

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19399

研究課題名(和文)時空間的な細胞特性に基づく精神疾患の新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文)Development of a single-cell RNA sequencing method linked to spatio-temporal cellular characteristics

研究代表者

笠井 淳司(Kasai, Atsushi)

大阪大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40454649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病など精神疾患に対する新規機序の創薬開発は長年成功していない。その原因の一つとして、探索研究の方法の問題があると考えられる。本研究では、従来の仮説に基づく脳局所のオミックス解析を脱却するため、脳全体の神経活性化情報から重要な細胞集団を仮説フリーに抽出し、その空間情報を保持したままシングル細胞トランスクリプトーム解析を実施する方法論を確立した。この方法論を用いて、ストレス応答に重要な神経細胞の特徴となる分子特性を明らかにし、ストレス性精神疾患の新たな治療標的分子の候補を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近盛んに実施されているシングル細胞RNAシーケンス法は、脳組織から神経細胞を分散させる必要があるため、遺伝子発現情報と空間情報が直接つながらず、細胞の種類や状態の大きな変化を捉える程度しかできていない。本研究によって確立した遺伝子発現情報と機能・空間情報をつなげたシングル細胞解析法は、これまで停滞してきた脳疾患の新規機序の創薬に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Drug discovery for psychiatric disorders including depression and post-traumatic stress disorder has not been successful for many years. One of the reasons for this is thought to be the problem of omics research method, which is hypothesis-based analysis of local brain regions. Here, to identify therapeutic targets for psychiatric disorders, we established a methodology combining data-driven analysis of brain-wide activation mapping with single-cell transcriptome analysis linking the spatial information. Using this methodology, we revealed the molecular characteristics of an ensemble that are important for stress response, and found new candidate therapeutic target molecules for stress-induced mental disorders.

研究分野：神経薬理学

キーワード：シングル細胞 トランスクリプトーム解析 全脳 ストレス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、同じ脳領域内においても、様々な神経結合を有し、その役割は個々の細胞で異なっている。また、うつ等の精神疾患病態において、エピジェネティクスなど予想される原因による脳細胞の機能変調は、個々の脳細胞のレベルで起こる。しかしながら、従来の精神疾患モデル動物を用いた病態解析や創薬標的探索のための遺伝子発現解析は、そのほとんどが「仮説に基づいた局所脳領域に着目した解析」かつ「細胞集団の不均一性を考慮しない遺伝子発現の解析」しか実施されておらず、病態解明の理解が不足しており、新規機序の創薬開発も長年失敗しているのが現状である。従って、脳機能統合の破綻からなる精神疾患病態の解明や新たな治療標的の探索には、「脳全体の中から特に行動異常の発現に重要な細胞」と、「それらの細胞に発生する重要な遺伝子発現変化」を見出す必要があると考えられる。

うつ病の患者数は年々増加し、その約3割の患者が治療抵抗性を示すことから、医療ニーズは高い。うつ病の総社会負担は甚大ながら成因・病態機構や治療機序は未解明で、新規機序の創薬開発も長年失敗しており、抗うつ薬の新たな治療標的が求められている(Reardon et al, Nature 2015)。これまでに我々は、「脳全体の中から特にうつ様行動の発現に重要な細胞」を見出すため、全ての脳細胞を検出する高速高精細全脳イメージングシステムを開発し、うつ病モデルやうつ病発症に関わるストレス応答時の全脳神経活動マップを作製した。活動パターンを用いた情報科学的解析から、機能がほとんど不明である脳領域「前障」の神経活動がうつ様行動の発現に最も寄与することを見出した。さらに、「前障」のストレス応答性神経細胞の活動操作により、うつ様・不安様行動を制御することにも成功した。

## 2. 研究の目的

本研究では、「脳機能の破綻に最も重要な細胞群を同定し、その時空間的な分子レベルの細胞特性を計測する斬新な方法論を確立」し、そこから見出される分子・神経基盤を基に、抗うつ薬の新規治療標的・治療戦略を提唱することを目指す。

## 3. 研究の方法

7~13週齢のC57BL/6Jを遺伝的背景とする、Arc-dVenus 雄性マウスを使用した。飼育条件は室温  $22 \pm 1$ 、照明12時間(点灯午前8時から20時)とし、餌と水を自由に摂取させた。なお、動物の飼育、実験等はすべて大阪大学動物実験規定を遵守し、大阪大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

Arc-dVenus マウスに、全脳感染性アデノ随伴ウイルスベクターAAV-php.eB-CaMKIIa-tdTomatoを尾静脈から投与し、興奮性神経細胞を赤色蛍光蛋白質で標識した。ストレスに応答する神経細胞を得るために、精神的なストレスモデルとして、10分間の体格の大きい攻撃的なマウスに暴露させる社会的敗北ストレスを用いた。AAVを感染させたArc-dVenus マウスに社会的敗北ストレスを負荷後、dVenusの蛍光強度が最も高くなる5時間後に脳を摘出した。脳冠状切片(150  $\mu\text{m}$ )を作成後、顕微鏡下にて分取し、うつ様行動の発現制御に関わる前障のストレス応答性神経細胞および非応答性神経細胞のシングル細胞トランスクリプトーム解析を行った。得られた次世代シーケンズデータは、国立遺伝学研究所スーパーコンピュータシステム内のSingularityコンテナに構築した環境を用いて実施した。その後の次元圧縮およびクラスタリング等の遺伝子発現の特徴抽出は、CIBERSORTやSEURATを用いた。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) In vivo シングル細胞の分取法の構築

脳を摘出後、冷却したシュクロースペースの人工脳脊髄液中にて冠状切片を作成した。その後、蛍光顕微鏡下にて、RNase 阻害薬等を含む PBS で充填したガラスキャピラリーを用いて、蛍光標識された1つの細胞を分取した( 図 1 )。その後、2 $\mu$ l の細胞溶解緩衝液を入れたシリコンコートチューブ内にて、キャピラリーの先端を折り、細胞を溶解させた。この方法を用いて、dVenus 陽性細胞をストレス応答性の前障神経細胞として、tdTomato 陽性 dVenus 陰性細胞をストレス非応答性前障神経細胞として分取した。

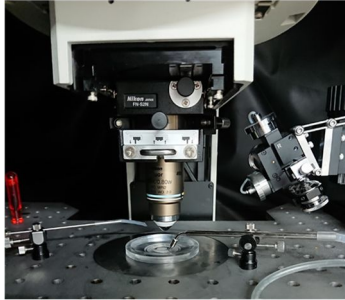


図 1. 冷却した緩衝液を灌流し、蛍光標識された細胞を分取する装置の一部の写真

### ( 2 ) シングル細胞 RNA シークエンス解析

( 1 ) の方法にて溶出した細胞ごとの total RNA を、改良した Smart-seq2 プロトコルを用いて逆転写し cDNA を合成し、Tks Gflex DNA ポリメラーゼを用いて 18 回増幅させた。AMPure XP beads を用いて精製後、TapeStation を用いてライブラリサイズを測定した。dsDNA フラグメンターゼにて cDNA を断片化後、再度 TapeStation を用いてライブラリサイズを測定した。

次に、得られた断片化 cDNA ライブラリーを用いて、NEBNext Ultra II DNA library Prep Kit for the Illumina protocol に従って、次世代シーケンスのためのライブラリーを作成した。その際、同時にシーケンスができるように 48 または 96 マルチプレックス用にバーコードを付与し、混合後、次世代シーケンサー Illumina HiSeq4000 を用いてシーケンスを行った( 150 pair-end )。各細胞群 ( ストレス応答、非応答前障細胞それぞれ 48 細胞 ) の平均リード数は、2,800,396 reads であった。

得られた raw read のデータから、Cutadapt ( ver. 1.15 ) を用いてアダプター配列を除去し、Bowtie2 ( ver. 2.3.3.1 ) を用いて rRNA 配列を除去した。その後、HISAT2 ( ver. 2.1.0 ) を用いてマウスリファレンスゲノム ( mm10 ) にマップし、featureCounts ( ver. 1.6.0 ) を用いて、各遺伝子の read 数をカウントした。この結果、各細胞の平均リード数は、1,708,083 reads であり、11,194 遺伝子が検出された。raw reads に対するマップ率が 60% を超えており、良好なシングル細胞シーケンスが達成できたことが示された。

今回分取した細胞が、前障神経細胞であるか、方法論の精度を客観的評価するため、米国 Allen 研究所が公開しているシングル細胞トランスクリプトーム解析のデータと比較した。米国 Allen 研究所データベースから前障としてラベルされた 796 細胞、前障に隣接する島皮質の 226 細胞のデータを、scPred ( ver. 1.9.0 ) を用いて学習させ今回分取したデータセットの予測を行った結果、90% 以上の細胞が前障と識別された。

これらの結果から、脳内の場所情報を保持したままシングル細胞トランスクリプトーム解析ができる方法論の構築が達成できたことが示された。

### ( 3 ) ストレス応答、非応答前障神経細胞の分子特性解析

得られた遺伝子発現プロファイルを、ZINB-WaVE (ver. 1.8.0)およびDESeq2 (ver. 1.26.0)を用いて発現変動遺伝子として抽出した。少なくとも5つの細胞で5 counts未満の遺伝子は除外し、adjusted P値が0.05未満の遺伝子を変動遺伝子として同定した。その結果、ストレス応答前障神経細胞に多く発現する分子として、複数の候補遺伝子を同定することに成功した。

以上より、本研究で構築した、脳組織の新たなシングル細胞トランスクリプトーム解析を通じて、ストレス性精神疾患等の脳疾患病態の理解や治療標的分子の同定に貢献できる可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Seiriki Kaoru, Kasai Atsushi, Nakazawa Takanobu, Niu Misaki, Naka Yuichiro, Tanuma Masato, Igarashi Hisato, Yamaura Kosei, Hayata-Takano Atsuko, Ago Yukio, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Whole-brain block-face serial microscopy tomography at subcellular resolution using FAST	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Protocols	6. 最初と最後の頁 1509 ~ 1529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41596-019-0148-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanuma Masato, Kasai Atsushi, Bando Kazuki, Kotoku Naoyuki, Harada Kazuo, Minoshima Masafumi, Higashino Kosuke, Kimishima Atsushi, Arai Masayoshi, Ago Yukio, Seiriki Kaoru, Kikuchi Kazuya, Kawata Satoshi, Fujita Katsumasa, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Direct visualization of an antidepressant analog using surface-enhanced Raman scattering in the brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e133348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.133348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Niu Misaki, Kasai Atsushi, Seiriki Kaoru, Hayashida Misuzu, Tanuma Masato, Yokoyama Rei, Hirato Yumi, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 44
2. 論文標題 Altered Functional Connectivity of the Orbital Cortex and Striatum Associated with Catalepsy Induced by Dopamine D1 and D2 Antagonists	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 442 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-01006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 笠井淳司、橋本均
2. 発表標題 全脳活動マッピングを用いた情動行動制御機構の解明
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanuma M et al
2. 発表標題 単一細胞 RNA seq によるストレス応答性神経細胞の特性解析
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanuma et al
2. 発表標題 In vivo imaging of alkynylated S-Citalopram using surface-enhanced Raman scattering
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科 神経薬理学分野 ホームページ <a href="http://molpharm.umin.jp/">http://molpharm.umin.jp/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奥野 浩行  (Okuno Hiroyuki)  (80272417)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授   (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------