

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10678

研究課題名(和文) ヒト死後脳single cell 解析による、精神疾患リスク遺伝子発現様態の解明

研究課題名(英文) Elucidating expression status of mental illness-related genes, based on single cell analysis of human-postmortem samples

研究代表者

高橋 遥一郎 (Takahashi, Yoichiro)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：50640538

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)：ヒト死後脳を用いて、統合失調症の発症と関連する遺伝子(SNX19遺伝子とAS3MT遺伝子)の発現を定量的に評価し、特に統合失調症のリスクと強く相関する特定のスプライシングバリエント(SNX19d9およびAS3MTd2d3)に関してsingle molecule in situ hybridization法を用いて評価し、これらの転写産物がそれぞれ異なる神経細胞に偏在することを示した。これらの結果は、各々の統合失調症関連遺伝子が、比較的少数の特定の細胞においてその正常な機能を阻害することで精神疾患の発症に関与することを示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症と関連する遺伝子の発現様態について、ヒト死後脳を解析試料として、一細胞・一分子レベルでの評価を行った。特にSNX19遺伝子とAS3MT遺伝子について解析したところ、これらの遺伝子は共に神経細胞に発現していたが、それぞれが異なった種類の神経細胞で強く発現することが明らかになった。従って、これらの遺伝子異常は比較的限られた種類の神経細胞に異常を引き起こして疾患の発症に関与することが推測された。

研究成果の概要(英文)：Using postmortem human brains, the expression pattern of SNX19 and AS3MT, which are genes associated with the development of schizophrenia, was quantitatively evaluated. Especially, the specific splicing variants, SNX19d9 and AS3MTd2d3 that are strongly correlated with risk of schizophrenia, was examined using single molecule in situ hybridization technique. As a result, each transcripts tended to localize specific neuronal cell types. These results suggested that each schizophrenia-related gene is involved in the pathogenesis of psychiatric disorders by disrupting their normal function in a relatively small number of specific cell types.

研究分野：法医学

キーワード：死後脳 精神疾患 統合失調症 法医学 体細胞変異

1. 研究開始当初の背景

2014年, Psychiatric Genomics Consortiumは累計15万人を超えるヒトのゲノム解析に基づき統合失調症と関連する108の遺伝子座を同定した¹⁾.しかし,疾患発症リスクと相関するとされたsingle nucleotide polymorphism (SNP)の多くがノンコーディング領域に位置していたために直接的な病態解明には至らず,ヒト死後脳を試料とした遺伝子発現解析が必要となった.

ヒト死後脳を対象としてゲノム解析及び脳の各部位におけるトランスクリプトーム解析を行い,複数のexpression quantitative trait loci (eQTL)を同定し,前述のSNPとこれらeQTL間の連鎖不平衡解析を行うことで,統合失調症発症リスクと相関する遺伝子とその発現調節機構が徐々に明らかにされてきた.近年,Sorting Nexin 19 (SNX19)及びArsenic (+3 oxidation state) Methyltransferase (AS3MT)が統合失調症の発症リスク遺伝子として新たに報告され,さらに同遺伝子領域内で発症リスクと最も相関するSNP及びvariable number of tandem repeat (VNTR)が同定された^{2,3)}.興味深いことに,これらの遺伝子では全長のmRNAではなく,特定のエクソンが欠損したスプライシングバリエーション (SNX19^{d9} 及び AS3MT^{d2d3}) が強い疾患リスクを保持していた.疾患発症リスクと相関する転写産物を分子レベルで同定できるようになってきたと言える.

2. 研究の目的

これらの転写産物が疾患発症リスクを高める生物学的な機序を解明する必要がある.しかし, SNX19^{d9} や AS3MT^{d2d3} は機能ドメインが欠損した蛋白質をコードする, AS3MT^{d2d3} はマウスでの発現はみられず,ヒト特異的に発現している, SNX19 及び AS3MT が優位に発現する細胞種が不明, SNX19^{d9} 及び AS3MT^{d2d3} の発現量は全アイソフォーム中の8-20%程度でありsingle nuclei RNA-seq で解析を行うには発現量が不足,等の理由により,これらの転写産物が統合失調症のリスクに関わる機序が不明であった.そこで,これらのリスク転写産物の分布をヒト死後脳組織上で一細胞レベル・一分子レベルで明らかにし,転写産物の発現様態の詳細を解明することとした.

3. 研究の方法

研究方法の概略を図1に示す.

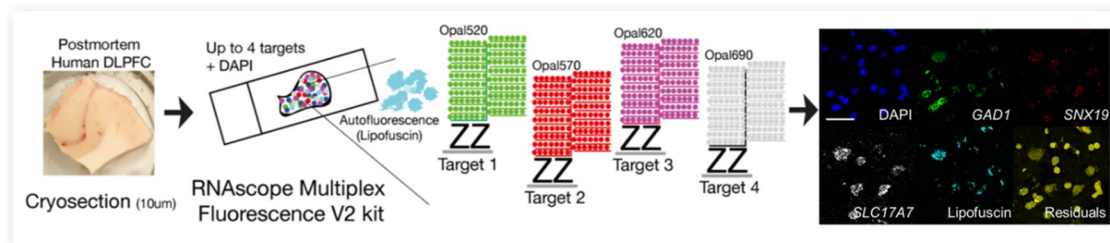


図1. 研究方法の概略

(1) まず, single molecule fluorescent in situ hybridization (smFISH)法により,リスク転写産物の分布をヒト死後脳組織上で一細胞レベル・一分子レベルで明らかにすることとした.しかしヒト死後脳組織では強い自家蛍光が存在するため,定量解析の信用性・再現性が問題となった.そこで,一細胞・一分子レベルの正確な転写産物定量を可能とする新たな画像解析法を開発した.

(2) 次に,開発した同手法を上記のリスク遺伝子に適用し,精神疾患の無い16-30歳のヒト死後脳前頭前皮質背外側部におけるAS3MT, SNX19 遺伝子の発現分布を定量的に測定した.

4. 研究成果

(1) 定量解析の信用性・再現性を改善した新たな画像解析法として,共焦点レーザー顕微鏡でspectral imaging撮影を行いlinear unmixing法により自家蛍光を分離した後,新規に開発したコンピュータプログラムで解析することで,一細胞・一分子レベルの正確な転写産物定量を可能とすることが出来た⁴⁾.図2に, spectral imagingによってリポフスチンに由来する自家蛍光が分離された様子を示す.

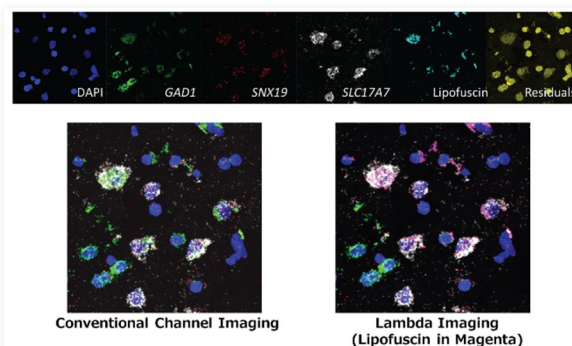


図2. Spectral imagingによる自家蛍光の分離

(2) 神経細胞や各種グリア細胞に特異的に存在する転写産物をマーカーとして multiplex

smFISH を行った結果、両リスク遺伝子ともグリア細胞より神経細胞において強く発現することが示された。またグルタミン酸デカルボキシラーゼ遺伝子及びグルタミン酸トランスポーター遺伝子発現をマーカーとした smFISH では、SNX19 遺伝子がグルタミン酸作動性神経細胞で比較的強く発現する一方、AS3MT 遺伝子は GABA 作動性神経細胞において強く発現することが明らかとなった⁵⁾。図 3 に、代表的な smFISH 画像と、その解析結果を示す。

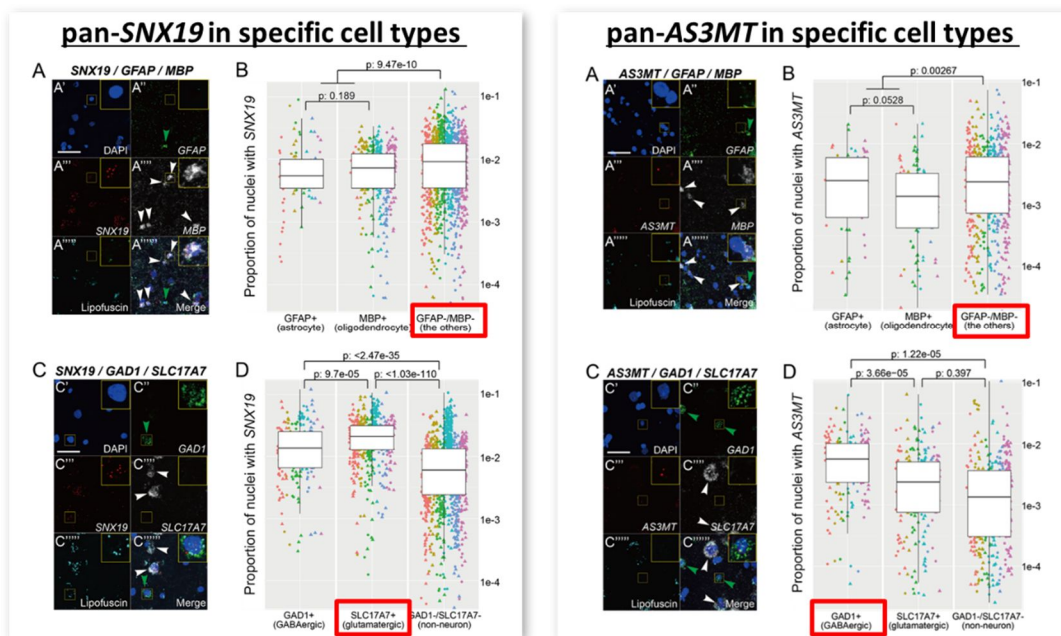


図 3 . SNX19 と AS3MT 発現について、代表的な smFISH 画像とその解析結果

さらに超高感度プローブを用いた ISH 法により、SNX19^{d9} 及び AS3MT^{d2d3} 等の特定のリスクスプライシングバリエントも同様の分布傾向を示すことが証明された⁵⁾。特定のスプライシングバリエントに着目した解析結果を図 4 に示す。

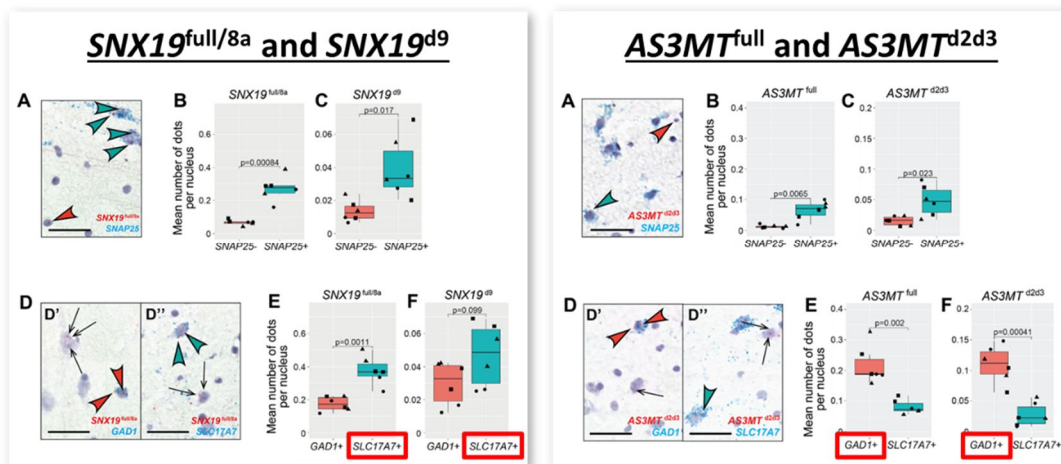


図 4 . 特定のスプライシングバリエントに着目した ISH 画像とその解析結果

以上の結果から、統合失調症発症リスクと関連する転写産物の発現分布をヒト死後脳において一細胞・一分子レベルで測定することが出来、統合失調症の分子基盤解明に寄与することが出来たと言える。

文献

- 1) Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. *Nature*. 511:421-427, 2014.
- 2) Li M, et al. *Nature Medicine*. 22:649-56, 2016.
- 3) Ma L, et al. *Molecular Psychiatry*. 25:831-843, 2020.
- 4) Maynard KR, et al. *Nucleic Acids Research*. 48:e66, 2020.
- 5) Takahashi Y, et al. *Molecular Psychiatry*. 26:3536-3547, 2021.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sano Rie, Takahashi Yoichiro, Fukuda Haruki, Harada Megumi, Hayakawa Akira, Okawa Takafumi, Kubo Rieko, Takeshita Haruo, Tsukada Junichi, Kominato Yoshihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 A cell-specific regulatory region of the human ABO blood group gene regulates the neighborhood gene encoding odorant binding protein 2B	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86843-6	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 Takahashi Yoichiro, Maynard Kristen R., Tippani Madhavi, Jaffe Andrew E., Martinowich Keri, Kleinman Joel E., Weinberger Daniel R., Hyde Thomas M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Single molecule in situ hybridization reveals distinct localizations of schizophrenia risk-related transcripts SNX19 and AS3MT in human brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	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/s41380-021-01046-9	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 該当する
1. 著者名 Takahashi Yoichiro, Hayakawa Akira, Sano Rie, Fukuda Haruki, Harada Megumi, Kubo Rieko, Okawa Takafumi, Kominato Yoshihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibitors suppress ACE2 and ABO simultaneously, suggesting a preventive potential against COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82970-2	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 Tokue Hiroyuki, Kominato Yoshihiko, Sano Rie, Takahashi Yoichiro, Hayakawa Akira, Fukuda Haruki, Tokue Azusa, Tsushima Yoshito	4. 巻 6
2. 論文標題 Characteristic postmortem computed tomography findings of ingestion of benzene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BJR case reports	6. 最初と最後の頁 20200212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1259/bjrcr.20200212	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 Takahashi Yoichiro, Sano Rie, Hayakawa Akira, Fukuda Haruki, Kubo Rieko, Okawa Takafumi, Tokue Hiroyuki, Takei Hiroyuki, Kominato Yoshihiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Superimposed CT imaging using fusion function to visualize the relationship between the knife and the wound path in a stabbing victim	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Forensic Sciences	6. 最初と最後の頁 1148 ~ 1153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1556-4029.14653	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 Maynard Kristen R, Tippani Madhavi, Takahashi Yoichiro, Phan BaDoi N, Hyde Thomas M, Jaffe Andrew E, Martinowich Keri	4. 巻 48
2. 論文標題 dotdotdot: an automated approach to quantify multiplex single molecule fluorescent in situ hybridization (smFISH) images in complex tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e66 ~ e66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa312	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 該当する

1. 著者名 Maynard Kristen R, Tippani Madhavi, Takahashi Yoichiro, Phan BaDoi N, Hyde Thomas M, Jaffe Andrew E, Martinowich Keri	4. 巻 -
2. 論文標題 dotdotdot: an automated approach to quantify multiplex single molecule fluorescent in situ hybridization (smFISH) images in complex tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	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) 10.1093/nar/gkaa312	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 該当する

1. 著者名 Takahashi Yoichiro, Hayakawa Akira, Sano Rie, Fukuda Haruki, Kubo Rieko, Kominato Yoshihiko, Kimura Satoko, Takada Aya, Saito Kazuyuki, Takei Hiroyuki, Awata Sachiko, Tokue Hiroyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Tuberous sclerosis related-lesions detected by postmortem computed tomography	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Forensic Imaging	6. 最初と最後の頁 200376 ~ 200376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fri.2020.200376	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 Kominato Yoshihiko, Sano Rie, Takahashi Yoichiro, Hayakawa Akira, Ogasawara Kenichi	4. 巻 60
2. 論文標題 Human ABO gene transcriptional regulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 860 ~ 869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15760	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 Hayakawa Akira, Sano Rie, Takahashi Yoichiro, Kubo Rieko, Harada Megumi, Omata Masato, Yokohama Akihiko, Handa Hiroshi, Tsukada Junichi, Takeshita Haruo, Tsuneyama Hatsue, Ogasawara Kenichi, Kominato Yoshihiko	4. 巻 60
2. 論文標題 RUNX1 mutation in a patient with myelodysplastic syndrome and decreased erythrocyte expression of blood group A antigen	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transfusion	6. 最初と最後の頁 184 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/trf.15628	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24件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 高橋遥一郎, 佐野利恵, 早川輝, 福田治紀, 武井宏行, 徳江浩之, 小湊慶彦.
2. 発表標題 刺創における、損傷と成傷器の関係性の描出にCTフュージョン画像を用いた一例.
3. 学会等名 第19回法医画像勉強会 / 第17回群馬Ai研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田治紀, 佐野利恵, 早川輝, 高橋遥一郎, 窪理英子, 小湊慶彦.
2. 発表標題 死後CT 仮想内視鏡の有用性の検討.
3. 学会等名 第19回法医画像勉強会 / 第17回群馬Ai研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武井宏行, 平澤聡, 早川輝, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 小湊慶彦.
2. 発表標題 法医学分野で有用なAi CT画像作成のポイント.
3. 学会等名 第19回法医画像勉強会 / 第17回群馬Ai研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayakawa A, Sano R, Takahashi Y, Fukuda H, Yokohama A, Handa H, Tsuneyama H, Ogasawara K, Kominato Y.
2. 発表標題 RUNX1 mutation in a patient with myelodysplastic syndrome and decreased erythrocyte expression of blood group A antigen.
3. 学会等名 The 36th International congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野利恵, 福田治紀, 高橋遥一郎, 早川輝, 窪理英子, 小湊慶彦.
2. 発表標題 ABO遺伝子エンハンサーは0BP2B遺伝子発現を活性化する.
3. 学会等名 日本DNA多型学会第29回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋遥一郎, 早川輝, 佐野利恵, 福田治紀, 木村聡子, 高田綾, 齋藤一之, 小湊慶彦.
2. 発表標題 死後画像検査の結節性硬化症における有用性の検討.
3. 学会等名 第89回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋遥一郎.
2. 発表標題 死後脳研究を礎として精神疾患の分子基盤解明を目指す.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田治紀, 佐野利恵, 早川輝, 高橋遥一郎, 窪理英子, 小湊慶彦.
2. 発表標題 死後CT 仮想内視鏡を用いた消化管内検索の有用性.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋遥一郎, 早川輝, 佐野利恵, 福田治紀, 小湊慶彦.
2. 発表標題 死後変化が進行する心臓に対して死後CT 血管造影検査が有用であった一例.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐野利恵, 早川輝, 高橋遥一郎, 福田治紀, 窪理英子, 小湊慶彦.
2. 発表標題 ABO式血液型判定でみられるmixed field agglutinationは血液型亜型か? それとも骨髓悪性疾患か?
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 早川輝, 氣賀澤秀明, 木村聡子, 斎藤一之, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 福田治紀, 窪理英子, 小湊慶彦.
2. 発表標題 冠状動脈起始部位・走行異常(AAOLCA-IA)に合併した、Stanford A型急性大動脈解離の一部検例.
3. 学会等名 第104次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横濱章彦, 西本奈津美, 岩原かなえ, 石川怜依奈, 須佐梢, 丸橋隆行, 関上智美, 早川輝, 高橋遥一郎, 佐野利恵, 小湊慶彦.
2. 発表標題 ABO式血液型判定でみられるmixed field agglutination における血液型亜型と造血管腫瘍の違い.
3. 学会等名 第68回日本輸血・細胞治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takahashi Y, Maynard KR, Tippani M, Jaffe AE, Martinowich K, Weinberger DR, Hyde TM.
2. 発表標題 Evaluation of the cell type-specific expression of schizophrenia risk-related transcripts in postmortem human dorsolateral prefrontal cortex using single molecule in situ hybridization
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tippani M, Maynard KR, Takahashi Y, Phan B, Weinberger DR, Hyde TM, Martinowich K, Jaffe AE.
2. 発表標題 Dotdotdot - automated workflow for quantification and analysis of RNA transcripts in individual nuclei.
3. 学会等名 BioImage Informatics 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野利恵, 早川輝, 高橋遥一郎, 窪理英子, 小湊慶彦.
2. 発表標題 A B O式血液型判定でみられるmixed field agglutinationは血液型亜型か? それとも骨髓悪性疾患か?
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野利恵, 早川輝, 高橋遥一郎, 横濱章彦, 小湊慶彦.
2. 発表標題 ABO式血液型判定でみられるmixed field agglutinationは血液型亜型か? それとも骨髓悪性疾患か?
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋遥一郎, 早川輝, 佐野利恵, 木村聡子, 高田綾, 齋藤一之, 小湊慶彦.
2. 発表標題 結節性硬化症 2 例における死後画像検査の有用性の検討.
3. 学会等名 第88回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐野利恵, 早川輝, 高橋遥一郎, 横濱章彦, 半田寛, 塚田順一, 小笠原健一, 小湊慶彦.
2. 発表標題 骨髓異形成症候群の一患者におけるABO式血液型抗原量低下の原因解明.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川輝，佐野利恵，高橋遥一郎，小湊慶彦，半田寛，丸橋隆行，横濱章彦。
2. 発表標題 骨髓異形成症候群の一患者におけるABO式血液型抗原量低下の原因解明。
3. 学会等名 第66回北関東医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川輝，佐野利恵，高橋遥一郎，小湊慶彦。
2. 発表標題 交通事故受傷後2日後に突然心肺停止となった外傷性脳梗塞の1剖検例。
3. 学会等名 第2回日本法医病理学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川輝，佐野利恵，高橋遥一郎，窪理英子，小湊慶彦。
2. 発表標題 骨髓異形成症候群の一患者におけるABO式血液型抗原量低下の原因解明。
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川輝，佐野利恵，高橋遥一郎，小湊慶彦。
2. 発表標題 死後CT検査において見出された刺青のイメージ。
3. 学会等名 第103次日本法医学会学術全国集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川輝, 佐野利恵, 高橋遥一郎, 丸橋隆行, 横濱章彦, 半田寛, 常山初江, 小笠原健一, 小湊慶彦.
2. 発表標題 骨髓異形成症候群の一患者におけるABO式血液型抗原量低下の原因解明.
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayakawa A, Sano R, Takahashi Y, Akuzawa H, Kominato Y.
2. 発表標題 Tattoo image composed of radiopaque deposits demonstrated by postmortem computed tomography.
3. 学会等名 The 8th Congress of the International Society of Forensic Radiology and Imaging (ISFRI2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	小湊 慶彦 (Kominato Yoshihiko) (30205512)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	
研究分担者	窪 理英子 (Kubo Rieko) (40747127)	群馬大学・医学部・技術職員 (12301)	
研究分担者	早川 輝 (Hayakawa Akira) (90758575)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	佐野 利恵 (Sano Rie) (70455955)	群馬大学・大学院医学系研究科・准教授 (12301)	

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