

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22580

研究課題名(和文) マウス中枢神経組織における細胞選択的RNA発現プロファイル解析法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the method for RNA labelling in a neuron subtype-specific manner in vivo

研究代表者

河原 行郎 (Kawahara, Yukio)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80542563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患では特定の神経細胞選択的な変性が認められるが、その理由は依然として不明であり、病態解明の障壁となっている。これには、個々の神経細胞の特徴をRNA発現プロファイルの観点から明らかにすることが重要である。本研究では、特定の神経細胞に発現するRNAを高精度に回収するためのラベリング手法を新たに開発することに挑戦した。小脳プルキンエ細胞を標的にラベリングの条件やRNA回収方法を種々検討した結果、マーカー遺伝子の存在は確認できた。しかし、現状ではノイズが高く、一層の改善が必要である。今後は、シーケンス手法や情報解析を工夫して、更に精度の高い手法を確立することを継続して進めていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、単一細胞や単一核の遺伝子発現を網羅的に解析できるようになった。その一方で、分離せずに生体内の特定の細胞だけの遺伝子発現情報を得ることは依然として困難である。また、神経細胞については軸索やシナプスに分布するRNAの情報を得ることはできない。本手法が実現されれば、それぞれの細胞種の遺伝子発現プロファイルを特徴付けることができる。また、疾患モデルマウスに適用すれば、パーキンソン病やALS発症の鍵を握る遺伝子を同定できる可能性もある。その結果として治療法の確立へと繋がることも期待できることから、高い意義をもった内容だと考える。

研究成果の概要(英文)：Selective degeneration of certain specific neurons is a common feature found in neurodegenerative diseases. However, the causative mechanisms remain elusive, which hampers the understanding of disease pathogenesis and the establishment of therapeutic strategies. In this context, it is crucial to characterize individual neuronal subtypes in terms of their RNA expression profiles. In this study, we challenged ourselves to develop a novel RNA labeling method to collect RNAs from certain specific neurons with high accuracy. We chose cerebellar Purkinje cells as a control and examined various labeling conditions and RNA recovery methods. As a result, we were able to confirm the presence of marker genes expressed in Purkinje cells. However, the background noise caused by contaminated non-specific RNAs remains high, which needs further improvement. We will continue to devise sequencing methods and bioinformatics analyses for establishing the corresponding method with higher accuracy.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：遺伝子発現 RNAラベリング マウス 中枢神経

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS)などの神経変性疾患は、高齢化社会の到来により今後益々患者数が増加すると考えられ、病態解明と治療法確立が社会的に強く望まれている。これらの神経変性疾患では、特定の神経細胞選択的な変性が認められるが、その理由は依然として不明であり、病態解明の障壁となっている。これには個々の神経細胞の特徴を、RNA 発現プロファイルの観点から明らかにすることが重要である。

これまで脳脊髄組織から特定の神経細胞を単離するに当たっては、レーザーマイクロダイセクション (LMD)法や蛍光標識した細胞のソーティング (FACS)法などが用いられてきた。LMD 法は生細胞としては回収できず、回収できる細胞数にも限りがあり、また時間を要するため RNA の分解が不可避である。FACS 法も軸索やシナプスを持つ神経細胞を完全な状態で単一細胞にすることは事実上不可能であり、RNA を高精度に回収することができない。このため、各神経細胞の RNA 発現プロファイルマップを作成することは技術的にハードルが高く、これまでほとんど成功例がない。最近、単一細胞レベルでの RNA 発現解析が急速に研究されるようになってきたが、同様の理由で神経細胞では単一核などで代替されているのが現状である。

このような現状に対して、研究代表者は、特定の神経細胞に発現する RNA を高精度に回収するため、血管内皮細胞で成功例のある TU-tagging 法 (Doe et al, Genes Dev, 2013)を適応することを検討してきた。本手法は、4-thiouracil (4-TU)を 4-thiouridine (4-SU)に変換する哺乳類には存在しない uracil phosphoribosyltransferase (UPRT)酵素を、Cre-loxP システムを使ってマウス生体内の特定の細胞に発現させる (図 1)。マウスに 4-TU を投与すると、UPRT を発現する細胞だけで 4-SU に変換され、ウリジンの代わりに RNA に取り込まれる。4-SU 標識 RNA をビオチンで修飾し、ストレプトアビジンで捕捉すれば、特定の細胞に発現する RNA だけを回収できるという原理である。しかし、実際に試してみると、TU-tagging 法は、細胞種が限定されるほど標識される RNA 量が減り、4-SU 標識 RNA が、非特異的に混入する RNA 中に埋没して識別困難となるため、実用的ではないことが判明した。このため、本手法を使った報告はほとんどないのが実情であった。

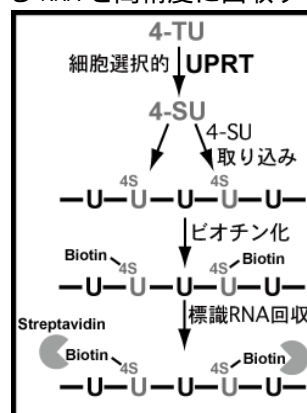


図1 TU-tagging法の基本原理

2. 研究の目的

本研究では、4-SU 標識を最大効率化するための 4-TU の濃度や投与方法などを検討し、非特異的な RNA の混入を最小限に抑え、かつ 4-SU 標識 RNA だけを識別可能な手法の開発に挑戦することを目的とした。開発にあたっては、マウス小脳プルキンエ細胞やアストロサイトをモデルとして選択し、より限定された細胞における 4-SU 標識の最大効率化の検討を行った。更に、4-SU 標識手法をプルキンエ細胞が選択的に変性する脊髄小脳変性症 SCA1 のモデル動物に適用し、プルキンエ細胞の変性に伴った RNA 発現プロファイルの変動を可視化することを最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) ビオチン-ストレプトアビジンを用いた RNA 標識および回収法 (TU-tagging 法)

最初に TU-tagging 法を基盤として RNA 標識の最大化を図った。具体的には、4-TU をマウス腹腔内または脳室内に投与し、6~12 時間後、小脳を摘出し、TRIzol 試薬を用いて全 RNA を抽出した。4-TU は投与後、UPRT 酵素存在下で 4-SU に変換され RNA が 4-SU で標識される (図 1)。抽出 RNA の 4SU 部位にビオチンを生化学的に付加した後、ビオチンと強い親和性を持つストレプトアビジン磁気ビーズと混和することにより 4-SU 標識 RNA を選択的に捕捉した。回収した RNA を cDNA へと置換して 3' 末端シーケンスを実施し RNA 配列を決定した。

(2) アルキル基修飾を用いた RNA 標識法 (SLAM 法)

TU-tagging 法を改良した SLAM 法が開発された (Matsushima et al, Development, 2018)。本手法では、上記(1)より抽出された全 RNA の 4SU 部位に、ビオチンの代わりにアルキル基を生化学的に付加する。その後、アルキル基修飾 RNA を cDNA へと逆転写すると、4SU 部位に高頻度で T-to-C 置換が生じるため、3' 末端シーケンス実施後の情報解析を通して標識 RNA を同定できる。TU-tagging 法と異なり、SLAM 法は磁気ビーズ等を用いた捕捉過程が無いゆえ、各ステップ

で生じる RNA の回収ロスと分解の危険性を減らすことが可能になり、4-SU 標識 RNA の回収率が TU-tagging 法より高くなることが期待された。

(3) RNA の 4-SU 標識効率の決定法 (T-to-C 置換率の算出方法)

RNA の cDNA への逆転写過程において、RNA 上のピオチン (TU-tagging 法) 又はアルキル基 (SLAM 法) で修飾された 4SU 部位に高頻度で T-to-C 置換が生じる。情報解析 (分担研究者加藤が担当) を通して T-to-C 置換率として算出することにより、RNA の 4-SU 標識効率を決定した。

4. 研究成果

(1) TU-tagging 法を基盤とした 4-SU 標識の効率化の検討

4-SU 標識の最大効率化に当たり、まず 4-TU の投与濃度の検討を行なった。4-SU 又は 4-TU を全神経細胞に UPRT を発現する Nestin-Cre-UPRT Tg マウスの腹腔内に、体重 1g あたり 500 µg を単回または 2 回投与し、6 時間処理後に全脳から RNA を抽出し、それらの 4-SU 標識を比較した。僅かではあるが、4-SU 標識効率は 2 回投与の方が高いことがわかった。よって、4-SU による標識効率は濃度に依存していると判断された。しかし、4-TU を用いた標識効率は 4-SU による標識効率より低いことも確認した。主な理由として、4-TU は血液脳関門を透過できず、脳内に効率良く浸透していないと推察された。そこでマウス脳固定装置を用い、4-TU を脳室内に直接顕微投与する方策を検討した。外科的処置によるマウス脳への負担などを考慮し、4-TU [500 µg] を単回投与し、また標識効率が上昇することを期待し処理時間を 12 時間とした。更に、より限定された細胞における 4-SU 標識の効率化を検討するために、UPRT を Cre-loxP 制御下で誘導発現可能な UPRT Tg マウスを Gfap-Cre マウス又は Pcp2-Cre マウスと交配させ、アストロサイト又はプルキンエ細胞特異的に UPRT を発現する Gfap-Cre-UPRT Tg マウスと Pcp2-Cre-UPRT Tg マウスをそれぞれ作成した。

UPRT を発現していないコントロールマウス、Pcp2-Cre-UPRT Tg マウスと Gfap-Cre-UPRT Tg マウスにそれぞれ 4-TU を脳室内投与し、小脳から全 RNA を抽出し、TU-tagging 法

投与マウス	UPRT発現細胞	標識率 [T-to-C置換率]
コントロールマウス	無	1
Pcp2-Cre-UPRT Tgマウス	プルキンエ細胞	2.1206
Gfap-Cre-UPRT Tgマウス	アストロサイト	1.1608

図 2 TU-tagging 法を基盤とした RNA 標識率

により 4-SU 標識 RNA を回収し、3' 末端シーケンスとパイオインフォマティック解析を実施して、4-SU 標識効率 (T-to-C 置換率) を算出した (図 2)。この結果から、コントロールマウスと比較して、両 UPRT マウスは 1 より高い値が算出され、共に 4-SU による RNA への標識が行われていると考えられた。また、Pcp2-Cre-UPRT Tg マウスは 2 倍量の標識が確認された。次に、それぞれアストロサイトとプルキンエ細胞由来の RNA が細胞特異的に濃縮されているかを、細胞特異的発現マーカーを指標

に用いて解析した。その結果、プルキンエ細胞特異的に転写される代表的な 3 つの遺伝子において、4-SU 標識された RNA 転写物のリード数を元に、その存在量を数値化したところ、3 種のプルキンエ細胞特異的 RNA

投与マウス	プルキンエ細胞マーカー遺伝子		
	Pcp2	Aldoc	Car8
コントロールマウス	0	0	3.374
Pcp2-Cre-UPRT Tgマウス	1.094	0.919	30.885
Gfap-Cre-UPRT Tgマウス	0	0	1.557

図 3 TU-tagging 法を基盤としたマーカー遺伝子検出効率

が Pcp2-Cre-UPRT Tg マウス由来のサンプルにおいて、コントロールマウス及び Gfap-Cre-UPRT Tg マウスより高い値を示すことがわかった (図 3)。以上から、本研究で用いた手法と実験条件により、限定された目的細胞種特異的な 4-SU 標識 RNA の濃縮が、ある程度うまく機能していると考察された。しかし、より高い標識効率を獲得するため、更に改良を進めることとした。

(2) SLAM 法を基盤とした 4-SU 標識の効率化の検討

上述の TU-tagging 法を基盤とした 4-SU 標識 RNA の回収方法は、その操作工程の多さから RNA のロスが大きいと考えられた。また、TU-tagging 法では、複数マウスの脳を 1 回の標識に必要なとする

投与マウス	UPRT発現細胞	標識率 [T-to-C置換率]
コントロールマウス	無	1
Pcp2-Cre-UPRT Tgマウス	プルキンエ細胞	1.8679
Gfap-Cre-UPRT Tgマウス	アストロサイト	1.56

図 4 SLAM 法を基盤とした RNA 標識率

が、SLAM 法では 1 匹で十分標識された RNA を回収できる利点も考慮した。このため、操作工程が少ない SLAM 法を試すこととした。図 2 と同様の条件で、UPRT を発現していないコントロールマウス、Pcp2-Cre-UPRT Tg マウスと Gfap-Cre-UPRT Tg マウスに 4-TU を脳室内投与し、小脳から全 RNA を抽出し、SLAM 法を実施した。3' 末端シーケンスとパイオインフォマティック解析

により 4-SU 標識効率 (T-to-C 置換率) を算出した (図 4)。コントロールマウスと比較して、両 UPRT マウスとも 1 より高い値が算出され、共に 4-SU による RNA への標識が行われていると推察された。1 匹のマウス小脳でも十分量の RNA が回収可能であることが判明したが、標識効率は TU-tagging 法と余り変わらなかった。

(3) 神経変性疾患のモデル動物を用いた SLAM 法の有効性の実証

次に、SLAM 法を用いた 4-SU 標識手法を神経変性疾患のモデル動物に導入し、変性に伴った RNA 発現プロファイルの変動を可視化することが可能であるかを検証することとした。本研究では、プルキンエ細胞が選択的に変性する脊髄小脳変性症 SCA1 のモデルマウスへの適用を試みた。まず、Pcp2-Cre-UPRT Tg マウスと SCA1 マウスを交配させ、Pcp2-Cre-UPRT-SCA1 トリプル Tg マウスを作成した。脊髄小脳変性の症状を呈する 5 ヶ月齢の Pcp2-Cre-UPRT-SCA1 トリプル Tg マウスと同月齢の Pcp2-Cre-

UPRT Tg マウス、各 2 匹にそれぞれ 4-TU を脳室内投与し、小脳から全 RNA の抽出後 SLAM 法を実施し、3' 末端シークエンスとバイオンフォマティック解析により 4-SU 標識効率 (T-to-C 置換率) を算出した (図 5)。その

投与マウス	脊髄小脳変性	標識率 [T-to-C置換率]
コントロールマウス	無	1
Pcp2-Cre-UPRT Tgマウス, #1	無	1.8679
Pcp2-Cre-UPRT Tgマウス, #2	無	1.6571
Pcp2-Cre-UPRT-SCA1 Tgマウス, #1	有	1.6488
Pcp2-Cre-UPRT-SCA1 Tgマウス, #2	有	1.786

結果、Tg マウスでの標識効率は、

図 5 脊髄小脳変性症モデルへの RNA 標識の応用検討

コントロールマウスより高いことが確かめられた。このため、両 Tg マウスにおけるプルキンエ細胞の RNA 発現プロファイルを比較することにより脊髄小脳変性特異的な遺伝子の探索を行なった。シナプス機能への関与が示唆されている Factor X や機能未知の microRNA Y などを含むいくつかの遺伝子候補において、脊髄小脳変性特異的な発現上昇が検出された (図 6)。現在、処置マウスの数を増やすことにより、統計学的に有意な候補遺伝子の絞り込みを行っている。更に、該当遺伝子に対する抗体を用いた組織免疫染色法や in situ hybridization 法などを実施し、脊髄小脳変性症の発症に関与する未知の遺伝子の同定を目指している。

以上から、本研究を通して開発した 4-SU 標識手法が、限定された脳神経細胞種の RNA 発現プロファイル作成にある程度、適用可能であることが示された。一方で、発現量が極めて少ない RNA 産物において、その検出精度が低いことも確認され、今後、非特異的に混入する RNA の除去や少数 RNA 産物の濃縮効率を高めるために、更なる改良が必要と考えられた。

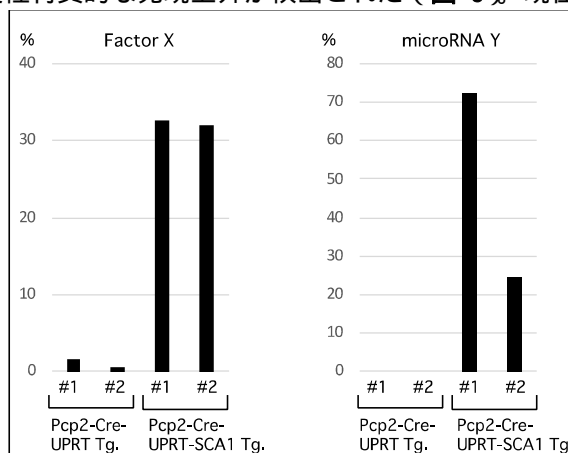


図 6 脊髄小脳変性症と関連が示唆される遺伝子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 1件）

1. 著者名 Pedro Henrique Costa Cruz, Yuki Kato, Taisuke Nakahama, Toshiharu Shibuya, Yukio Kawahara	4. 巻 26(4)
2. 論文標題 A Comparative Analysis of ADAR Mutant Mice Reveals Site-Specific Regulation of RNA Editing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 454-469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1261/rna.072728.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vongpipatana T, Nakahama T, Shibuya T, Kato Y, Kawahara Y	4. 巻 204(8)
2. 論文標題 ADAR1 Regulates Early T Cell Development via MDA5-Dependent and -Independent Pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2156-2168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jung In Kim, Taisuke Nakahama, Ryuichiro Yamasaki, Pedro Henrique Costa Cruz, Tuangtong Vongpipatana, Maal Inoue, Nao Kanou, Yanfang Xing, Hiroyuki Todo, Toshiharu Shibuya, Yuki Kato, Yukio Kawahara	4. 巻 17(5)
2. 論文標題 RNA editing at a limited number of sites is sufficient to prevent MDA5 activation in the mouse brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009516
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009516	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 河原 行郎	4. 巻 28(6)
2. 論文標題 エピトランスクリプトーム	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 546-550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuko Kawahara
2. 発表標題 The physiological significance of RNA editing in maintaining brain homeostasis
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原 行郎
2. 発表標題 RNA編集研究の最前線：基礎、病態、そして治療法への応用について
3. 学会等名 核酸医薬シンポジウム2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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	加藤 有己	大阪大学・医学系研究科・助教	
	(Kato Yuki)		
	(10511280)	(14401)	

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
---------	---------