

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26280110

研究課題名(和文) 高次運動機能障害の分子病理理解に資するマウス・デジタル脳遺伝子発現解析

研究課題名(英文) Gene expression analyses in the mouse digital brain for understanding molecular bases of higher motor disfunction

研究代表者

於保 祐子 (Okamura-Oho, Yuko)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・客員研究員

研究者番号：60381571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳には、その複雑な構造を維持し機能を発揮するために、全遺伝子の85%以上が発現している。研究代表者らは、3次元空間での遺伝子発現分布を、脳全体を俯瞰する形で網羅的に測定するTT法を開発した。更に小型動物の微細な動きを観測する高精度MC法(hMC)を開発し、軽微な歩行異常と正常との違いを生体力学モデルのパラメータの違いとして表すことに成功した。これらの手法を用いて、遺伝的な運動異常を示すヒト疾患のモデルマウスの解析を行い、病初期におけるパラメータの変化と一群の遺伝子の存在位置の変化を見出した。

研究成果の概要(英文)：More than 85% of genes are expressed in the brain and maintain the structure and execute neural function. We have invented a TT method for profiling gene expression patterns of the whole brain in the three-dimensional coordinate. We have also developed a high-resolution motion capture method and detected subtle changes of walking motion and describe them with parameters of biomechanics. Using these methods, we analyzed a neuronal inherited disease model mouse with abnormal motion. Then, we found parameter changes in motion of abnormal mice and expression-area changes in gene expression of a group of genes in the beginning stages of the disease.

研究分野：遺伝学

キーワード：遺伝子発現 随意運動 モーションキャプチャー ハンチントン病

1. 研究開始当初の背景

脳には、その複雑な構造を維持・新生し機能を発揮するために、全遺伝子の85%以上が発現している。ゲノムの微細な異常は、多くの遺伝子発現に影響を及ぼし、ヒトの高次行動を障害する。ヒトの高次行動を構成する運動の意図的な習得とそれを流暢に行う機能について、大脳皮質・小脳に加え、皮質下にある一群の神経構造体(大脳基底核)特に線条体の重要性が注目されている(Ashby, Trends in Cog Sci 2010)。基底核障害による不随意運動は意識に上らず、意図的に止められず、薬物治療に抵抗性を示す。ハンチントン病(HD)は、線条体の特定の細胞(GABAergic medium spiny neuron)に病変が始まり、神経軸索に沿って神経伝達と逆方向性に病勢が拡大する事が知られており、舞蹈病と呼ばれる上下肢の不随意運動が特徴的である。責任遺伝子は20年前に同定されたが、分子病態はいまだ不明である。異常伸長したCAGがコードする伸長polyQ鎖の直接毒性による神経細胞死という仮説は、その後の研究により否定的である。HDを含むpolyQ病は、責任遺伝子が20種類程度同定され、それぞれ特異な運動異常を呈する重篤な進行性疾患である。伸長polyQ鎖を含む各々の異常蛋白が、特徴的な神経細胞群に起こす病態の包括的理解が治療法の開発に必須で、研究の再構築が求められている(Ross, The Lancet Neurology 2011)。

研究代表者らは、3次元空間での遺伝子発現分布を、脳全体を俯瞰する形で網羅的に測定する「TT法」を開発した。TT法は、3次元的に3万余の遺伝子発現量を定量するので、従来の2次元組織標本での発現解析に比べ、共発現情報が正確に得られる。更に、測定に必要な時間・コストが格段に少ない(1/100)。これにより、疾患モデル動物について複数の実験条件を設定して、Allen Brain Atlas(Lein 2007 Nature)と同等以上の解像度を持つ網羅的全脳地図の作成が可能である。更に、脳領域を遺伝子発現に基づいて区分する事で、解剖学的領域にまたがった脳区分を特定し、その場所の共発現遺伝子を選択する事ができる。研究分担者は小型動物の微細な動きを観測する高精度MC法(hMC)を開発し、軽微で間歇的な歩行異常を示す遺伝子改変マウスについてその行動を観察し、正常との違いを生体力学モデルのパラメータの違いとして表すことに成功した。

2. 研究の目的

本研究で用いる上記の二つの新規技術は、小型動物での詳細な解析を、ヒトに当てはめて検討する事を想定して、設計されている。従って、polyQ病を代表するHDモデルマウスについて、脳を俯瞰する形で、広く網羅的に遺伝子発現分布を測定できる研究の意義は大きい。即ち、hMC法とTT法の測定を行

うことで、病初期の運動減少・不随意運動増加といった変化を見つけ、その時点での遺伝子発現変化を抽出して解析する。本研究で、non-coding RNAなど新規機能遺伝子の関与も含めて、疾患関連遺伝子をスクリーニングし、HDの分子病態の理解を再構築する。HDの発症を防ぐ、または発症を遅らせる、治療法開発のターゲットとなる候補遺伝子を抽出する。

研究手法は、汎用性が高く、他のpolyQ病や遺伝性神経疾患等に应用できる。応用の拡大を目的として、研究成果となる3次元遺伝子発現地図は、論文化の後、データベース(ViBrism-DB)上で公開する。このDBは国際ニューロインフォマティクス統合機構(INCF)日本ノード(J-node)の下で複数の他のDBと情報を共有できるので、多くの研究者に有用な、インパクトの高い成果公開が期待できる。このDBを基に遺伝子を含む生体高分子情報を集積し、高次行動中枢とその分子病態の理解に向けての研究を活性化・深化することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 運動解析

hMC法を用いて、HDモデルマウスとコントロールの運動(自由運動時の上・下肢と体幹の動き)を測定した。運動を、生体力学モデルを使ってシミュレーションし、HDとコントロールの動きの違いをそのパラメータの違いとして示した。

(2) 脳解剖学情報の取得

HDモデルマウスとそのコントロールについて、MRI画像を取得し、(4)の手法のためのViBrism-DB標準空間として用いた。

(3) 遺伝子発現解析

TT法を使って、HDモデルマウスとそのコントロールについて、遺伝子発現を各分画ごとにマイクロアレー法で網羅的に測定し、その分画位置情報から3次元発現地図を作成した。こうして、仮想脳での網羅的遺伝子発現情報(分布と量)を、発症直後の時点で取得し、全てを(2)で取得した標準空間に定位した遺伝子発現地図データベースを作成した。これらと、別途作成した正常マウスの発育段階での遺伝子発現分布とを比較解析して、有意に発現変動する遺伝子、共発現遺伝子群を抽出した。

抽出した遺伝子について、qRT-PCRやin situハイブリダイゼーション法を用いて、局在の確認を行った。

(4) アトラスインフォマティクス解析(解剖学とバイオインフォマティクスの統合解析)

遺伝子の3次元局在について、脳部位をMRI画像から得られた解剖学図譜で特定し、

その部位での遺伝子の発現量を表示するプログラムと、遺伝子間の相互の位置関係を示すため2次の関係(共発現遺伝子に共発現する)までネットワーク解析ができるプログラムの二つをViBrism-DBの解析プラットフォームとして実装して、遺伝子の機能特徴と発現部位の解剖学的特徴を合わせて解析した。

4. 研究成果

(1) 運動機能解析

別途に開発した GFP 技術を用いて生体観察する方法と組み合わせる事で、マウス骨格筋の走行を明らかにし、進化学的に保存された点を抽出して、マウス・ヒト間での比較解析のための生体力学モデル相互マッピングを可能にした。

hMC 法を用いて HD マウスモデルの運動とコントロールのそれとの比較を行ったところ、従来運動機能について問題がないと考えられていた HD 幼弱マウスについて、hMC 法で軽度の運動及び行動異常を認めた。

(2) 脳 MRI 画像解析

幼弱マウスでは明らかな変化を認めなかった。このことから、神経細胞の減少が MRI 画像解析で明らかになる以前から、運動・行動異常が認められたことになり、当初考えられていた細胞死による神経変性という仮説よりも更に前段階で、すでに病態に大きな変化を認める可能性を示唆するものであった。

(3) 遺伝子発現解析

正常マウスの生後の脳発育段階において、TT 法を用いて採取した遺伝子発現情報に基づいて、網羅的に遺伝子発現地図を作成して解析し、結果を公開した。(論文)。更に HD モデルマウスとコントロールの幼弱期についても同様に TT 法を用いて、網羅的発現地図を作成し、正常の発達段階での図譜と比較した。

その結果、non-coding 遺伝子も含めて、べき乗則に従う共発現ネットワークを示す遺伝子発現分布は、発育段階を通じて保持され、HD とコントロールにおいても全体としては、変化を認めなかった。しかし、一群の遺伝子の局在が変化して、共発現遺伝子ネットワークの一部に変化が生じていた。

(4) アトラスインフォマティクス解析

MRI 画像と遺伝子発現部位を同一仮想 3 次元上で比較し、更に一群の遺伝子について qRT-PCR や組織染色法も用いて発現部位を詳細に検討した結果、これらの発現部位の変化は、脳室の拡大などの解剖学的構造の変化によるものとは考えられなかった。複雑な生命現象の多くが、遺伝子共発現も含め、べき乗則に従う。ネットワークを構成する共発現遺伝子群は種間で保存され、機能単位として働き(Stuart 2003 Science)、疾患モ

デル動物とヒトでの分子病態比較に重要である。今回 HD モデルマウスに見られた、共発現ネットワークの変化を伴う、遺伝子局在の変化について、遺伝子情報などを合わせて考察し、HD 初期の運動・行動異常と関係していると考えられた。現在結果を論文としてまとめている。更に解析結果について、ViBrism DB のプラットフォームを用いて公開するための準備を行っている。

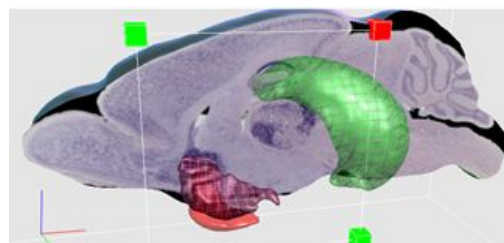


図1: ViBrism DB での遺伝子発現表示

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 12 件)

Saito H, Nishizumi H, Suzuki S, Matsumoto H, Ieki N, Abe T, Kiyonari H, Morita M, Yokota H, Hirayama N, Yamazaki T, Kikusui T, Mori K, Sakano H. Immobility responses are induced by photoactivation of single glomerular species responsive to fox odour TMT. Nature Communications 8, 2017, 16011-16011 DOI:10.1038/ncomms16011 (査読あり)

Furushiro N, Yokota H, Nakamura S, Fujisaki, Yamagata Y, Kokubo M, Himeno R, Makinouchi A, Higuchi T, Three-Dimensional Observation of Microstructure of Bone Tissue Using High-Precision Machining. International Journal of Automation Technology, 11, 2017, 883-894 DOI:10.20965/ijat.2017.p0883 (査読あり)

Sergejeva M, Papp E. A., Bakker R., Gaudnek M. A., Okamura-Oho Y., Boline, J., Bjaalie J. G., Hess A., Anatomical landmarks for registration of experimental image data to volumetric rodent brain atlasing templates. J. Neurosci. Methods 240, 2015, 161-169 DOI: 10.20965/ijat.2017.p0883 (査読あり)

Okamura-Oho Y., Shimokawa K, Nishimura M, Takemoto S, Sato A, Furuichi T, Yokota H: Broad Integration of Expression Maps and Co-Expression Networks Compassing Novel Gene Functions in the Brain. Scientific Reports 4 : 6969, 2014 DOI:

10.1038/srep06969 (査読あり)
Susaki E, Tanaka K, 12名、Yokota H, Ueda H., whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. Cell. 157, 2014, 726-739 DOI: 10.1016./j.cell.2014.03.042(査読あり)

〔学会発表〕(計 18 件)

Okamura-Oho Y. Differential and tissue-specific gene expression in the mouse brain. AINI (Advances in Neuroinformatics) 2017(招待講演)2017年11月20日、「理研和光研究所・大河内ホール」(埼玉県和光市)

Okamura-Oho Y. Integrated analysis of anatomical and topological maps of gene expression in the mouse brain. 3rd Japan-EU WS on Neuroinformatics (招待講演)2016年6月4日「東京大学弥生講堂・一条ホール」(東京都文京区)

Okamura-Oho Y, Morita M, Shimokawa K, Nishimura M, Tawara T, Yokota H. Ex-vivo transcriptomic analysis on the web: a new platform of ViBrism DB for gene expression mapping and analysis. NI(Neuroinformatics)2016, 3-4 Sept. 2016 (Reading, UK)

Okamura-Oho Y. Integration of anatomical and topological maps for functional analysis of the brain. AINI 2015, 2015年11月27日「東京大学先端科学技術研究センター エネオスホール」(東京 駒場)

Oota S, kegami Y, Ayusawa K, Kakusho N, Yoshiki A, Yokota H, Okamura-Oho Y, Nakamura Y. The homology mapping: interspecies functional morphing. AINI2015, 26-27 Nov. 2015 「理研和光研究所・大河内ホール」(埼玉県和光市)

Okamura-Oho Y, Morita M, Shimokawa K, Nishimura M, Tawara T, Yokota H. Ex-vivo transcriptomic analysis on the web: a new platform of ViBrism DB for gene expression mapping and analysis: NI(Neuroinformatics)2015, 20-22 August 2015 Demo session: (Cairns, Australia)

Oota S. Neuromuscular Modeling by Bridging Mouse and Human Japan-EU WS on Neuroinformatics (招待講演)2015年4月18日「東京大学弥生講堂・一条ホール」(東京都文京区)

Okamura-Oho Y, Shimokawa K, Nakamura S, Tsujimura Y, Nishimura M, Takemoto S, Morita M, Ijiri T, Tawara T, Yokota H. Transcriptome tomography: mapping genes onto 3D brain structures: Annual meeting of Society of Neuroscience

2014, 15-19 Nov. 2014 (Washington DC, USA)

Okamura-Oho Y, Shimokawa K, Nakamura S, Tsujimura Y, Nishimura M, Takemoto S, Morita M, Yokota H. Integrated Analysis of Expression Maps and Co-Expression Networks Using a Dataset of ViBrism DB: AINI2014 2014年9月25-26日(埼玉県和光市)

Okamura-Oho Y, Shimokawa K, Nishimura M, Takemoto S, Sato S, Furuichi T, Okota H. Novel genes located in the co-expression networks detected with Transcriptome Tomography: NI2014, 25-27 August 2014 (Leiden, Nederland) (Front. Neuroinform. Published on 04 Jun 2014,

doi:10.3389/conf.fninf.2014.18.00022 Jyl Boline, Richard Baldock, Rembrandt Bakker, Albert Burger, James Gee, Christian Haselgrove, Mike Hawrylycz, Andreas Hess, G. Allan Johnson¹, Piotr Majka, Lydia L. Ng, Yuko Okamura-Oho, Seth W. Ruffins, Ilya Zaslavsky. Growing the INCF Digital Atlasing Infrastructure NI2014, 25-27 August 2014 (Leiden, Nederland) (Front. Neuroinform. Published on 04 Jun 2014, doi:10.3389/conf.fninf.2014.18.00039

〔図書〕(計 2件)

森田正彦、西村将臣、横田秀夫、羊土社、バイオ画像解析手取り足取りガイド(第3章)2014年、208-218

〔その他〕

ホームページ等

ViBrism DB

<https://vibrism.neuroinf.jp/>

TT 法も用いて作成した遺伝子発現地図と共発現ネットワークの解析プラットフォーム

6. 研究組織

(1)研究代表者

於保 祐子 (Okamura-OHO, Yuko)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・客員研究員

研究者番号: 60381571

(2)研究分担者

横田 秀夫 (YOKOTA, Hideo)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究領域・チームリーダー

研究者番号: 00261206

太田 聡史 (OOTA, Satoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・

バイオリソースセンター・専任研究員

研究者番号: 30391890