

主論文の要旨

**Rare single-nucleotide *DABI* variants and their  
contribution to Schizophrenia and autism  
spectrum disorder susceptibility**

統合失調症及び自閉スペクトラム症の病態に寄与する  
*DABI* 遺伝子内の稀な一塩基変異の探索

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)

名和 佳弘

## 【緒言】

統合失調症 (SCZ) と SCZ と共通の遺伝学的基盤を有すると考えられる自閉スペクトラム症 (ASD) は、家系内に疾患が集積していること、遺伝率が約 80% と高く推定されていること等の知見から、その分子病態解明への手法として、ゲノム解析が有望であると考えられている。近年、精神疾患のゲノム研究において、シーケンス解析によって同定される頻度が 1% 未満と低い稀なコピー数変異 (CNV) や一塩基変異 (SNV) が、SCZ や ASD の発症に強い影響力を持つゲノム変異として注目されている。そのため、SCZ や ASD の発症に強い影響力を持つゲノム変異を同定し、患者臨床表現型との関連評価や生物学的な機能解析を実施することで、SCZ や ASD の分子病態の解明と新規診断法・治療薬の開発に繋がることが期待されている。

Reelin (RELN) は、SCZ や ASD の病態に関与すると想定されている胎生期の脳神経発達過程において重要な役割を果たしているが、SCZ 患者や ASD 患者を対象としたゲノム解析においても、繰り返し RELN の機能喪失変異が同定されており、SCZ や ASD の疾患候補遺伝子と考えられている。本研究で注目する Disabled 1 (DAB1) は、Reelin のシグナル伝達系に関与する細胞内アダプター蛋白質であり、脳発生期の正常な神経細胞遊走、層構造形成において不可欠な役割を果たす。DAB1 は、モデル動物研究、死後脳研究において、SCZ や ASD などの精神疾患に関与していることが繰り返し報告されており、SCZ や ASD の疾患候補遺伝子として注目を浴びているが、精神疾患患者を対象として、DAB1 の稀なゲノム変異に注目した報告は存在しない。

以上を踏まえ、私は、SCZ 患者や ASD 患者の DAB1 遺伝子内に疾患発症に強く関連する稀なゲノム変異が存在すると仮説を立て、シーケンス解析を通じて SNV の同定と機能解析を行い、DAB1 内の SNV と疾患病態との関連を検討することを企図した。

## 【対象及び方法】

本研究は 2 つの独立した日本人の患者健常者集団を対象とした。患者の診断は DSM-5 の診断基準に基づいて行った。健常者は精神疾患の既往がない者とした。本研究は名古屋大学医学部生命倫理委員会で承認されており、本人 (未成年の場合は本人と保護者) に口頭及び書面にて説明し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. SCZ 患者 370 名 ( $49.7 \pm 14.8$  歳) と ASD 患者 192 名 ( $16.3 \pm 8.4$  歳) の末梢血もしくは唾液より抽出した DNA を用いて、DAB1 のエクソン領域を標的としたシーケンス解析を実施した。機器は Ion Torrent PGM™ を使用し、標準プロトコールで行った。パイプラインソフトウェアは Torrent Suite™ を用いた。シーケンス結果及び 4 つのデータベース (gnomAD、ESP、jMorp、HGVD) で頻度 1% 未満の変異に絞り、サンガー法にて変異の存在を再確認した。ミスセンス変異に関しては、2 つの *in silico* 解析 (SIFT、PolyPhen-2) にて、変異が蛋白質機能に与える影響を評価した。

2. 同定した頻度 1% 未満の稀な変異を対象に、SCZ 患者 1763 名 ( $47.6 \pm 15.3$  歳)、

ASD 患者 380 名 (21.4±10.5 歳)、健常者 2190 名 (45.7±15.0 歳) を用いた関連解析を実施した。機器は ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System を使用し、TaqMan assay 法の標準プロトコールで行った。検出力解析は Purcell らが開発した Genetic Power Calculator を使用した。統計学的評価は Fisher の直接確率検定 (片側検定) を用いた。

3. SCZ・ASD の発症に強い影響を持つと想定されたゲノム変異を有する患者について臨床表現型の関連を検討した。

4. SCZ・ASD の発症に強い影響を持つと想定されたゲノム変異に関しては、I-TASSER 及び UCSF Chimera を用いた *in silico* 構造解析を実施した。また、リコンビナント DAB1 蛋白質の野生型と変異型を用いたシクロヘキシミド追跡分析 (cycloheximide chase assay) を実施し、変異が DAB1 蛋白質の構造と安定性に与える影響を検討した。シクロヘキシミド追跡分析は、HEK293FT 細胞に *DAB1* の野生型と変異型のプラスミドをそれぞれ導入し一過性発現させ、細胞内局在にほとんど差がないことを確認した (Figure 3a)。プラスミドを導入した細胞を 48 時間培養したが、100  $\mu$ g/ml のシクロヘキシミドにて 8 時間、16 時間、24 時間処理したものと、処理していないものを immunoblotting にて相対定量することで、発現量の低下を比較した (Figure 3b, c)。

## 【結果】

1. *DAB1* 遺伝子のシーケンス解析にて、2 つの稀なミスセンス変異 (p.G382C、p.V129I) をそれぞれ別の SCZ 患者 1 例ずつに同定した (Table 1)。これらのミスセンス変異は、SIFT、Polyphen-2 を用いた *in silico* 解析で蛋白質機能の変化が予測された。p.V129I は Phosphotyrosine-binding (PTB) ドメインに存在し、p.G382C は C 末端に存在した (Figure 1)。ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライスサイト変異は同定されなかった。

2. 同定した 2 つの稀なミスセンス変異を対象に関連解析を実施したが、患者群との有意な関連は示されなかった (Table 2)。関連解析サンプルにおいて、p.G382C はさらに ASD 患者 1 例に同定されたが、健常者では同定されず、各種の健常者データベースでも未報告であった。p.V129I は、SCZ 患者 3 例、健常者 4 例で同定された。

3. p.G382C が同定された 2 例の臨床表現型を調べたが、共通した表現型は認めなかった。

4. p.G382C、p.V129I はともに *in silico* 構造解析にて蛋白質の構造変化が予測され (Figure 2)、シクロヘキシミド追跡分析にて蛋白質の安定性の低下が認められた (Figure 3c, d)。

## 【考察】

本研究は、*DAB1* 遺伝子内の稀な SNV と SCZ・ASD との関連を、日本人サンプルを用いて調べた最初の研究である。562 名の日本人患者のシーケンス解析によって 2

つの稀なミスセンス変異 (p.G382C、p.V129I) が同定され、SCZ や ASD の発症に関連しうる変異であると想定された。そのため、独立した大規模サンプルを用いて関連解析を行ったが、有意な関連は示さなかった。しかし、p.G382C は患者群でのみ同定され、健常対照者群や各種の健常者の大規模データベース上でも同定されていないことから、ASD・SCZ の発症に関わりうる変異であることが示唆された。

p.G382C が存在する DAB1 の C 末端領域は、構造、機能がほとんど分かっていないが、翻訳の制御や蛋白質の安定性に寄与し、発現量の調節を行うことで、Reelin-DAB1 シグナルの強さに影響を与えうることが知られている。そこで、p.G382C の蛋白質構造及び機能に対する影響を検討するため、*in silico* 構造解析と *in vitro* 機能解析を企図した。その結果、p.G382C は *in silico* 構造解析にて DAB1 蛋白質の構造変化が予測され、*in vitro* 機能解析によって蛋白質の安定性の低下を認めた。そのため、p.G382C は、適切な Reelin-DAB1 シグナル伝達に障害をきたし、脳発生中の神経細胞遊走や層構造形成に影響を与えうる変異であることが示唆された。

一方 p.V129I は、Reelin-DAB1 シグナルにおいて重要な役割を果たす PTB ドメイン内に存在しているが、健常者データベースに存在することに加え、関連解析でも、健常対照者群で患者群とほぼ同数同定され、疾患とは関連性は示唆されなかった。

#### 【結語】

日本人の SCZ 患者と ASD 患者を対象に *DAB1* 遺伝子内の稀な SNV を探索し、2 つの稀なミスセンス変異を同定した。関連解析にて統計学的な有意差は認められなかったが、p.G382C は患者群のみで同定された。さらに、p.G382C は、DAB1 蛋白質の構造変化と安定性低下を生じさせることで、SCZ や ASD の発症に関与する可能性が示唆された。今後は、SCZ や ASD の発症に関与する分子病態を解明するため、サンプルサイズの拡大に加え、Reelin-DAB1 シグナル経路の他の遺伝子を含めた包括的ゲノム解析が必要である。