

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07548

研究課題名（和文）統合失調症患者死後脳を用いた長鎖RNAシーケンシングによるトランスポゾン解析

研究課題名（英文）Transposon analysis of the brains of schizophrenia patients with long-read RNA sequencing

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：これまで我々は、統合失調症患者の神経細胞ゲノムにおいて、レトロトランスポゾン的一种であるLINE-1配列が、神経細胞の機能や構造に重要な遺伝子の近傍に挿入されていることを示している。これらのデータをRNAレベルで検証するために、本研究ではヒト脳RNAの長鎖シーケンスデータから、LINE-1新規挿入を検出するための技術開発を行った。統合失調症患者3名分の前頭葉を使用して、PacBioシーケンサーによるRNA-seqを行い、RNAに挿入された新規LINE-1挿入の検出を探索的に試みた結果、神経機能に關与する複数の遺伝子において、LINE-1が挿入された転写産物を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、統合失調症患者の脳RNAから、神経機能に關わる遺伝子において、これまで報告のない新規のトランスポゾン挿入を見出した。これらの新規挿入は、遺伝子のコーディング領域やスプライシング部位に生じているものも存在しており、これらの変異が引き起こす細胞の機能欠失が疾患病因の一つとなりうる。これらは現在主流の疾患遺伝子解析であるGWASのような手法では見出せない変異であり、新たな統合失調症発症のメカニズムの解明につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have previously shown that LINE-1 sequences, a type of retrotransposon, are inserted in the neuronal genome of patients with schizophrenia in the vicinity of genes important for neuronal function and structure. To validate these data at the RNA level, we developed a technique to detect novel LINE-1 insertions in human brain RNA long sequence data. Using the frontal lobes of three patients with schizophrenia, we performed RNA-seq on a PacBio sequencer to detect novel LINE-1 insertions in RNA and LINE-1-inserted transcripts in several genes involved in neural functions.

研究分野：分子精神医学

キーワード：統合失調症 死後脳 long RNA-seq トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は妄想・幻聴などを症状とする神経性疾患の一つであり、病因は未だ分かっていないが、ゲノムの変異が大きく関与していると考えられている。病因に関わるゲノム構造変異を引き起こす要因の一つとして、レトロトランスポゾン転移があげられる。レトロトランスポゾンは、ゲノムの中で自らの配列のコピーを増幅することができる配列であり、ヒトゲノム内には、現在でも転移活性をもつ Long interspersed nuclear element (LINE-1 または L1) が存在している。これまで LINE-1 の転移は、生殖細胞や発生初期で生じる、まれな現象と考えられてきた。しかし近年になり、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。申請者はこれまでに、健常者と比較して統合失調症患者群では神経細胞において LINE-1 の増幅が起きていること、前頭葉 DNA の全ゲノムシーケンシングから、統合失調症の患者では、シナプス関連遺伝子など、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ることを示した。このような LINE-1 の新規挿入の一部は、遺伝子のコーディング領域や、非翻訳領域、スプライシング部位に存在していることが確認されている。このような構造変異を持った RNA は、そもそもタンパク質として翻訳されない可能性や、機能喪失型のタンパク質・細胞にダメージを与えるような機能獲得型のタンパク質として翻訳され、発症の原因となる可能性がある。しかしこれまでの解析では、このような大規模な構造変異が転写産物に与える影響を検出することは困難であった。

2. 研究の目的

RNA 発現を網羅的に解析する現行の方法としては、マイクロアレイ法やショートリード(50-300 bp/リード)の次世代シーケンス法が主流である。しかしどちらの方法もトランスクリプト全長の構造を解析することは不可能である。近年開発されたロングリード RNA-seq では、トランスクリプト全長の配列を決定することができるため、LINE-1 新規挿入のような、mRNA 内の大規模な構造変異を検出することが可能であり、トランスクリプト内の LINE-1 新規挿入を同定できる可能性がある。しかしながら解析パイプラインは十分に確立されておらず、また統合失調症死後脳への適用例もない。本研究では、ヒト死後脳検体を用いてレトロトランスポゾンを中心としたロングリード RNA-seq 解析パイプラインの構築を行い、統合失調症病態解明への手掛かりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ロングリード RNA-seq データから LINE-1 挿入を検出するための技術開発

ロングリード RNA-seq データから、新規の LINE-1 挿入を検出する実験・解析方法を検討するために、ヒト神経芽細胞腫由来培養細胞である SK-N-SH から抽出した RNA を用いて、Oxford Nanopore Technologies 社の 3 種類の RNA-sequencing kit (Direct RNA Sequencing Kit, Direct cDNA Sequencing Kit, PCR-cDNA Sequencing Kit) を使用してライブラリ調製を行い、MINON を使用してシーケンスデータの取得を行った。MinKNOW でベースコールを行い、先進ゲノム支援(東大・鈴木慶彦先生)の協力を得てバイオインフォマティクス解析を行い、LINE-1 挿入を含むトランスクリプトの検出を試みた。

(2) 患者サンプル RNA-seq データを使用した新規 LINE-1 挿入の検出

統合失調症患者 3 名分の死後脳前頭葉組織から抽出した total RNA を使用して、PacBio 社のシーケンサーによる RNA-seq を行い、患者脳の mRNA に存在する新規 LINE-1 挿入の検出を探索的に試みた。

4. 研究成果

(1) ロングリード RNA-seq データから LINE-1 挿入を検出するための技術開発

培養細胞 SK-N-SH から抽出した mRNA に対し、Oxford Nanopore Technologies 社の 3 種類の kit を使用して、ロングリード RNA-seq のライブラリを作製した。MinKNOW により得られた、それぞれの fastq ファイルから、マッピングツールである minimap2・BLAST を使用して、ヒト特異的な LINE-1 サブタイプである L1Hs 配列をリファレンスとしたマッピングを行い、L1Hs 配列を含むリードを抽出し、kit 間やツール間での比較を行った。その結果、23-285 個の L1Hs を含むリードが検出された(これらのリードには、もともとリファレンスに存在する L1Hs も含まれている)。またリ-

kit	# of read	detected L1	
		minimap2	BLAST
Direct RNA	110325	23	15
Direct cDNA	409475	285	268
PCR-cDNA	384000	160	153

Table. 1 SK-N-SH mRNAから検出されたL1

ド当たりの L1Hs 検出数は、mRNA から cDNA に逆転写した産物をそのままシーケンシングするキットである cDNA Sequencing Kit を使用した時が最も多かった。また 2 つのマッピングツールのうち、minimap2 のほうがより多くの L1 を検出していた。

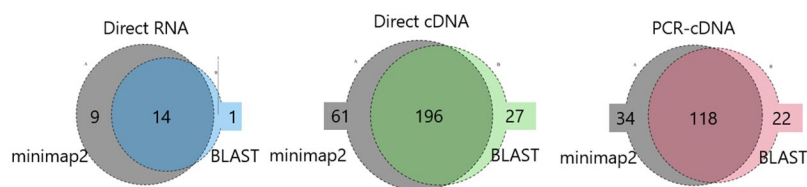


Fig.1 マッピングツールによるL1検出部位の違い

また、マッピングツールによる検出部位の違いを Fig. 1 に示した。その結果、2 つのマッピングツールから検出された L1Hs はその多く (約 60-70%) が共通していた。この後の解析には、L1 検出率の高さから、minimap2 を使用した。

(2) 患者サンプル RNA-seq データを使用した新規 LINE-1 挿入の検出

統合失調症患者の脳で発現している L1Hs 新規挿入を含むトランスクリプトを検出するために、統合失調症患者 3 名分の死後脳前頭葉組織から抽出した total RNA から、PacBio 社のシステムを使用して、ロングリード RNA-seq (Iso-seq) を行った。今回使用した RNA は死後脳から抽出を行ったものであるため比較的品质が低く、3 件検体のうち 2 検体は Iso-seq に不適と判定された (Table 2) が、そのまま実験を進めた。

Sample ID	Conc. (ng/ul)	Vol. (ul)	Amt. (ug)	A260/280	A260/230	RIN	NC/QC	28S/18S	Sample QC Results
AM1	44	20	0.88	1.829	1.582	6.0	1.05	0.59	Fail
AM29	48	20	0.96	1.871	1.593	4.6	1.04	0.78	Fail
AM89	46	20	0.92	1.930	1.717	7.5	1.05	1.14	Pass

Table. 2 統合失調症患者死後脳から抽出した total RNA の QC

Table 3 にシーケンス結果のサマリーを示す。通常の Iso-seq では 320-540 G 程度のデータが取得できるところ、今回取得されたデータ量は通常の 1/10 程度にとどまったが、解析を続行した。

Sample ID	Peak size of library (bp)	Total bases (G)	Read length (N50)
AM1	2635	29.94	5271
AM29	1701	54.62	4103
AM89	2342	49.15	3191

Table. 3 シーケンス結果のサマリー

L1Hs 新規挿入の検出パイプラインは(1)で使用したものを改変したものをを使用した (Fig. 2)。主な改変点は、L1Hs を含むリードをヒトリファレンスゲノムにマッピングさせたのち、もともと L1Hs としてリファレンスに存在する部位にマッピングされたリードを除去することにより、新規に起きた L1Hs 挿入のみを検出する、というステップを加えたことである (Fig. 2, ステップ 2-4)。

1. fastqファイルから、L1Hs (ヒトに特異的なLINE-1)配列をリファレンス配列として、minimap2でマッピング
2. LINE-1を含むリードを、minimap2でヒトリファレンスゲノム (hg38) に再度マッピング
3. Bedtoolsを使用して、hg38のLINE領域 (repeatmaskerから抽出)と重なるリードを除去
4. リファレンスにないLINE-1を含むmRNA由来のリードを同定

Fig. 2 ロングリードRNA-seqデータからの L1Hs新規挿入の検出パイプライン

その結果、1 検体につき、2-11 ヶ所の新規 L1Hs 挿入が含まれるトランスクリプトが検出された。

その中には、脊髄小脳変性症に關与する SEC14L5、統合失調症での発現低下が報告されている SOD1、シナプス形成に關与する DLGAP2 など、精神神経疾患や神経機能との關与が報告されている遺伝子由来の RNA が含まれていた。またそのいくつかは、エキソンや、エキソン-イントロン境界に L1Hs 挿入が検出されており、これらの挿入がタンパク質の発現にも大きな影響を与え、脳機能を変化させることによって、発症につながる可能性が考えられた。

本研究の方法で検出された L1Hs の新規挿入を含むトランスクリプトは、通常の RNA-seq では検出が不可能であり、また GWAS などの遺伝子研究からも見落とされる変異であるが、脳機能に大きな影響を与える可能性があることから、今後の疾患研究で検証されるべき課題の一つであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Du J, Nakachi Y, Fujii A, Fujii S, Bundo M, Iwamoto K	4. 巻 8
2. 論文標題 Antipsychotics function as epigenetic age regulators in human neuroblastoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Schizophrenia (Heidelb)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41537-022-00277-1	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 Sugawara H, Bundo M, Kasahara T, Nakachi Y, Ueda J, Kubota-Sakashita M, Iwamoto K, Kato T	4. 巻 15
2. 論文標題 Cell-type-specific DNA methylation analysis of the frontal cortices of mutant Polg1 transgenic mice with neuronal accumulation of deleted mitochondrial DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00894-4	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 Ueda J, Bundo M, Nakachi Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K	4. 巻 74
2. 論文標題 Cell type-specific DNA methylation analysis of the prefrontal cortex of patients with schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 297-299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/PCN.13282	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 Bundo M, Ueda J, Nakachi Y, Kasai K, Kato T, Iwamoto K	4. 巻 26
2. 論文標題 Decreased DNA methylation at promoters and gene-specific neuronal hypermethylation in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 3407-3418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41380-021-01079-0	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5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 文東美紀
2. 発表標題 統合失調症患者死後脳を用いたシングルニューロンレベルでのLINE-1挿入部位の解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 文東美紀
2. 発表標題 統合失調症患者死後脳を用いたシングルセルレベルでのLINE-1挿入部位の解析
3. 学会等名 BPCNP4学会合同年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 文東美紀
2. 発表標題 統合失調症患者死後脳を用いたシングルセルレベルでのLINE-1挿入部位の解析
3. 学会等名 第15回エピジェネティクス研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Bundo M, Ueda J, Kiyota E, Kasai K, Kato T, Iwamoto K
2. 発表標題 Detection of novel somatic LINE-1 insertions at single neurons of schizophrenic patients
3. 学会等名 The 3rd Anniversary Symposium for Double Degree Program (Kumamoto and Thailand), communicable and non-communicable disease （招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 文東美紀
2. 発表標題 統合失調症患者死後脳を使用したシングルセルレベルでのLINE-1新規挿入検出
3. 学会等名 第23回日本レトロウイルス研究会夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 鬼塚俊明、橋本亮太	4. 発行年 2022年
2. 出版社 新興医学出版	5. 総ページ数 280
3. 書名 精神医学領域の論文を読みこなすキーワード100！	

1. 著者名 文東美紀	4. 発行年 2022年
2. 出版社 新興医学出版社	5. 総ページ数 280
3. 書名 精神医学領域の論文を読みこなすキーワード100！	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>分子脳科学講座 熊本大学大学院生命科学研究部・分子脳科学講座 https://www.molbrain.com/ 熊本大学大学院 生命科学研究部 分子脳科学講座 https://www.molbrain.com/</p>
--

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