

研 究 報 告 書

「脳神経系細胞分画技術を基盤とした体細胞変異の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 文 東 美 紀

1. 研究のねらい

従来の生物学では、同一個体内のすべての細胞や組織は、免疫系細胞など一部の例外を除いて、同一のゲノム配列を持つと考えられてきた。しかし近年のゲノム解析技術の急速な進展により、ゲノム配列はすべての細胞において同一ではなく、一塩基変異(SNV)やコピー数変異(CNV)など、様々な種類の体細胞変異を含んでいることが明らかになりつつある。脳神経系細胞のゲノム DNA ではこれらに加えて染色体異数性やレトロトランスポソンの新規挿入など、脳神経特異的な体細胞変異が生じることが知られており、高次脳機能や精神神経疾患の病因・病態と密接に関連していると考えられている。これらの現象は稀な頻度で、かつ単一細胞レベルで生じると考えられることから、体細胞変異の研究には単一細胞ゲノム解析が必須である。しかし脳組織では、1) 機能・構造・形態の異なる多様な神経系細胞、グリア系細胞が混在していること、また、2) 脳神経系細胞に特化した高精度の単一細胞ゲノム解析技術が存在しないこと、の 2 点の制約から特殊な例を除き詳細はほとんど明らかにされていない。本課題では、これらの問題を克服する技術開発に取り組み、脳神経系単一細胞ゲノム解析のための基盤技術の確立を行い、生理条件下のさまざまな脳細胞種における体細胞変異のランドスケープを明らかにすることを目指した。

また我々は統合失調症患者の神経細胞において、レトロトランスポソンの一種である LINE-1 のゲノムコピー数が健常者より増大していること、患者脳における LINE-1 の新規挿入部位はシナプス関連遺伝子など、神経機能に重要な遺伝子の近傍に多いことを見出している。本成果は脳神経系における体細胞変異と統合失調症との関連を初めて示したものである。この結果は多数の細胞を使用して得られたものであったが、単一神経細胞ゲノム解析による詳細な解析を行うことにより、細胞種ごとに細胞の形態・機能を変化させるゲノム変異を同定することが可能になり、統合失調症の病因・病態理解のための新たな視点を示すことができると考える。本課題では、確立した脳神経系単一細胞ゲノム解析技術をもとに、統合失調症患者のさまざまな脳細胞における LINE-1 新規挿入部位の決定を行い、疾患との関連について詳細に明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

ヒトの脳組織を構成しているさまざまな種類の細胞から、シングルセルレベルのゲノム解析を可能にするため、ヒト死後脳前頭葉組織から神経細胞・オリゴデンドロサイト・活性化型マイクログリア・アストロサイト由来のそれぞれの細胞核を分画する手法の確立を行った。

単一細胞核に含まれる DNA は超微量であるため、ゲノム解析を行うためには DNA を増幅する必要がある。そこで上記の方法で得られたヒト脳由来の単一細胞核から、均一な全ゲノ

ム増幅を行うための条件の最適化を行った。

健常者前頭葉由来の単一神経細胞核から、上記の方法で全ゲノム増幅した DNA を使用し、次世代シーケンサーを使用して全ゲノムシーケンスを行い、体細胞一塩基変異(SNV)の検出を行った。その結果、ヒトの単一神経細胞核から、1500-3000 個程度の体細胞 SNV が検出された。これらの変異は細胞腫・部位特異的であり、神経細胞分画に数 10%程度の頻度で検出されたが、ほかの細胞種や位置が離れた組織片では検出されなかった。

また増幅した単一脳細胞核由来の全ゲノム増幅 DNA を用いて、ヒト特異的な LINE-1 である L1Hs の新規挿入位置を決定するための技術である L1Hs-seq 法の開発を行った。健常者前頭葉の神経細胞・オリゴデンドロサイト・マイクログリア由来の単一細胞核から L1Hs-seq を行い、新規 L1Hs 挿入位置の解析を行った。その結果、どの細胞種においても 1 個の細胞当たり数 10ヶ所程度の新規 L1Hs 挿入が見られ、細胞ごとに挿入位置は異なっていた。このように、健常者の脳細胞でも、さまざまな体細胞変異が検出されており、ゲノム配列は 1 細胞ごとにわずかに異なっていることが示された。

このような体細胞変異が統合失調症の病因に関与している可能性を検討するため、統合失調症患者前頭葉の単一神経細胞核 DNA を用いて、L1Hs 新規挿入の位置の解析を行った。その結果、これまで統合失調症患者で変異が報告されている遺伝子に L1Hs 挿入が検出された。このような神経細胞の一部で生じている L1Hs 挿入が疾患に関与する可能性が示された。

(2) 詳細

1. 健常者死後脳を用いた多種細胞核の分画技術の確立

ヒト死後脳組織からさまざまな細胞腫由来の細胞核を調製する方法の確立を行った。前頭葉組織をホモジナイズし、パーコール密度遠心勾配法を用いて粗細胞核画分を生化学的に調製したのち、神経細胞・オリゴデンドロサイト・活性化型マイクログリア・アストロサイトの細胞核に特異的に発現しているマーカー分子に対する抗体で蛍光染色を行い、セルソーターで分画を行った。その結果、それぞれの陽性画分の細胞核を安定して得ることが可能になった (Fig.1)。

2. ヒト死後脳由来の単一神経細胞からの全ゲノム増幅

単一細胞核に含まれる DNA は超微量であるため、ゲノム解析を行うためには全ゲノム増幅 (Whole Genome Amplification; WGA) する必要があるが、単一細胞からの全ゲノム増幅では、2 つのアレルのうち 1 つのアレルが増幅しないアレルドロップアウトと呼ばれる現象など、不均一な増幅が起きやすい問題が指摘されている。そのため均一な全ゲノム増幅を行うための条件の最適化を行った。マイクロ流路デバイスであるフリューダ임社の C1 装置を使用し、単一細胞核から全ゲノム増幅を行った。その結果、単一細胞核に含まれる約 6 pg の DNA を約 100 ng に増幅することが可能になった。得られた全ゲノム増幅産物について、96 カ所の SNP のタイピングを行い、ヘテロ SNP のコール率からアレルドロップアウト率の算定を行い、均一に増幅している産物を得ることが可能になった。

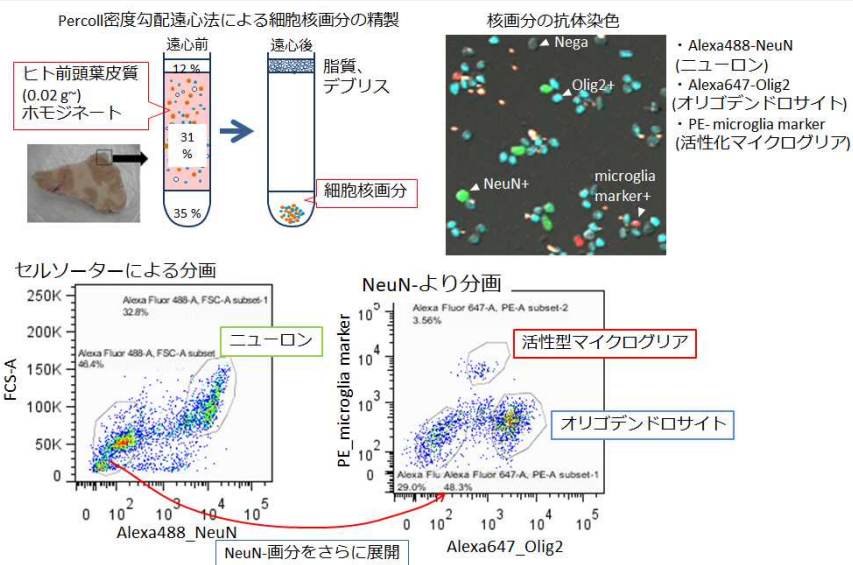


Fig.1 ヒト脳組織からのさまざまな細胞種由来の細胞核分画の例

3. 健常者前頭葉由来単一細胞核の全ゲノムシーケンス

健常者死後脳由来の単一神経細胞核から全ゲノム増幅した DNA を使用し、次世代シーケンサーNovaSeq を使用して全ゲノムシーケンスを行い、体細胞一塩基変異(SNV)の検出のパイプラインの構築などを行った。その結果、ヒトの単一神経細胞核において、1500-3000 個程度の体細胞 SNV が検出された。元の組織片由来 DNA における変異頻度を調べたところ、これらの変異は細胞腫・部位特異的であり、神経細胞分画のみで 13-64%の頻度で変異が検出され、ほかの細胞種や組織では検出されなかった。これらの変異は神経細胞に分化する前駆細胞の段階で生じていることが予測された。

4. 健常者・統合失調症患者前頭葉単一細胞の LINE-1 新規挿入部位の決定

単一脳細胞核由来の全ゲノム増幅産物を用いて、ヒト特異的な LINE-1 である L1Hs の新規挿入位置を決定するための技術である L1Hs-seq の開発を行った。健常者前頭葉の神経細胞・オリゴデンドロサイト・マイクログリア由来の単一細胞核から L1Hs-seq を行い、新規 L1Hs 挿入位置の解析を行った。その結果、どの細胞種においても、1 個の細胞当たり 40-60 個程度の新規 L1Hs 挿入が見られ、細胞ごとに挿入位置は異なっていた。またいずれの細胞種においても、神経関連遺伝子の近傍に新規挿入が多く検出された (Fig.2)。

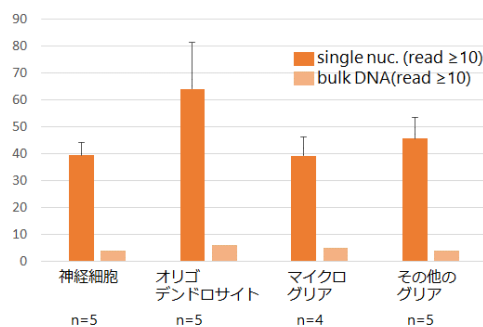


Fig.2 単一脳細胞における新規挿入L1Hsの数

精神神経疾患患者ではない日本人(93歳、女性)の死後脳前頭葉から、神経細胞、オリゴデンドロサイト、マイクログリア、その他のグリアの単一細胞核から増幅したDNA、それぞれの細胞種核画分バルクDNAを使用してL1Hs-seq法で解析を行なった。ヒトリファレンス配列 hg38・既存LINE-1データベースにないL1Hsを新規挿入とした。

このような体細胞変異が統合失調症の病因に関与している可能性を検討するため、統合失調症患者前頭葉 (n=1)の単一神経細胞核由来 DNA (n=6)を用いて、L1Hs が新規挿入したゲノム領域の同定を行った。その結果、1 つの神経細胞において、統合失調症患者で変異が報告されている遺伝子の 3' UTR に L1Hs 新規挿入が検出された。この神経細胞ではこの遺伝子の発現などに異常があったと考えられ、神経細胞の機能や形態が変化していた可能性がある。このような神経細胞の一部で生じている L1Hs 挿入が、疾患の発症に寄与する可能性が示された。

3. 今後の展開

今回の研究において、ヒト前頭葉の単一細胞からさまざまな体細胞変異が検出され、これらの変異の一部が脳神経疾患の病因に関与している可能性が示された。しかし今回の解析では、脳組織片をホモジナイズして細胞核を調製しているため、組織内における細胞の位置情報を失ってしまっている。脳神経疾患の病因解明においては、体細胞変異が生じた細胞の位置情報は重要であり、変異を持つ細胞が含まれる神経回路を同定することが必要になると考えられる。今後は、脳組織内における細胞の位置関係を保ったまま、体細胞変異解析を可能にするための技術開発を検討し、疾患に関与する神経回路の同定などにつなげていきたい。

4. 自己評価

脳組織由来のさまざまな種類の単一細胞核から一塩基変異や LINE-1 挿入などの体細胞変異を検出する手法の開発、その技術を使用した健常者・統合失調症患者由来脳細胞の体細胞変異解析など、当初予定していた研究計画について一通りの結果が得られた。研究実施体制についても当初の計画通りであり、研究費執行も適切に行った。今回開発した手法は、脳神経疾患に限らず、体細胞変異の関与が疑われている他の疾患（例えばがんなど）の病因解明に寄与する可能性があり、将来の医療に貢献するものとする。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishioka M, Bundo M, Ueda J, Yoshikawa A, Nishimura F, Sasaki T, Kakiuchi C, Kato T, Iwamoto K. Identification of somatic mutations in monozygotic twins discordant for psychiatric disorders. npj Schizophrenia, 2018, volume 4, Article number: 7
2. Nishioka M, Bundo M, Ueda J, Katsuoka F, Sato Y, Kuroki Y, Ishii T, Ukai W, Murayama S, Hashimoto E, Nagasaki M, Yasuda J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Identification of somatic mutations in postmortem human brains by whole genome sequencing and their implications for psychiatric disorders. Psychiatry and Clinical Neurosciences, 2018, 72: 280–294
3. Nishioka M, Bundo M, Iwamoto K, Kato T. Somatic mutations in the human brain: implications for psychiatric research. Molecular Psychiatry, 2019, 24: 839–856

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表:Miki Bundo, Tadafumi Kato, Kazuya Iwamoto “LINE-1 copy number analysis of schizophrenic patients” More Epigenetics in Clinical Medicine (スウェーデン、ストックホルム、2017/4/28)

受賞:平成 28 年度 熊本大学女性研究者賞表彰「精神疾患患者における脳特異的なゲノム変異の解析」

著作物:Miki Bundo, Tadafumi Kato, Kazuya Iwamoto “Estimation of LINE-1 Copy Number in the Brain Tissue and Isolated Neuronal Nuclei Genomic Mosaicism in Neurons and Other Cell Types” Neuromethods, 2017, vol. 131, 209–217

文東美紀、岩本和也「ヒト死後脳のさまざまな細胞種におけるゲノム・エピゲノム研究」, バイオイノベーションに向けて, 2019, シーエムシー出版, p223–229