病症状は MLS に多いと言われている。

質問4) H196R、R208Q の非同義的変異は、どのようなアミノ酸変化か。Polyphen2 は非同義的変異をどのように解析するか。

(回答) ヒスチジンは、イミダゾール基という複素芳香環を持つ塩基性アミノ酸で、アルギニンは、2つのアミノ基を持つ塩基性アミノ酸で、グルタミンは、アミド基を持つ中性アミノ酸である。PolyPhen2 は、アミノ酸配列の変化による蛋白質への影響を予測し、変異が病的な影響を与えるものかを推測するソフトウェアである。アミノ酸の極性、等電点などの違いから高次構造に与える影響や種間での保存等を総合的に考慮されている。

質問5) Copy number variations が病気を起こす意義は何か。

(回答) 今回我々が発見した CNV は *VPS13A* の exon60-61 欠失変異という一つの遺伝子内でおこった CNV である。この変異は既に報告されているものであり、exon60 と 61 の欠失により、エクソンスキッピングとそれに続くフレームシフトを起こし、premature stop codon を形成する。このような機序により、病気を引き起こすと思われる。

質問 6) MLS では、モザイクが原因の可能性もあるか。

(回答) 今回、末梢血では、コピー数変異解析で欠失や重複は認めなかったが、中枢神経を含めた他の組織での解析は行えなかったために、X 染色体不活性化などによるモザイクの可能性については不明である。MLS の疾患変異として、調べた限りではモザイクの報告はない。

質問 7) *VPS13A* において疾患変異の可能性が高い非同義的変異の H196R、R208Q と疾患変異である exon60-61 欠失変異を合計してその頻度を健常者と比較して統計学的有意差を認めているが、変異を合計することに意義はあるか。

(回答) 今回は、明らかな機能障害を引き起こし、直接病気の原因になるような遺伝子変異が多数存在する、という multiple rare variants common disease 仮説に基づき、そのような変異を合計して統計を行った。

質問 8) ChAc や MLS の気分障害と一般の気分障害で発症時期、臨床症候の違いはあるか。

(回答) ChAc は、16~50 歳頃発症し、MLS は、30~40 歳代に多く発症する。気分障害は、20~30 歳代に多く発症するが、発症時期はさまざまであり、発症時期に明確な違いを見つけるのは困難である。ChAc や MLS に特徴的な気分障害は報告されていない。鑑別には、他の臨床症候が重要である。

質問 9) *VPS13A* のコピー数変異解析で、リアルタイム PCR と Long range PCR を組み合わせている理由はなぜか。

(回答) ChAc 病因遺伝子は巨大であるため、CNV は遺伝子内で生じている可能性があり、病因となる CNV は、エクソンを含むものと考えられる。効率よく漏れなく CNV を検出するために、イントロン配列が短い領域はその領域内の両端のエクソン間で long range PCR をかけ、その両端エクソン上にリアルタイム PCR 用の Taqman probe をおいた。以上のようにリアルタイム PCR と Long range PCR を組み合わせて行った。

質問 10) 精神疾患患者で XK 蛋白の量は解析していないか。XK 蛋白はどのような機能があるか。

(回答) 精神疾患患者で、XK 蛋白については解析していない。XK 蛋白は Kell 糖蛋白と共有結合性に結合し、この複合体の機能は不詳である。線虫においては、ヒト XK 蛋白に似た Ced8 という蛋白質がみつまっている。この Ced8 を変化させた線虫において、胎児期のプログラム細胞死の進行が遅くなることがわかっている。

質問 11) リシークエンシングとシークエンスの言葉の違いは何か。

(回答) 既にゲノム配列がわかっている生物種の全ゲノムを再シークエンシングし、その結果をリファレンスゲノムと比較することをリシークエンシングという。

質問 12) Chorein は、細胞の種類で発現レベルに違いがあるか。

(回答) マウスでは Chorein は脳、腎臓、精巣において強い発現を認め、脳の細胞下分画ではシナプトソーム、ミクロソーム画分に最も豊富である。

質問 13) 他の疾患で、GAT トリプレットリピートの違いが言われているか。

(回答) GAT のトリプレットリピート病は、今のところ報告されていない。CGG のトリプレットリピート病は、脆弱 X 症候群、CAG のトリプレットリピート病は、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳変性症、Huntington 病、歯状核赤核・淡蒼球 Luys 体萎縮症、Machado-Joseph 病、CTG のトリプレットリピート病は、Huntington' s disease like 2、筋緊張性ジストロフィー、GAA のトリプレットリピート病は、Friedreich 運動失調症が報告されている。

質問 14) 使われたシークエンスの精度はどれくらいか。

(回答) ノイズが出現したものは、解析をやりなおし、ノイズが見られなくなった配列で解析した。変異部位は、forward 側と reverse 側の両方向から解析しているので、精度はほぼ 100% と考えられる。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。