

平成30年6月4日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04891

研究課題名(和文) Poly(I:C)投与動物モデルを利用したLINE-1転移機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of LINE-1 retrotransposition using poly(I:C) animal model

研究代表者

岩本 和也 (Iwamoto, Kazuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：40342753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：poly(I:C)マウスモデルを用い、仔マウス神経前駆細胞の解析を行った。RNA-seq解析では、免疫応答や炎症関連遺伝子群などで発現上昇を、神経発達に関連する遺伝子群で発現低下を認めた。iTRAQ法による蛋白質解析からはウイルス活動に対し抑制的に働く因子の発現上昇を認めた。また、マウスで転移活性を有する3種類のLINE-1サブファミリーについて個別にシトシン修飾状態を解析したところ、1種において、メチル化状態の低下とハイドロキシメチル化状態の上昇を同定した。ハイドロキシメチルシトシンは転写活性化に伴う修飾であると考えられ、転移活性化が選択的に生じている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using poly(I:C) mouse model, we analyzed fetal neural progenitor cells. RNA-seq analysis revealed increased expression of immune response and inflammation-related genes and decreased expression of genes related to neurodevelopment. Protein analysis by iTRAQ showed increased expression of factors suppressing viral activity. In addition, analysis of the cytosine modification status for each of the three active LINE-1 subfamilies in mice identified subfamily dependent epigenetic changes. One subfamily showed decreased cytosine methylation and increased hydroxymethylation, suggesting the possibility of selective activation of retrotransposition activity.

研究分野：精神医学

キーワード：体細胞変異 統合失調症

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の発症には遺伝要因と環境要因双方が複雑に相互作用していると考えられているが、分子レベルでの病因・病態の大部分は不明である。現在までに多くのゲノム解析が行われてきたが、発症に確実に関与する遺伝要因の同定はされておらず、近年 DNA メチル化状態など環境の影響を受けて変動するエピジェネティックな要因の関与が注目されている(Nishioka et al., 2013)。また、脳神経系の細胞はトランスポゾンの挿入変異やゲノムの微小欠失、染色体異数性など様々な種類の体細胞変異が存在しており、体細胞変異の頻度やパターンが、精神疾患の病因や病態と密接に関係していると考えられている(Insel et al., 2014)。特にトランスポゾン LINE-1 はヒトゲノム中に数十万コピー存在し、そのうちの約 100 コピーが現在でも転移活性を保持していると考えられている。生殖系列以外の組織では転移活性は様々な機構により抑制されているが、神経前駆細胞において活性化され、結果として神経細胞では LINE-1 のゲノムコピー数が増大していることが知られている(Muotri and Gage, 2006)。

我々は最近、統合失調症患者前頭葉神経細胞において健常者と比較しトランスポゾン LINE-1 のゲノムコピー数が増大していることを見出した(Bundo et al., 2014)。患者死後脳では、神経機能に重要な遺伝子に LINE-1 の新規挿入が認められ、患者 iPS 細胞を用いた検討でもゲノムコピー数の増大が確認された。また、妊娠マウスを用いた poly(I:C) 投与モデルにおいて、仔の脳神経細胞で LINE-1 コピー数の上昇が認められた。このモデルでは、ウイルス感染を模した 2 本鎖 RNA アナログである polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C)) を妊娠マウスに投与する。産出した仔マウスは、神経新生の障害や、認知機能および感覚情報処理能力の異常など統合失調症様行動を示す(Meyer et al., 2008)ことが知られている。poly(I:C)動物モデルで LINE-1 のコピー数増加が確認できたことから、本モデルを用いて詳細な検討を加えることにより、転移活性上昇の分子メカニズムについて飛躍的に理解が進むと期待された。

2. 研究の目的

ウイルスゲノムである 2 本鎖 RNA を模した poly(I:C)化合物投与マウスを利用し、1) LINE-1 転移制御機構とその破綻の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

poly(I:C)化合物投与マウスを利用し、妊娠マウスへ様々な投与条件を試し、仔において安定した LINE-1 転移増大条件を確立する。確立した条件を用い、胎仔脳から神経前駆細胞を単離する。単離神経前駆細胞から核酸を

抽出し、RNA-seq 法による遺伝子発現解析、iTRAQ 法によるタンパク質発現解析、パイロシークエンシング法による LINE-1 プロモーター領域のメチル化解析を行う。

4. 研究成果

マウス妊娠個体への poly(I:C)投与条件について複数の投与条件の検討を行い、仔マウス(生後一日目)前頭葉部位での LINE-1 ゲノムコピー数が最も増大する条件を確立した。この過程で、妊娠マウスのステージとして、当初想定していた e9.5 の時期より後期のステージで低容量連続投与の投与条件の方が安定した LINE-1 ゲノムコピー数の増大が認められること、また、LINE-1 ゲノムコピー数の増大は poly(I:C)化合物の投与総量に依存して上昇することを確認した。

仔マウス胎生期の神経前駆細胞での LINE-1 ゲノムコピー数上昇の分子メカニズムを明らかにするため、確立した条件を用い poly(I:C)化合物を投与した後の仔マウス脳部位から、神経前駆細胞マーカー Prominin-1 を指標とし、神経前駆細胞の単離条件を確立した。単離した Prominin-1 陽性神経前駆細胞から total RNA を抽出し、RNA-Seq 解析を行った。また、iTRAQ 法によるタンパク質発現解析を行った。その結果、RNA-seq 解析からは、免疫応答関連遺伝子群や炎症関連遺伝子群、host defense 関連遺伝子群などにおいて有意な発現上昇を認めた。一方、神経発達関連遺伝子群や神経機能に関連する遺伝子群では有意な発現低下を認めた。iTRAQ 法によるタンパク質発現解析からはレトロトランスポジションやウイルス活動に対し抑制的に働くエピジェネティック制御に関わる因子の発現上昇と、神経発達に関連する蛋白質の発現減少を認めた。

また、神経前駆細胞における LINE-1 転移活性に関連するエピジェネティックな修飾状態の解析を行った。ヒトでは転移活性を保有する LINE-1 のサブファミリーは LINE-1Hs の 1 種のみであるが、マウスでは MdA, MdGf, MdTf の 3 種類のサブファミリーが転移活性を保有する。この 3 種の LINE-1 の 5'UTR に存在するプロモーター領域について、パイロシークエンサーを用いシトシン修飾状態を個別に測定した。その結果、サブファミリー依存的な修飾変化が認められ、興味深いことに、3 種のうち、1 種において、シトシンメチル化状態の低下とハイドロキシメチル化状態の上昇を同定した。一般的にハイドロキシメチルシトシンは転写活性化に伴う修飾であると考えられることから、この 1 種の転移活性の活性化がエピゲノム変化を介して選択的に生じている可能性が示唆された。

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 15 件)

Nishioka M, Bundo M, Iwamoto K, Kato T. Somatic mutations in the human brain: implications for psychiatric research. *Molecular Psychiatry* in press (査読有)

Murata Y, Bundo M, Sunaga F, Kasai K, Iwamoto K. DNA methylation profiling in a neuroblastoma cell line exposed to the antipsychotic perospirone. *Pharmacopsychiatry*, in press (査読有)

Iwamoto K. Understanding the epigenetic architecture of psychiatric disorders: modifications and beyond. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72:194, 2018 (査読無)
DOI: 10.1111/pcn.12646.

Nishioka M, Bundo M, Ueda J, Yoshikawa A, Nishimura F, Sasaki T, Kakiuchi C, Kato T, Iwamoto K. Identification of somatic mutations in monozygotic twins discordant for psychiatric disorders. *npj Schizophrenia*, 4:7, 2018 (査読有)
DOI: 10.1038/s41537-018-0049-5

Sugawara H, Murata Y, Ikegame T, Sawamura R, Shimanaga S, Takeoka Y, Saito T, Ikeda M, Yoshikawa A, Nishimura F, Kawamura Y, Kakiuchi C, Sasaki T, Iwata N, Hashimoto M, Kasai K, Kato T, Bundo M, Iwamoto K. DNA methylation analyses of the candidate genes identified by a methylome-wide association study revealed common epigenetic alterations in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72:245-254, 2018 (査読有)
DOI: 10.1111/pcn.12645

Nishioka M, Bundo M, Ueda J, Katsuoka F, Sato Y, Kuroki Y, Ishii T, Ukai W, Murayama S, Hashimoto E, Nagasaki M, Yasuda J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Identification of somatic mutations in postmortem human brains by whole genome sequencing and their implications for psychiatric disorders. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 72:280-294, 2018 (査読有)
DOI: 10.1111/pcn.12632

Murata Y, Bundo M, Ueda J, Kubota-Sakashita M, Kasai K, Kato T,

Iwamoto K. DNA methylation and hydroxymethylation analyses of the active LINE-1 subfamilies in mice. *Scientific Reports*, 7:13624, 2017 (査読有)
DOI: 10.1038/s41598-017-14165-7

Ueda J, Murata Y, Bundo M, Oh-Nishi A, Kassai H, Ikegame T, Zhao Z, Jinde S, Aiba A, Suhara T, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Use of human methylation arrays for epigenome research in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Neuroscience Research*, 120:60-65, 2017 (査読有)
DOI: 10.1016/j.neures.2017.02.005

Bundo M, Kato T, Iwamoto K. Estimation of LINE-1 Copy Number in the Brain Tissue and Isolated Neuronal Nuclei. In: Frade J., Gage F. (eds) *Genomic Mosaicism in Neurons and Other Cell Types*. *NeuroMethods*, 2017 vol 131. (査読無)
DOI: 10.1007/978-1-4939-7280-7_11.

〔学会発表〕(計 20 件)

文東美紀、加藤忠史、岩本和也、ヒト前頭様神経細胞における体細胞ゲノム変異の検出、第 123 回日本解剖学会 (2018 年 3 月 28 日、日本医科大学、東京)

西岡将基、文東美紀、笠井清登、加藤忠史、岩本和也、ヒト脳組織および一卵性双生児における体細胞変異の検出と精神障害第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会 (2017 年 9 月 28 日、札幌コンベンションセンター、北海道)

Iwamoto K. Exploration of the pathophysiological role of epigenetic and genomic variations in brains of patients with major psychiatric disorders. The 72nd Fujihara Seminar International Symposium on Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community (September 13, 2017, Tomakomai, Japan)

岩本和也、脳ゲノムの動的特性と精神疾患の発症メカニズムの探索、第 113 回日本精神神経学会学術総会 (2017 年 6 月 22 日、名古屋国際会議場、愛知)

Bundo M, Kato T, Iwamoto K. LINE-1 copy number analysis of schizophrenic patients. More Epigenetics in Clinical Medicine, The 2nd Tore

Nilson/Karolinska Institutet
conference in Nobel Forum on clinical
epigenetics (April 26, 2017,
Stockholm, Sweden)

岩本和也、エピゲノム解析による精神疾
患の新規病因・病態解明、第35回日本
認知症学会学術集会(2016年12月1日、
東京国際フォーラム、東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.molbrain.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩本 和也 (IWAMOTO, Kazuya)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 40342753

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

文東 美紀 (BUNDO, Miki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号: 00597221

加藤 忠史 (KATO, Tadafumi)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・

チームリーダー

研究者番号: 30214381

笠井 清登 (KASAI, Kiyoto)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80322056

(4) 研究協力者

村田 唯 (MURATA, Yui)

熊本大学・大学院生命科学研究部・博士研
究員

研究者番号: 10802077

澤村 理英 (SAWAMURA, Rie)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号: 80509654)

清田 恵美 (KIYOTA, Emi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・技術補
佐員

内布 恵美 (UCHINUNO, Emi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・技術補
佐員

上田 順子 (UEDA, Junko)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・
技術補佐員