

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15424

研究課題名(和文) 精神疾患患者死後脳単一神経細胞における体細胞変異解析の試み

研究課題名(英文) Development of techniques for analyzing somatic mutations in single neurons of psychiatric disorders

研究代表者

岩本 和也 (Iwamoto, Kazuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：40342753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞に生じている体細胞変異の生理的・病理的意義を評価するには、様々な脳神経系細胞において単一細胞レベルでの解析を精密に行い、頻度やパターン情報を取得する必要がある。本研究課題では、単一脳神経細胞における体細胞変異解析に必要な、脳試料の前処理、単一神経細胞核の取得、全ゲノム増幅、データ解析に至る一連の解析パイプラインの確立を行った。精神疾患の病因・病態との関連解明に向けて有用な技術であると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate the physiological and pathological significance of somatic mutations occurring in brain cells, it is necessary to analyze frequency and pattern at the single cell levels in various types of brain cells. In this research project, we have established a series of analytical pipelines from pretreatment of brain samples, isolation of single neuronal nuclei, whole genome amplification, and data analysis of whole genome sequencing. These will be useful for clarifying the role of somatic mutations in the psychiatric disorders.

研究分野：精神医学

キーワード：体細胞変異 統合失調症

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトの神経細胞は一塩基多型 (SNP)、コピー数多型 (CNV)、染色体異数性、微小決失、核酸含有量、トランスポゾン転移などについて、一部の細胞で多型性が生じているが他の神経細胞や組織では生じていないといった体細胞変異が認められることが明らかになっている (Muotri and Gage, Nature 2006, Poduri et al., Science 2013)。体細胞変異の機能的意義は明らかではないが、AKT 遺伝子の体細胞変異により片側巨脳症が生じること、また染色体異数性の異常が精神神経疾患で観察されていること、トランスポゾン LINE-1 の神経細胞におけるコピー数がレット症候群患者の死後脳で増大していることなど、精神神経疾患と密接に関連している可能性が報告されている。申請者らも過去の挑戦的萌芽研究での課題が端緒となり、統合失調症患者神経細胞で LINE-1 のゲノムコピー数が増大していることを見出し、LINE-1 の新規挿入が神経機能に重要な遺伝子群に生じていることを明らかにした (Bundo et al, Neuron 2014)。したがって体細胞変異を評価するにあたっては、様々な脳神経系細胞において単一細胞レベルでの解析を精密に行い、頻度やパターン情報を取得する必要があると考えられる。現在、脳神経系の単一細胞レベルでのゲノム研究は、海外において数例予備的な報告がなされており、トランスポゾン測定と CNV 測定が行われているが厳密な品質管理下で包括的な検討や精密な頻度測定は行われておらず、新規細胞単離技術と高品質な細胞核単離技術を利用した本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、精神疾患の病因・病態との関連解明に向けて、単一脳神経細胞における体細胞変異解析技術を確立する。

3. 研究の方法

ヒト死後脳単一神経細胞での体細胞変異解析技術の確立を主眼として、高品質の単一核を神経細胞 (NeuN 陽性) より取得し、単一細胞全ゲノム増幅反応と品質管理後、全ゲノム解析を行う。検体は米国スタンレー財団より入手した健常者死後脳前頭葉試料を使用する。

4. 研究成果

ヒト死後脳からの単一神経細胞核の単離と全ゲノム増幅の条件検討を行った。ヒト死後脳試料は米国スタンレー財団より入手した健常者前頭葉試料を使用した。凍結死後脳前頭葉試料から粗細胞核成分を調整し、蛍光標識を行った NeuN 抗体、Olig2 抗体で処理を行った。NeuN 陽性/Olig2 陰性群を神経細胞核、NeuN 陰性/Olig2 陽性群をオリゴデンドロサイト核、NeuN 陰性/Olig2 陰性群をその他非神経細胞群とした。

単一細胞核取得システムとして、AS One 社のセルピッキングシステムおよび、フリューダム社の C1 装置双方の利用を検討した。AS One 社のセルピッキングシステムは、展開した単一細胞核を個別に可視化・数値化した上で、高品質核の選択と取得を行うことが可能であり、一方、C1 装置はハイスループットで連続した化学反応が可能のため、下流の全ゲノム増幅反応まで装置内で進めることが可能である。双方とも良質な全ゲノム増幅反応産物を得ることができた。

全ゲノム増幅は、Qiagen 社、GE 社および他数社のシングルセル全ゲノム増幅用に商品化されているキットを用いて条件検討を行った。最終収量に加え、SNP ジェノタイピングによるヘテロ SNP コールの正答率を基に検討を行ったところ、GE 社の Genomiphi を基にした増幅キットが最も良好な成績を示した。

また、C1 装置でのプロトコールが既に確立している一般的な Taqman プローブを用いた RT-PCR 法による遺伝子発現解析を、単一神経細胞核に対して行った。単離した RNA は、品質評価が困難であり、収量が細胞全体を使用した場合よりも大幅に減少すると見込まれるが、解析した単一神経細胞核のほとんどで良好な遺伝子発現が確認された。また、体細胞変異解析の補助情報になると考えられる遺伝子発現定量データを取得できることを確認した。

ゲノム解析には、最終的にフリューダム社の C1 装置と GE 社の Genomiphi を基にした増幅キットの組み合わせを選択し、全ゲノム解析に進んだ。

健常者死後脳前頭葉サンプル (N=1) から単離した神経細胞核を出発試料として、確立した C1 装置での増幅系を用い、ヘテロ SNP コールの保存状態を指標として、良好な増幅が認められた 8 サンプルについて全ゲノム解析を行った。また、同時に同じ検体の核ソーティングを行っていない凍結脳試料から抽出したゲノム DNA (バルク DNA) の全ゲノム解析を行った。

全ゲノムシーケンスの結果、バルク DNA および全ての単一神経細胞サンプルから良好なシーケンスリードが得られた。また、単一神経細胞のシーケンスリードに顕著な品質の差異は認められなかった。通常法に従い、ヒトリファレンスゲノムへのマッピングを行った。GATK アルゴリズムにより、バルク DNA での SNP コールを行ってリスト化した後、単一神経細胞のサンプルごとに変異コールを行い、パターンをバルク DNA と比較した。その結果、それぞれのサンプルにのみ見られる変異や細胞間で共通しているがバルク DNA では認められない変異を検出した。

最終的なデータに関しては、アリアルドアップアウトや全ゲノム増幅時の複製エラーを考慮するなどの検討を通して、得られた体細胞変異候補から偽陽性を除くフィルタリ

ングの精度を上げる必要があると考えられた。一連の研究を通して、試料の前処理、単一神経細胞核の取得、全ゲノム増幅、データ解析に至る一連の解析パイプラインの確立に成功した。

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10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)

Iwamoto K. Understanding the epigenetic architecture of psychiatric disorders: modifications and beyond. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72:194, 2018 (査読無)
Doi: 10.1111/pcn.12646.

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)
DOI: 10.1038/s41537-018-0049-5

Sugawara H, Murata Y, Ikegame T, Sawamura R, Shimanaga S, Takeoka Y, Saito T, Ikeda M, Yoshikawa A, Nishimura F, Kawamura Y, Kakiuchi C, Sasaki T, Iwata N, Hashimoto M, Kasai K, Kato T, Bundo M, Iwamoto K. DNA methylation analyses of the candidate genes identified by a methylome-wide association study revealed common epigenetic alterations in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72:245-254, 2018 (査読有)
DOI: 10.1111/pcn.12645

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)
DOI: 10.1111/pcn.12632

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. (査読無)
DOI: 10.1007/978-1-4939-7280-7_11.

[学会発表](計13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(2018年3月28日、日本医科大学、東京)

西岡将基、文東美紀、笠井清登、加藤忠史、岩本和也、ヒト脳組織および一卵性双生児における体細胞変異の検出と精神障害第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、札幌コンベンションセンター、北海道)

Iwamoto K. Exploration of the pathophysiological role of epigenetic and genomic variations in brains of patients with major psychiatric disorders. The 72nd Fujihara Seminar International Symposium on Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community (September 13, 2017, Tomakomai, Japan)

岩本和也、脳ゲノムの動的特性と精神疾患の発症メカニズムの探索、第113回日本精神神経学会学術総会(2017年6月22日、名古屋国際会議場、愛知)

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, 2017, Stockholm, Sweden)

岩本和也、エピゲノム解析による精神疾患の新規病因・病態解明、第35回日本認知症学会学術集会(2016年12月1日、東京国際フォーラム、東京)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況 (計 0 件)

〔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

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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

加藤 忠史 (KATO, Tadafumi)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・

チームリーダー

研究者番号: 30214381

笠井 清登 (KASAI, Kiyoto)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80322056

(4) 研究協力者

村田 唯 (MURATA, Yui)

熊本大学・大学院生命科学研究部・博士研究員

研究員

研究者番号: 10802077

澤村 理英 (SAWAMURA, Rie)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 80509654)

清田 恵美 (KIYOTA, Emi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・技術補

佐員

内布 恵美 (UCHINUNO, Emi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・技術補

佐員

上田 順子 (UEDA, Junko)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・

技術補佐員