

平成30年6月1日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09801

研究課題名(和文)統合失調症患者前頭葉ゲノムにおけるLINE-1挿入部位の決定

研究課題名(英文) Detection of novel LINE-1 insertion in prefrontal cortex of patients with schizophrenia

研究代表者

文東 美紀 (Bundo, Miki)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：00597221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1)は、ヒトゲノムの約17%を占めるレトロトランスポゾン配列の一種である。本課題では、体細胞レベルでLINE-1が新規に挿入したゲノム領域を決定する技術の確立を目的とした。健常者前頭葉の神経細胞・非神経細胞を使用した解析の結果、LINE-1新規挿入は1細胞あたり数十ヶ所程度検出され、また挿入されているゲノム部位は細胞種によって異なる特徴があった。今後はこの技術を用いて、LINE-1コピー数が増大していることが報告されている統合失調症患者前頭葉のゲノムDNAについて解析を行い、疾患発症における影響を検証していく。

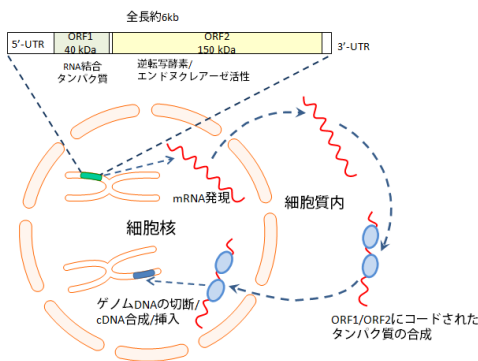
研究成果の概要(英文)：We recently reported that the copy number of long interspersed nucleotide element (LINE-1) retrotransposon was higher in the neurons of patients with schizophrenia than in the neurons of healthy controls. The purpose of this study is to detect the somatic insertion sites of LINE-1 using human postmortem brains. We developed a new method to identify the brain-specific LINE-1 insertion genomic site. Using this method, we detected 83.8% (720/859) of LINE-1 found in the reference human genome sequence (hg38) and 30-80 of unknown non-reference somatic LINE-1 insertions in single neuronal nuclei from prefrontal cortex of a human without any psychiatric diseases. We have been conducting a case-control study using postmortem brain samples from patients with schizophrenia and controls to clarify the role of somatic LINE-1 insertions in the pathogenesis of schizophrenia.

研究分野：分子精神医学

キーワード：統合失調症 死後脳 LINE-1 レトロトランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

Long interspersed nuclear element-1 (LINE-1 または L1) は、レトロトランスポゾン的一种であり、ヒトゲノム中に約 50 万コピーが散在しており、単独の配列としては最大の領域 (約 17%) を占めている。全長 6kb の配列であり、エンドヌクレアーゼおよび逆転写酵素がコードされている。LINE-1 は核内でゲノムから mRNA に転写され、細胞質内へ移動後、コードされたタンパク質が翻訳されたのち mRNA との複合体として核内に戻り、ゲノムの他領域の切断・cDNA 合成・ゲノム DNA への挿入という機構で、自らの配列をゲノム中に増幅させることができる (図 1)。

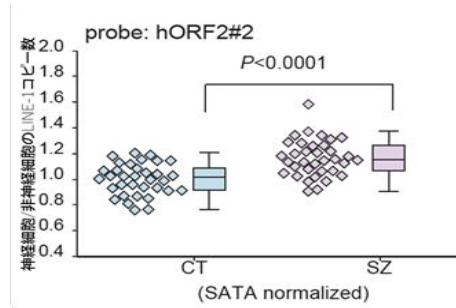


<図1> LINE-1 の増幅様式

これまで、LINE-1 の増幅は生殖細胞や発生初期のみ限定的に起きており、頻度も稀であると考えられてきた。しかし 2009 年に成体内においても、神経前駆細胞において LINE-1 の増幅が起きていることが示され、ヒトの同一個体の脳以外の組織と比較すると、脳組織において LINE-1 のコピー数が増加していることが報告された (Coufal et al., 2009)。さらにレット症候群や、毛細血管拡張性運動失調症といった神経疾患患者死後脳においても、健常者と比較すると LINE-1 コピー数の増幅が亢進している例が報告され、疾患の病因に関与している可能性も考慮されるようになった。

我々は精神疾患の病因にも LINE-1 の増幅が関与している可能性を検証するために、統合失調症・双極性障害・大うつ病患者の前頭葉から得られた DNA を用いて、LINE-1 コピー数の定量を行った。その結果、健常者と比較して疾患患者群ではコピー数が増幅していることが分かった。この LINE-1 増幅が神経細胞・非神経細胞のいずれで起きているかを検証するため、特に顕著な差が認められた統合失調症患者前頭葉サンプルをセルソーターで神経細胞核・非神経細胞核に分画したのち、LINE-1 のコピー数を定量したところ、神経細胞において LINE-1 の増幅が起きていることが示された (図 2, Bundo et al., 2014)。

さらに次世代シーケンサーを使用して、前頭葉 DNA の全ゲノム塩基配列を解読したところ、統合失調症の患者 (n=3) では、シナプ



<図2> 統合失調症前頭葉における LINE-1 コピー数の増幅

ス関連遺伝子など、神経機能に関連する遺伝子の近傍に LINE-1 の挿入が多く認められた。このような LINE-1 の挿入によって、近傍の遺伝子の発現状態が変化したり、遺伝子構造が破壊されて機能不全に陥ることによって、疾患が発症する可能性が考えられる。しかしこの時の解析で得られた LINE-1 挿入部位のゲノム位置情報は、解像度が数 kb 程度と低く、挿入部位を塩基配列レベルで決定することはできなかった。また全ゲノムをシーケンスする方法は、多額の費用が必要となるため、多サンプルの解析を行うことは困難である。

2. 研究の目的

本研究では、1. LINE-1 挿入部位の決定に特化した次世代シーケンス解析の手法の開発、2 健常者前頭葉を用いた細胞種ごとの LINE-1 新規挿入ゲノム部位の解析、を目的とした。また将来的に統合失調症患者前頭葉における新規 LINE-1 挿入を 1 塩基レベルで同定し発症における LINE-1 挿入の影響を検証することを目的としている。

3. 研究の方法

1. LINE-1 挿入ゲノム部位決定法の確立

ヒトに特異的な LINE-1 配列 (L1Hs) の挿入部位の決定を行うための実験手法である、L1Hs-seq のプロトコルの最適化を行った。この方法では L1Hs の 3' UTR に特異的なプライマーを使用し、3' 方向にプライマー伸長反応を行った後、アダプターライゲーション・PCR を行うことによって、L1Hs の 3' UTR とその 3' 側に隣接するゲノム領域を増幅する。この産物を次世代シーケンサーで解析することにより、L1Hs の挿入部位を網羅的に 1 塩基レベルで解析することが可能になる。今回は、将来的にハイスループット化を目指すことを考え、使用 DNA 量の減量化やプロトコルの簡略化などの改良を行った。得られたライブラリーは、illumina 社 MiSeq を使用してシーケンスを行い、L1Hs 挿入部位を検出するために必要なリード数などの検証を行った。

2. 健常者死後脳を用いた細胞種ごとの LINE-1 新規挿入ゲノム部位の解析

健常者死後脳 (n=1) の前頭葉から、細胞核画分を調製し、それぞれのマーカー分子を蛍光抗体で染色した後、神経細胞・オリゴデンドロサイト・活性型マイクログリア・その他の

非神経細胞由来の細胞核をフローサイトメトリーで分画した。フリーダム社 C1 を使用して、単一細胞核から全ゲノム増幅を行った後、1. で確立した手技を使用して、L1Hs-seq を行った。それぞれの細胞ごとに L1Hs 挿入部位の決定を行い、細胞種特異的な L1Hs 新規挿入ゲノム部位の解析を行った。

4. 研究成果

1. LINE-1 挿入ゲノム部位決定法の確立

上記の方法で、健常者前頭葉(n=1)の神経細胞由来バルク DNA から改良版ライブラリーを作製し、MiSeq, v2, 500 bp ペアエンドのキットで run を行い、データを検証した。リードのクオリティーコントロールを行い、一定のクオリティを持つリードを使用し、リファレンス配列に対するマッピングを行った。その結果、クオリティーコントロール後の約 240 万リードから、ヒトリファレンス配列 (UCSC human genome 38) に存在する 859 ケ所の L1Hs のうち、720 ケ所(83.8%)を検出することが出来たため、十分な L1Hs の検出感度があると考えられた。また新規 L1Hs 挿入 (ヒトリファレンス配列や既存の LINE-1 データベースに存在しないもの) を 10 ケ所同定することができた。

2. 健常者死後脳を用いた方法の検証とデータ取得

健常者死後脳(n=1)の前頭葉から、神経細胞・オリゴデンドロサイト・活性型マイクログリア・その他の非神経細胞由来の細胞核を 5 個ずつ単離し、それぞれの単一細胞核から全ゲノム増幅を行った後、L1Hs-seq を行った。その結果、クオリティーコントロール後の約 80 万リードから、細胞によって異なるゲノム部位への新規 L1Hs 挿入が、1 細胞あたり 30-80 ケ所検出された。また L1Hs 新規挿入ゲノム部位は、細胞種によって異なる特徴を示した。今後は統合失調症患者死後脳組織を使用して、同様の解析を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Nishioka M, Bundo M, Iwamoto K*, Kato T*.

Somatic mutations in the human brain: implications for psychiatric research. Molecular Psychiatry, in press, 査読有,

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, 4:7, 2018, 査読有

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, 72:280-294, 2018, 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

文東美紀, 加藤忠史, 岩本和也、ヒト前頭様神経細胞における体細胞ゲノム変異の検出、第 123 回日本解剖学会シンポジウム「多角的視点から紐解く大脳皮質の発生と機能」(2018 年 3 月 28 日 ~ 30 日、日本医科大学、東京)

文東美紀、上田順子、西岡将基、清田恵美、石井貴男、鶴飼渉、橋本恵理、笠井清登、加藤忠史、岩本和也、ヒト死後脳を用いたシングルセルレベルの LINE-1 新規挿入同定の試み、第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会 (2017 年 9 月 28 日 ~ 30 日、札幌コンベンションセンター、北海道)

Bundo M, Ueda J, Nishioka M, Kiyota E, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Detection of retrotransposon by next generation sequencing and its application to single brain cells. 第 40 回日本神経科学学会大会 (2017 年 7 月 20 ~ 23 日、幕張メッセ、千葉)

Bundo M, Kato T, Iwamoto K. LINE-1 copy number analysis of schizophrenic patients. More Epigenetics in Clinical Medicine, The 2nd Tore Nilson/Karolinska Institutet conference in Nobel Forum on clinical epigenetics (April 26-28, 2017, Stockholm, Sweden)

文東美紀、石井貴男、鶴飼渉、橋本恵理、笠井清登、加藤忠史、岩本和也、ヒト死後脳由来のニューロン・オリゴデンドロサイトを使用したシングルセルゲノム解析、第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会 (2016 年 9 月 8~10 日、福岡国際会議場、福岡)

Bundo M, Ueda J, Miyauchi T, Ishii T, Ukai W, Hashimoto E, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation analysis of neuron and oligodendrocyte from human postmortem brains. 第 39 回日本神経科学大会 (2016 年 7 月 20 ~ 22 日、パシフィコ横浜、神奈川)

Bundo M, Kato T, Iwamoto K. Brain

genome and epigenome analyses in psychiatric disorders 第 38 回日本神経科学大会(2015年7月28~31日、神戸国際会議場、兵庫)

文東美紀、宮内妙子、笠井清登、加藤忠史、岩本和也、ヒト死後脳を用いたオリゴデンドロサイトのDNAメチル化解析(2015年5月25~26日、日本エピジェネティクス研究会第9回年会、東京一ツ橋学術総合センター、東京)

〔図書〕(計2件)

Bundo M*, Kato T, Iwamoto K. Estimation of LINE-1 Copy Number in the Brain Tissue and Isolated Neuronal Nuclei. In: Frade J., Gage F. (eds) Genomic Mosaicism in Neurons and Other Cell Types. Neuromethods, 2017 vol 131. Humana Press, New York, NY, 査読無し

Bundo M*, Kato T, Iwamoto K. Cell Type-Specific DNA Methylation Analysis in Neurons and Glia. In: Karpova N. (eds) Epigenetic Methods in Neuroscience Research. Neuromethods, 2016 vol 105. Humana Press, New York, NY, 査読無し

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<https://www.molbrain.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

文東 美紀 (Bundo, Miki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：00597221

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

岩本 和也 (IWAMOTO, Kazuya)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：40342753

笠井 清登 (KASAI, Kiyoto)

東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：80322056

加藤 忠史 (KATO, Tadafumi)
理化学研究所・脳科学研究センター・チームリーダー
研究者番号：30214381

(4) 研究協力者

上田 順子 (UEDA, Junko)
清田 恵美 (KIYOTA, Emi)