

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07567

研究課題名(和文)統合失調症患者死後脳を用いた細胞種を考慮した発現解析

研究課題名(英文)Cell-type specific expression analysis in postmortem brains of patients with schizophrenia

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)：本研究の目的は、統合失調症患者の脳組織において、どの細胞種でどのような遺伝子発現変化が生じているかを明らかにすることを通じて、疾患の分子病態の理解を進めることである。そのために患者・健常者の死後脳前頭葉のさまざまな細胞種の細胞核から、RNA-seqによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、患者-健常者間で発現差異が見られる遺伝子の検出を行った。その結果、オリゴデンドロサイトにおいてイオンチャンネル関連遺伝子、活性型マイクログリアにおいてシナプスに関連する遺伝子の発現変動が検出され、これらの細胞種や遺伝子が統合失調症の病因に寄与する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで行われてきた精神疾患患者の死後脳発現解析は、バルク組織片を使用したものがほとんどであり、患者-健常者間で発現差異が認められた場合でも、どの細胞種でどのような変化が生じているのか、といった分子病態の理解のための本質的な問いに答えることは困難であった。今回の研究では、細胞種ごとに細胞核を分画してから発現解析を行うことにより、オリゴデンドロサイト、活性型マイクログリアにおいて、それぞれイオンチャンネル、シナプスに関連する遺伝子の発現変動が検出され、これらの細胞種や遺伝子が統合失調症の病因に寄与する可能性が考えられ、新規の創薬などにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to understand the molecular pathogenesis of schizophrenia by clarifying the gene expression changes occur in each cell type of the brain tissues of schizophrenia patients. For this purpose, we performed comprehensive gene expression analysis by RNA-seq using RNA in the cell nuclei of various cell types in the postmortem frontal lobes. We detected the gene expression changes of ion channel-related genes in the oligodendrocyte fraction, synapse-related genes in the active microglia fraction between patients and controls. It suggested that these cell types and the genes may contribute to the etiology of schizophrenia.

研究分野：分子精神医学

キーワード：統合失調症患者 死後脳 細胞種分画 RNA-seq

### 1. 研究開始当初の背景

統合失調症や双極性障害を含む精神疾患は、近年患者数において、がん・脳卒中・心臓病・糖尿病などを大きく上回っており、2013年に厚生労働省により重点的に対策に取り組むべき「5大疾病」の一つに加えられた。これまで、病理学・生化学・遺伝学など多方面から数多くの研究が行われてきたが、病因や分子病態はほとんど明らかになっておらず、根治薬の開発や適切な治療戦略の確立が大幅に遅れている。

精神疾患患者死後脳を使用した研究は、動物モデルと比較し多くの制約があるものの、いまだ病因が明らかになっていない精神疾患において、原因臓器に生じている事象を直接調べる、という他のアプローチにはない長所がある。そのため、これまでに患者死後脳を使用して、ゲノム・エピゲノム解析、遺伝子発現、タンパク質の発現解析など、多数のオミックス解析が行われてきた。特に遺伝子発現状態は、細胞機能の生理学的・病理学的状態の理解が容易であることから過去に集中して研究されてきた経緯がある。しかし、患者死後脳試料を用いた研究結果は、他の研究では追試されないことも多く、データの再現性に大きな問題があった。

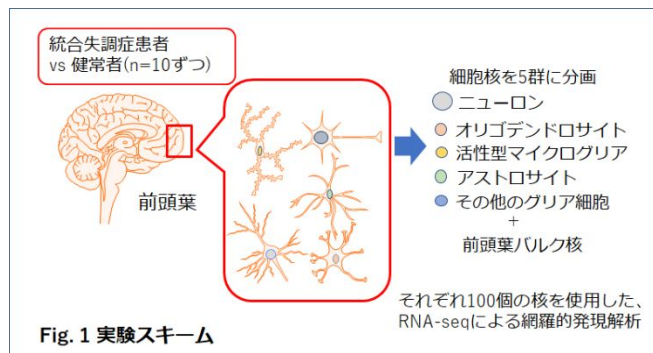
その原因として、死後脳試料の希少性によるサンプルサイズの小ささ、加齢や投薬、死後変化の状態などを統制することの困難さに加え、特に問題となりうるのは、使用組織片に含まれる細胞種の比率の違いである。脳は興奮性ニューロン・抑制性ニューロンを含む神経細胞、それら取り囲むオリゴデンドロサイト・アストロサイト・マイクログリアなどのグリア細胞から構成される極めて複雑な臓器である。それぞれの細胞由来のRNAは、細胞種特異的な発現プロファイルを示すことが知られているが、これまでの死後脳研究では組織片をホモジネートした試料を用いたものであり、群間に差異が認められた場合でも、それが実験に使用した組織内の細胞数比の違いによるものなのか、実際に群間の差異を検出しているのかを知ることは困難であった。また、様々な細胞種のデータを混合して得られた結果であるため、どの細胞種でどのような変化が生じているのか、といった分子病態の理解のための本質的な問いに答えることは困難であった。このような問題は、我々が確立してきた技術を用い、死後脳組織を細胞種ごとに分画してから解析を行うことにより、解消できると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、統合失調症患者の脳において、どの細胞種でどのような遺伝子発現変化が生じているかを明らかにすることで、精神疾患の分子病態の理解を進め、将来の創薬の起点を得ることである。患者・健常者の死後脳前頭葉からさまざまな細胞種由来の細胞核を分画したのち網羅的な遺伝子発現解析を行い、患者-死後脳間で発現差異が見られる遺伝子を検出することにより、病態・病因に関与する分子やパスウェイを同定することを目指した。これまでに行われているバルク死後脳組織を使用した発現解析でも、多くの候補遺伝子が同定されているが、それらが追試されることは少ないため、患者内で実際に変動がある遺伝子を同定できていない可能性がある。申請者らは、凍結死後脳試料から様々な細胞種を分画する技術を継続して開発しており、神経細胞と非神経細胞といった大別に加え、非神経細胞分画においてはオリゴデンドロサイト、活性型マイクログリア、アストロサイトといった詳細な細胞核分画を可能にしている。本計画ではこれらの技術を駆使し、これまで行われてきた単純なオミックス研究とは一線を隔す解析を行い、統合失調症の分子病態を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

使用したサンプル：年齢・性別などを対応させた統合失調症患者・健常者死後脳の前頭葉（米国スタンレー財団から譲渡）を、それぞれ10サンプルずつ使用した。前頭葉は、統合失調症患者において抑制性神経細胞やオリゴデンドロサイトの機能異常などが多く報告されている脳部位であり、発現変動が認められる可能性が高いと考えられる (Fig. 1)。



方法：

#### 1. 健常者・統合失調症患者前頭葉からの細胞核の分画

今回の研究では、前頭葉における神経細胞、オリゴデンドロサイト、活性型マイクログリア、アストロサイト、その他のグリア細胞由来の核内RNAについて解析を行った。前頭葉組織からパーコール密度遠心勾配法により生化学的に細胞核画分を調製し、神経細胞の細胞核に特異的に発現しているタンパク質である NeuN、オリゴデンドロサイトの細胞核のみに発現している Olig2、活性型マイクログリアやアストロサイトの細胞核に特異的に発現しているタンパク質に

対する抗体で蛍光染色を行い、セルソーター(BD AriaIII) で 5 群の細胞核に分画した。

## 2. 細胞核 RNA を使用したトランスクリプトーム解析

それぞれの細胞種およびバルク核画分から、100 個ずつの細胞核を使用して、シングルセルの RNA-seq において実績のある RamDA-seq 法でライブラリ作成を行い、Illumina 社の Nova-Seq 6000 を使用してシーケンシングを行った。ライブラリ作成とシーケンスは、サンプルを 2 バッチに分けて実験を行った (バッチ 1: 患者・健常者 n=3 ずつ、バッチ 2: n=7 ずつ)。

## 3. データ解析

得られたシーケンスデータについて、Table.1 に示したツール類を使用して、インフォマティクス解析を行った。

細胞種ごとに患者-健常者間で異なる発現量を示す遺伝子の同定を行い、発現変動が認められた遺伝子について、遺伝子オントロジー (GO)解析を行い、どのような機能を持つ遺伝子に発現変動が集積しているのかを解析した。

解析ステップ	使用したツール
データのクオリティコントロール	FastQC
リードのトリミング	Trim Galore
マッピング	HISAT2
データの数値化	StringTie
患者-健常者間の発現量比較	edgeR

Table 1 インフォマティクス解析に使用したツール類

## 4. 研究成果

### 1. RNA-seq のクオリティコントロール

各ライブラリにつき、400 万-1000 万リードほどのデータが得られており、Q30 以上の Q スコアを示す塩基が 90%程度と、良好な値を示した。ヒトゲノムへのマッピング率はバッチ 1 の平均が 74.9%、バッチ 2 の平均が 52.1%と、ややバッチ間差を示した。

### 2. 細胞種による発現特異性の検証

患者・健常者すべてのライブラリから、マッピング率 60%以上を示した発現データを使用して tSNE 解析を行い、細胞種ごとに特異的な遺伝子発現を示すかを検証した。その結果、細胞種ごとにクラスターを形成しており、それぞれの細胞種内では似た発現パターンを示すことが分かった(Fig. 2)。またそれぞれの細胞種で発現していた遺伝子について GO 解析を行ったところ、それぞれの細胞種で発現が知られている遺伝子群が抽出された。

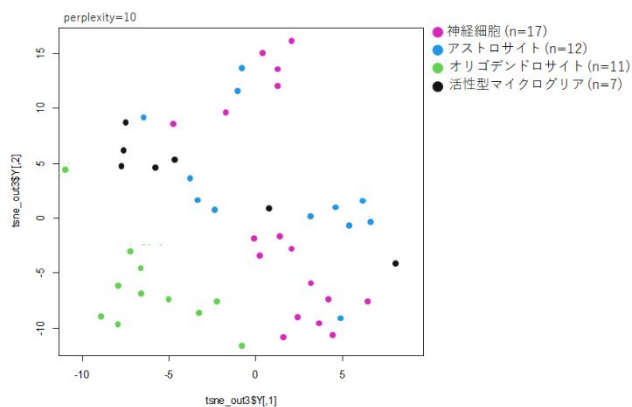


Fig. 2 マッピング率60%以上のデータを使用したtSNE解析

### 3. 統合失調症患者-健常者間における発現変動の検出

それぞれの細胞種内で、統合失調症患者 (SZ)-健常者 (CT)間の発現変動の検出を行った。得られたデータのうち、マッピング率 50%以上を示したライブラリデータを使用し、すべてのライブラリでリードカウント数が 10 以上存在した遺伝子について、解析を行った。その結果、神経細胞 (CT:SZ=9:8) 1112 遺伝子、アストロサイト (CT:SZ=7:7) 6487 遺伝子 では、発現変動を示す遺伝子が存在しなかった一方、オリゴデンドロサイト (CT:SZ=4:8) 11147 遺伝子、活性型マイクログリア (CT:SZ=3:8) 9057 遺伝子の解析では、発現変動を示す遺伝子が抽出された。発現変動を示した遺伝子について、GO 解析を行った結果、オリゴデンドロサイトでは、cation channel activity, ion channel activity といったイオンチャンネルに関するターム、活性型マイクログリアでは、synapse など神経機能に関わるタームが抽出され (Fig. 3)、統合失調症患者の前頭葉ではこれらの細胞種や遺伝

#### オリゴデンドロサイト画分

##### 1: GO: Molecular Function

ID	Name	Source	pValue	FDR B&H	FDR B&Y	Bonferroni
1	GO:0005261	cation channel activity	8.038E-6	6.244E-4	3.367E-3	9.887E-4
2	GO:0005216	ion channel activity	1.733E-5	6.244E-4	3.367E-3	2.131E-3
3	GO:0099094	ligand-gated cation channel activity	2.225E-5	6.244E-4	3.367E-3	2.737E-3
4	GO:0015267	channel activity	2.524E-5	6.244E-4	3.367E-3	3.104E-3
5	GO:0022803	passive transmembrane transporter activity	2.538E-5	6.244E-4	3.367E-3	3.122E-3

#### 活性型マイクログリア画分

##### 3: GO: Cellular Component

ID	Name	Source	pValue	FDR B&H	FDR B&Y	Bonferroni
1	GO:0045202	synapse	2.162E-5	3.264E-3	1.827E-2	3.264E-3
2	GO:0043034	costamere	9.846E-5	4.486E-3	2.511E-2	1.487E-2
3	GO:0032279	asymmetric synapse	1.536E-4	4.486E-3	2.511E-2	2.319E-2
4	GO:0014069	postsynaptic density	1.536E-4	4.486E-3	2.511E-2	2.319E-2
5	GO:0031430	M band	1.848E-4	4.486E-3	2.511E-2	2.791E-2

Fig. 3 疾患-健常者間で発現変動があった遺伝子のGO解析

子群が発症に関わる可能性が示唆された。

ただし今回の解析では、リードのマッピング率にバッチ間差が認められており、解析結果に大きな影響を与えてしまっている可能性が考えられる。そのため、現在はバッチ間差を緩和するツールを用いて再解析を行い、さらに正確なデータを得ることを目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 文東美紀、清田恵美、岩本和也	4. 巻 276
2. 論文標題 精神疾患患者試料を使用した1細胞研究の現在	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1022-1026
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7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

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 patients with schizophrenia
3. 学会等名 World Congress of Psychiatric Genetics (国際学会)
4. 発表年 2020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 Cold Spring Harbor Laboratory meeting on Transposable Elements (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 文東美紀、上田順子、清田恵美、笠井清登、加藤忠史、岩本和也
2. 発表標題 統合失調症患者脳のシングルセルレベルでのLINE-1新規挿入の検出
3. 学会等名 第43回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Bundo M, Kato T, Iwamoto K
2. 発表標題 Detecting somatic variations in human brain cells at single cell level.
3. 学会等名 第41回日本神経科学学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 文東美紀
2. 発表標題 精神疾患患者検体を用いたエピジェネティクス解析
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 文東美紀、加藤忠史、岩本和也
2. 発表標題 脳神経細胞分画技術を基盤とした体細胞変異の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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 insertion of LINE-1 at single cell level using postmortem brains of patients with schizophrenia.
3. 学会等名 World Congress of Psychiatric Genetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 文東美紀、岩本和也	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 258
3. 書名 バイオイノベーションに向けて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部分子脳科学講座 <a href="https://www.molbrain.com/">https://www.molbrain.com/</a> 熊本大学大学院生命科学研究部分子脳科学講座 <a href="https://www.molbrain.com/">https://www.molbrain.com/</a> 熊本大学大学院生命科学研究部 先端生命医療科学部門 分子脳科学講座 <a href="https://www.molbrain.com/">https://www.molbrain.com/</a>
--

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