

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07758

研究課題名（和文）オリゴデンドロサイトのエピジェネティクスと気分障害の病態との関連性の解析

研究課題名（英文）Analysis of the relationship between oligodendrocyte epigenetics and the pathogenesis of mood disorders.

研究代表者

林 義剛（Hayashi, Yoshitaka）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10631567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：気分障害は、認知・情動・意思決定に強く関連する前頭前野が病態責任部位の一つとして注目されている。研究代表者は、気分障害患者の前頭前野特異的にオリゴデンドロサイトとその前駆細胞が減少していることを発見し報告した。本研究では、オリゴデンドロサイトの破綻と気分障害の病態との関連を、エピジェネティック解析から明らかにすることを目的とする。自殺者4例、対照者5例の死後脳前頭前野から、神経細胞、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞のDNAを抽出し、次世代シーケンサーによるDNAメチル化解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経科学、病態神経科学分野でのエピジェネティクス解析は、これまでも行われてきているが、脳組織全体での解析が主であり、脳組織中の神経細胞・グリア細胞の密度が個体間で異なることによる影響を排除できていなかった。近年、グリア細胞と脳機能・疾患との関連が注目されてきているが、オリゴデンドロサイト注目した報告は少ない。本研究ではオリゴデンドロサイト特異的な解析を行うことにより、これまで明らかにできなかったエピジェネティクス状態やその変化の解析が可能であり、詳細な細胞の状態を反映したデータを得ることができ、基礎神経科学分野だけでなく、神経精神疾患の病態解明において重要な成果を得ることができると考えている。

研究成果の概要（英文）：The prefrontal cortex is strongly related to cognition, emotion, and decision making and is one of the regions responsible for the pathophysiology of mood disorders. I reported the finding that oligodendrocytes and their progenitor cells are decreased specifically in the prefrontal cortex of patients with mood disorders. This study aims to clarify the relationship between oligodendrocyte disruption and the pathogenesis of mood disorders by epigenetic analysis. DNA of neurons, oligodendrocytes, and oligodendrocyte progenitor cells were extracted from the postmortem prefrontal cortex of four suicide victims and five control subjects, and DNA methylation analysis was performed using next-generation sequencers.

研究分野：神経科学

キーワード：気分障害 オリゴデンドロサイト オリゴデンドロサイト前駆細胞 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

気分障害患者では、functional MRI や PET などの解析により、前頭前野における脳血流の低下が報告されており、その病態との関連が示唆されている。脳組織は、神経細胞同士の繋がり(神経回路)で構成されているが、それのみではなくグリア細胞もカリウムなどのイオン濃度の調節や、神経栄養因子の分泌、神経伝達物質の取り込み・放出を行い、神経細胞と相互に作用し機能する(図 1)。大脳皮質の特に前頭前野は、高次な情動、動機づけ、意思決定、認知機能などを司っている。研究代表者は、気分障害患者死後脳の前頭前野において、オリゴデンドロサイトと、成体脳において成熟オリゴデンドロサイトを供給しているオリゴデンドロサイト前駆細胞が減少していることを見出した(図 1) (Hayashi et al., Mol Psychiatry 2011; Plos One 2012)。これは気分障害の発症に神経細胞とオリゴデンドロサイト系譜細胞の相互作用が関連することを示唆する。

一方、神経細胞やグリア細胞の発現遺伝子は、遺伝的バックグラウンドは同一であるが、転写因子ネットワークの違いに加え、DNA メチル化やヒストンの化学的修飾において調節されている(エピジェネティクス)。また、エピゲノム修飾は、環境要因などの外的要因によって変化することから、脳機能の発達や、気分障害発症にも深く関与しており、重要な研究分野である。近年、神経細胞のみならず、グリア細胞のエピジェネティクスが注目されてきている。しかし、オリゴデンドロサイト系譜細胞を標的としたエピゲノム解析の報告はまだなく、気分障害との関連も不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト脳における

1) 神経細胞、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞の DNA メチル化状態とそれぞれの細胞同士のエピゲノム状態の違いがどのようなものか？

2) 気分障害の死後脳で、神経細胞、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞に生じているエピゲノム異常とはどのようなものか？

という基礎神経科学的な問いから、疾患の病態解明に向けた発展的な問いに関して研究を展開することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト死後脳からの神経細胞、オリゴデンドロサイト系譜細胞の分取と DNA 精製

交通事故や急性心不全などで突然死した対照群と、気分障害の病態と強く関連する自殺者の死後脳を各群 10 例を目標に収集し、それらの前頭前野から細胞核のみ無傷な状態で採取する。神経細胞の標識には NeuN、オリゴデンドロサイト系譜細胞の標識には Olig2 を使用する。さらに Olig2 は染色強度によって、弱陽性を示す成熟オリゴデンドロサイトと強陽性を示すオリゴデンドロサイト前駆細胞に分けられる。そのため、脳組織からは、少なくとも神経細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞、成熟オリゴデンドロサイト、アストロサイト/ミクログリアを含む集団の 4 種類の細胞集団をフローサイトメーターを用いて特異的に分取してることが可能である(図 2 参照)。この分取法は、現在アストロサイトとミクログリアを分取する特異的な核マーカーが見つかっていないが、マーカーの検索も行い、見つかり次第同様に分取を行う。分取した細胞はその後、DNA を抽出し、凍結保存する。

網羅的メチル化解析のためのライブラリー作製と次世代シーケンサーによる解析

フローサイトメーターにより、細胞種ごとに抽出した DNA から次世代シーケンサーによる網羅的 DNA メチル化解析を行うためのライブラリー作製を行う。本研究では、メチル化を受ける CpG rich なプロモーター領域の DNA メチル化を 1 塩基の解像度で高精度かつ非常に少ないリード数で解析することが可能である Reduced representation of bisulfite sequence (RRBS 法)を選択する。本方法は、CpG アイランドを濃縮することで、1 サンプルあたり 5 万円程度で解析可能である。予備的な研究として、すでに 2 例の神経細胞、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞の解析を終えており、本方法が遂行可能であることを確認している。初年度には、対照群の神経細胞、オリゴデンドロサイト系譜細胞に特異的な DNA メチル化の解析を行い、基盤となる情報を取得する。次年度に、気分障害と関連する自殺者のサンプルの解析を行う予定である。

次世代シーケンサーで得られたデータの解析

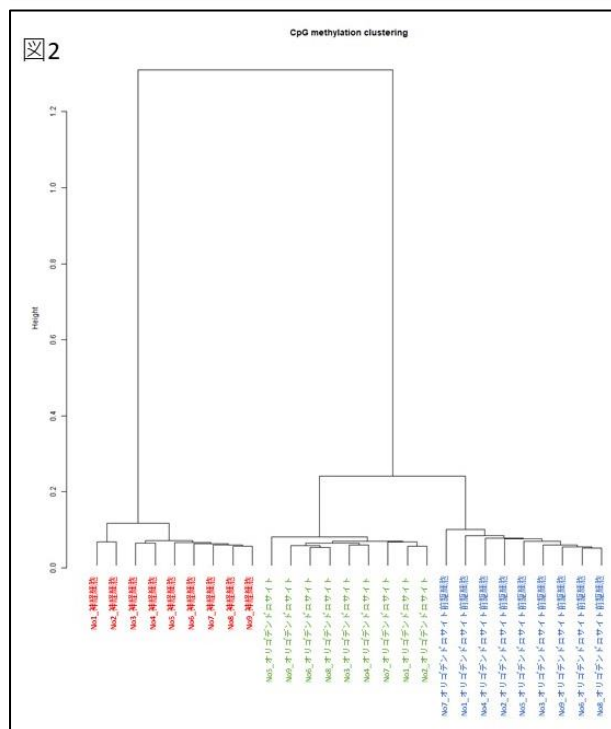
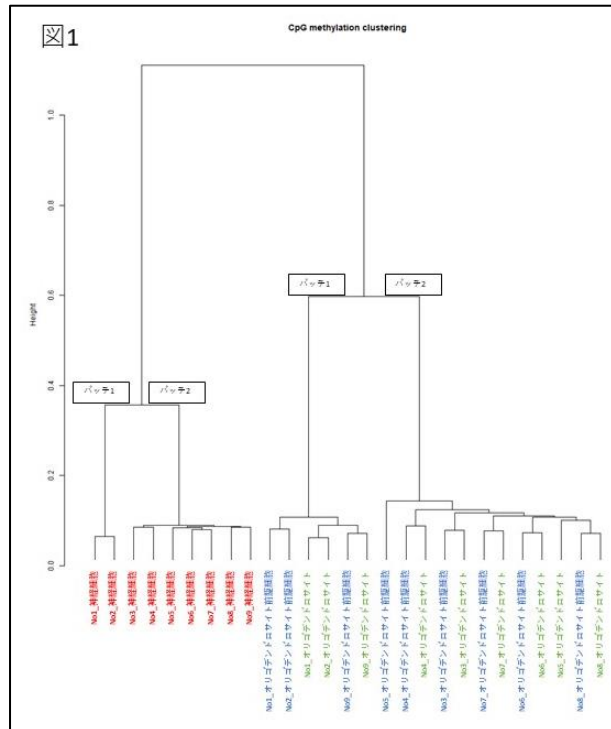
RRBS 法により作製されたライブラリーを次世代シーケンサーで読んだデータの解析を行う。RRBS 法では、プロモーター領域に多く存在する CpG アイランドの解析に長けており、ゲノム上の主要なメチル化部位の状態を把握することができる。次世代シーケンサーのデータ解析から、①対照群の神経細胞、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞のメチル化状態の解析、②それぞれの細胞種ごとの類似点と相違点の解析を行い、基礎的な情報を得る。さらに、③対照群と自殺者の、それぞれの細胞種におけるエピゲノム変化を同定し、気分障害や自殺の原因となり得る因子の同定を行う。

4. 研究成果

自殺者 7 例、突然死 13 例の死後脳を得ることができた。本研究計画通り、全てのヒト死後脳から細胞核のみ抽出し、神経細胞およびオリゴデンドロサイト系譜細胞のマーカーで染色した後、フローサイトメーターでそれぞれの陽性細胞を分取し、DNA を抽出した。そのうち自殺者 4 例、対照群 5 例について、DNA メチルを次世代シーケンサーで解析するため、RRBS 法によるライブラリーを作製し、次世代シーケンサーにて解析を行った。解析後のデータは、Bismark (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/>)によりマッピングを行い、抽出されたデータは、MethylKit (<https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/methylKit.html>)を用いて解析を行った。

解析が正常に行われるか検討するため、最初は少数のサンプルで解析を行い、問題なく解析できることを確認した後、残りのサンプルの解析を行った。しかし、この事によりライブラリーにバッチ差がでてしまった(図 1)。このバッチ差を補正するため、種々の方法を試みたが、結果としてバッチ差を説明する主成分を除くことで補正することができた(図 2)。

バッチ補正に時間が取られてしまったが、現在詳細な解析を行っており、この成果を学会や論文として発表していく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abdullah Asmaa, Hayashi Yoshitaka, Morimura Naoko, Kumar Akhilesh, Ikenaka Kazuhiro, Togayachi Akira, Narimatsu Hisashi, Hitoshi Seiji	4. 巻 47
2. 論文標題 Fut9 Deficiency Causes Abnormal Neural Development in the Mouse Cerebral Cortex and Retina	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2793 ~ 2804
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-022-03651-8	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 林義剛、等誠司	4. 巻 40
2. 論文標題 精神科ブレインバンク 死後脳を用いたうつ病研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊精神科	6. 最初と最後の頁 441-447
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 -

1. 著者名 Tanaka Aoi, Ishida Shohei, Fuchigami Takahiro, Hayashi Yoshitaka, Kuroda Anri, Ikenaka Kazuhiro, Fukazawa Yugo, Hitoshi Seiji	4. 巻 30
2. 論文標題 Life-Long Neural Stem Cells Are Fate-Specified at an Early Developmental Stage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 6415 ~ 6425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhaa200	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi, Yasuhiro Go, Kazuhiko Nakabayashi, Asmaa Abdullah, Mohd Zakiyyah, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 Glial cells missing 1 induce glial cells and angiogenesis in the core region of brain injury.
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshitaka Hayashi, Yasuhiro Go, Kazuhiko Nakabayashi, Asmaa Abdullah, Mohd Azrah, Mohd Zakiyyah, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 Glial cells missing 1 induce glial cells and angiogenesis in the injured region of brain.
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林 義剛, Kazuhiko Nakabayashi, Yasuhiro Go, Junya Kamiyasuhira, Asmaa Abdullah, Mohd Zakiyyah, Seiji Hitoshi
2. 発表標題 ヒト死後脳における神経細胞とオリゴデンドロサイト系譜細胞の DNAメチル化 状態の解析
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Glial cells missing 1 は脳損傷コアに血管とグリア細胞を誘導する
2. 発表標題 林義剛
3. 学会等名 第18回 成体脳ニューロン新生懇談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 義剛, 福家 聡, 郷 康広, 中林 一彦, Adbullah Asmaa, Mohd Zakiyyah, 守村 直子, Daun Kenny, 小山 なつ, 等 誠司.
2. 発表標題 Glial cells missing 1は損傷脳においてグリア細胞分化と血管新生を促進する.
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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