

主論文の要旨

**Rare Genetic Variants in the Gene Encoding Histone  
Lysine Demethylase 4C (*KDM4C*) and Their  
Contributions to Susceptibility to Schizophrenia and  
Autism Spectrum Disorder**

Histone Lysine Demethylase 4C (*KDM4C*) 遺伝子における  
稀な遺伝子バリエーションおよびそれらの統合失調症と  
自閉スペクトラム症への疾患感受性に対する寄与

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
脳神経病態制御学講座 精神医学分野

(指導：尾崎 紀夫 教授)

加藤 秀一

## 【緒言】

統合失調症 (SCZ) および自閉スペクトラム症 (ASD) の診断基準は患者の自他覚的な臨床症状に依拠しており、病態に基づく真の診断法や治療薬は未だ開発されていない。両疾患は、双生児研究から算出される遺伝率が約 80% と高く、遺伝要因が比較的強く発症に関与することが明らかとなっている。従って、ゲノム解析研究を起点とした病態の解明が求められている。特に頻度の稀 (<1%) なバリエーションは発症への効果量が大きいものがあり、注目されている。

両疾患の発症メカニズム (パスウェイ) として報告されている、ヒストンメチル化修飾を含むエピジェネティック制御の異常は、神経発達の障害をきたすことが明らかになっている。我々が以前報告したゲノムコピー数変異解析 (CNV 解析) や他の研究グループのモデル動物を用いた研究から、ヒストン脱メチル化酵素をコードする Lysine demethylase 4C (*KDM4C*) 遺伝子は両疾患のリスクに関与することが示唆されており、*KDM4C* 遺伝子の稀なバリエーションが病態に関与すると仮説を立てた。以前の全ゲノム解析では、偽陽性を減らすためにクオリティコントロール (QC) を厳しく設定したことにより検出力が下がり、両疾患それぞれに分けての解析を行えていない。また、*KDM4C* の稀な一塩基バリエーション (SNV) に着目したシーケンス解析はこれまでに行われていない。さらに、患者由来の細胞を用いて *KDM4C* の稀なバリエーションによる生物学的な影響を調べた研究はこれまでに行われていない。そこで、我々は CNV 解析の QC の設定を変更し、またサンプルサイズを増やすことで検出力を高め、*KDM4C* の CNV と両疾患との関連を詳細に評価した。次に、*KDM4C* の SNV に着目してシーケンス解析を行った。さらに、*KDM4C* の欠失を有する患者由来の細胞を用いて、欠失による生物学的な影響を調べた。

## 【対象及び方法】

3 つのサンプルセットを対象にゲノム解析を実施した。SCZ および ASD の診断は Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5) の診断基準に基づいて行った。本研究は名古屋大学医学部倫理委員会で承認されており、参加者から書面にて研究参加の同意を得た。研究方法は以下のとおりである。

1. ファースト・サンプルセット (SCZ 2,605 例、ASD 1,141 例、健常者 2,310 例) を対象に、アレイ CGH 法を用いて CNV 解析を行った。また、サンガー法を用いて CNV の切断点を決定するとともに、カルテ情報等に基づいて *KDM4C* の CNV をもつ患者の表現型を評価した。
2. セカンド・サンプルセット (SCZ 370 例および ASD 192 例) を用いてコーディングエクソン領域のシーケンス解析を実施した。シーケンス結果および 3 つのデータベース (ToMMo、HGVD、ExAC) で頻度 1% 未満のミスセンスバリエーションに絞り、2 つの *in silico* 解析 (SIFT、PolyPhen-2) を用いて、バリエーションがタンパク質機能に与える影響を予想した。p.D160N に着目し、サード・サンプルセット (SCZ 1,751 例、ASD 377 例、健常コントロール 2,276 例) を用いて関連解析を行った。

3. *KDM4C* の CNV をもつ患者由来のリンパ芽球様細胞 (LCL) を用いて mRNA 発現解析を行った。イムノプロット法により、*KDM4C* タンパク質の発現、およびヒストンメチル化修飾パターン (H3K4me3、H3K9me2、H3K9me3、H3K36me3) を調べた。

### 【結果】

1. CNV 解析の結果、12 例の *KDM4C* の CNV を同定し、CNV と SCZ ( $p = 0.003$ ) および ASD ( $p = 0.04$ ) それぞれとの間に有意な関連を認めた。さらに、*KDM4C* の欠失と SCZ (corrected  $p = 0.04$ ) との間に有意な関連を認めた (Figure 1a, Table 1)。サンガー法を用いて 5 例の CNV 切断点を決定した (Figure 1b)。CNV のメカニズムとして、4 例で NMEJ (マイクロホモロジー媒介末端結合) あるいは MMBIR (microhomology-mediated break-induced replication) が、また 1 例では NHEJ (非同末端結合) あるいは MMBIR が推測された。臨床表現型を評価し、4 例は治療抵抗性の SCZ であった (Table 1)。
2. シーケンス解析の結果、同定した 18 の稀なミスセンスバリエーションのうち、5 つは *in silico* 解析でタンパク質機能の変化が予測された。p.D160N は、ヒストン脱メチル化作用の活性部位である JmjC ドメイン中に存在し (Figure 2)、各種データベースに登録されていなかった。関連解析の結果、両疾患との有意な関連は示されなかった (Table 2)。
3. mRNA 発現解析の結果、*KDM4C* の欠失を有する患者由来の LCL で発現が低下していた (Figure 3a, b)。イムノプロットの結果、*KDM4C* の欠失を有する患者由来の LCL で、*KDM4C* タンパク質発現が低下し、H3K9me3/me2、H3K36me3 が増加している一方で、H3K4me3 の変化は小さかった (Figure c-e)。

### 【考察】

検出力を高めて CNV 解析を行った結果、*KDM4C* の CNV と SCZ および ASD それぞれとの関連、および *KDM4C* の欠失と SCZ との関連を明らかにした。CNV が同定された 12 例のうち、10 例の CNV は transcript variant 4 (variant 4) のエクソン 1 とオーバーラップしており、4 例の CNV が transcript variant 1 (variant 1) とオーバーラップしていた (Figure 1a)。神経系組織において、variant 1 の発現が報告されている一方で、variant 4 の発現は乏しい。さらに、Tudor ドメインが H3K4me3 を認識することで *KDM4C* の H3K9 に対する脱メチル化作用が誘導されることが知られているが、variant 4 は H3K4me3 を認識する Tudor ドメインを欠く。これらの知見から variant 1 が神経発達により重要であることが推測される。variant 4 のエクソン 1 領域は variant 1 のエンハンサー領域である可能性が指摘されていることより、CNV が variant 1 の発現に影響することで疾患発症に関連するのかもしれない。しかし、どの transcript variant が神経発達に重要な役割を果たしているのかについては結論が出ておらず、今後の研究が必要である。

シーケンス解析の結果同定された p.D160N と両疾患との間に有意な関連は認めな

った。検出力が不足していたことが理由かもしれない。

イムノプロットの結果、*KDM4C* により脱メチル化される  $H3K9me3/me2$  と  $H3K36me3$  が増加している一方で、 $H3K4me3$  の変化は小さかった。*KDM4C* の欠失により  $H3K9$  と  $H3K36$  の脱メチル化が障害されることが示唆された。

#### 【結語】

*KDM4C* の CNV と SCZ および ASD それぞれとの間の遺伝統計学的な関連、および *KDM4C* の欠失と SCZ との関連を明らかにした。さらに、*KDM4C* の欠失がヒストンメチル化修飾パターンに及ぼす潜在的な影響を明らかにした。今後、*KDM4C* の CNV により、いつどの細胞でメチル化修飾パターンが変化し、どのような遺伝子の発現調節が変化して病態に関与するのかを明らかにしていく必要がある。