

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21570

研究課題名(和文)尿細胞より直接誘導した神経前駆細胞を用いる脳神経疾患のマルチオミクス解析

研究課題名(英文) Multiomics analysis of neurological diseases using neural progenitor cells directly derived from urinary cells

研究代表者

才津 浩智 (Saito, Hirotomo)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40402838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、尿中上皮細胞(human urine-derived cells: hUDCs)に注目した研究であり、hUDCsと、現在のマルチオミクス解析のゴールドスタンダードである皮膚線維芽細胞の発現プロファイルが酷似していることを明らかにした。hUDCsは非侵襲的に取得可能であり、またhUDCsからのiPS細胞樹立にも成功しており、更なる機能解析への展開も可能な、Clinically accessible tissueであることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hUDCsは、皮膚線維芽細胞の代替細胞として非侵襲的に取得可能である点が優れており、今後採取方法に更なる改良を加えることで、マルチオミクス解析を用いた遺伝子解析研究におけるパラダイムシフトを起こすことが期待される。実際にhUDCsを用いたRNA-seq解析で原因未同定であった家族例の原因同定に成功しており、疾患原因が不明で苦しむ患者の助けになる臨床的意義の高い研究成果である。

研究成果の概要(英文)：This study focuses on human urine-derived cells (hUDCs). The expression profiles of hUDCs and skin fibroblasts, which is the gold standard for current multiomics analysis, are very similar. It was clarified that hUDCs are clinically accessible tissues that can be obtained non-invasively, have succeeded in establishing iPS cells from hUDCs, and can be expanded to further functional analysis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：尿細胞 RNA-seq マルチオミクス解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

希少遺伝性疾患の遺伝子・ゲノム解析において、エクソーム解析(遺伝子のエクソンを網羅的に解析)によっても病的変異が同定できない症例が半数以上認められる。近年、全ゲノム解析(すべてのゲノム塩基配列を決定)とRNA解析(RNA-seq)を統合したマルチオミクス解析が、遺伝子発現量やスプライシング異常の観点からイントロンや転写調節領域の変異・ゲノム構造異常の意味づけを可能にし、エクソーム解析で原因未同定例の原因解明のための強力な研究手法として注目されている(Cummingsら *Genet Med.* 2015; Kremerら *Nat Commun.* 2017)。しかし、脳神経疾患のRNA解析では罹患組織(脳)の入手が困難であるため、末梢血単核細胞で代用されているのが現状であり、大きな課題となっていた。一方、入手が容易な末梢血白血球と比べて、侵襲が必要な皮膚線維芽細胞の方が多くのメンデル遺伝病の原因遺伝子が高発現しており、RNA-seqによる遺伝子診断に有用であることが示されている(Murdock et al., *J Clin Invest.* 2021)。しかしながら、皮膚線維芽細胞の採取には皮膚生検という侵襲があり、RNA シークエンスを遺伝子診断システムに組み入れる際の課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究は以下の目的を有する。

- (1) 尿中上皮細胞(human urine-derived cells: hUDCs)から直接誘導した神経前駆細胞の樹立: 非侵襲的、短期間、シンプルな操作で実現可能な、integration-freeの患者由来神経細胞モデルの確立
- (2) 末梢血単核球から直接誘導する神経様細胞の樹立: 末梢血単核球からわずか3日間で神経細胞が誘導されるという報告があり(Ninomiyaら bioRxiv 2019)、この方法で更に迅速な患者由来神経細胞のRNA解析が可能か検証する
- (3) マルチオミクス解析による原因解明: エクソーム解析を行ったが原因不明の症例に対して全ゲノム解析と患者由来の神経前駆細胞を用いたRNA-seq解析を行い、原因を解明する

3. 研究の方法

- (1) hUDCsから直接誘導した神経前駆細胞の樹立: 既報(Zhouら *Nat Protoc.* 2012)に従い、尿100mlから回収した上皮細胞を、ゼラチンコートした12ウェルプレートの1ウェルに播き、12日程度培養する。その後、5% O₂の低酸素条件下で20日間培養し、中間細胞を得る。この細胞を、ヘパリン、EGF、bFGFの成長因子を加えた培地で7-10日培養し、神経前駆細胞を得る。この方法以外に、hUDCsからのiPS細胞の樹立を試みた。
- (2) 末梢血単核球から直接誘導する神経様細胞の樹立: 既報(Ninomiyaら bioRxiv 2019)に従い培養する。神経様細胞への分化を促進するために、マウスのグリア細胞との共培養を行った。
- (3) マルチオミクス解析による原因解明: (1)および(2)で得られた神経前駆細胞あるいは神経様細胞、およびhUDCsによるRNA-seqを施行し、細胞の性質を主成分分析で明らかにするとともに、スプライス異常の同定による原因解明を行った。

4. 研究成果

- (1) hUDCsから直接誘導した神経前駆細胞の樹立: 既報(Chengら *Cell Res.* 2014)に従い、神経前駆細胞の樹立を試みた。しかしながら、低酸素+低分子での培養では神経前駆細胞のコロニーが認められたものの、その増殖は不良で、尿細胞との混合培養からRNA-seq用の検体をえることは難しかった。そのため、hUDCsからiPS細胞の樹立を試み、RNAをトランスフェクションする方法でiPS細胞株を樹立することができた。以下に述べるように、hUDCsそのものがRNA-seqでの脳神経疾患の解析に有用であることが分かったため、hUDCsによるRNA-seq解析をまず第一に行い、不明例についてはiPS細胞を樹立して神経分化させて解析するという2段階の研究スキームが最適と考えられた。
- (2) 末梢血単核球から直接誘導する神経様細胞の樹立: 既報(Ninomiyaら bioRxiv 2019)に従って培養を行ったが、神経様の突起を伸張させる細胞が少なかったため、マウスの初代神経細胞培養で行っている方法を応用し、グリア細胞との共培養という新たな培養方法を導入することで3日間培養での形態変化を促進することに成功した。短時間の培養時間であることも考えると、非常に有効な手法と考えられたが、得られるRNA量が少なく、手技も煩雑であるため、既に述べた2段階の研究スキームが最適と考えられた。
- (3) マルチオミクス解析による原因解明: hUDCs、神経様細胞、末梢血単核細胞、皮膚線維芽細胞、リンパ芽球、iPS細胞のRNA-seqデータによる主成分分析を行い、細胞の性質を調べた。その結果、図1に示すようにhUDCsは皮膚線維芽細胞と似た発現パターンを呈しており、神経様細胞は末梢血単核細胞と似た発現プロファイルを持つことが明らかとなった。神経様細胞は、髄鞘形成不全に関わる126遺伝子のうち、96遺伝子がTPM(Transcripts Per Million)>10で高発現しており(図2)、末梢血単核細胞よりも多くの遺伝子で発現解析が

可能であった。

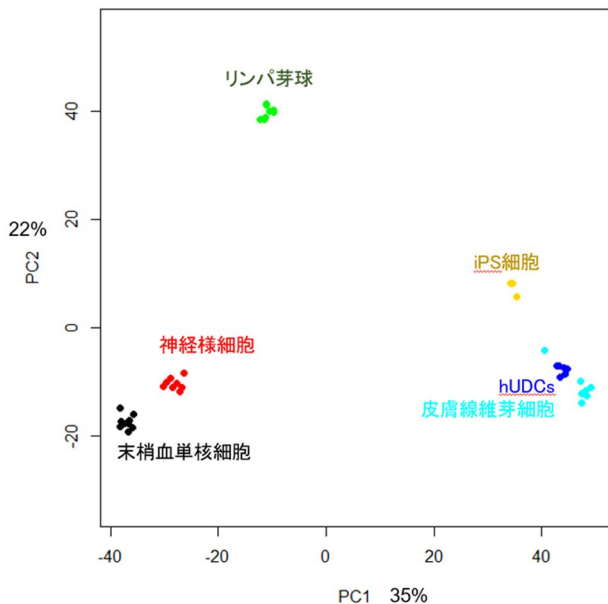


図 1. 主成分分析による細胞の分類

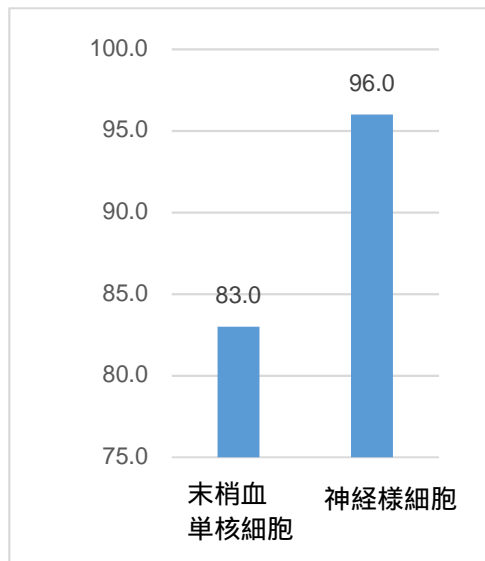
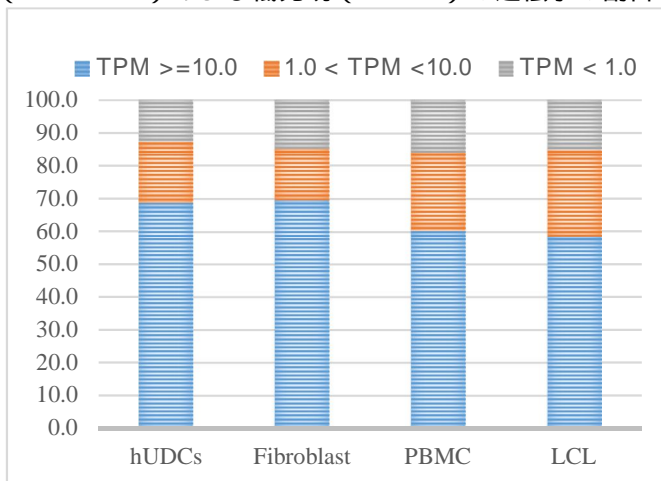


図 2. 髄鞘形成不全の原因遺伝子における TPM > 10 の高発現遺伝子数

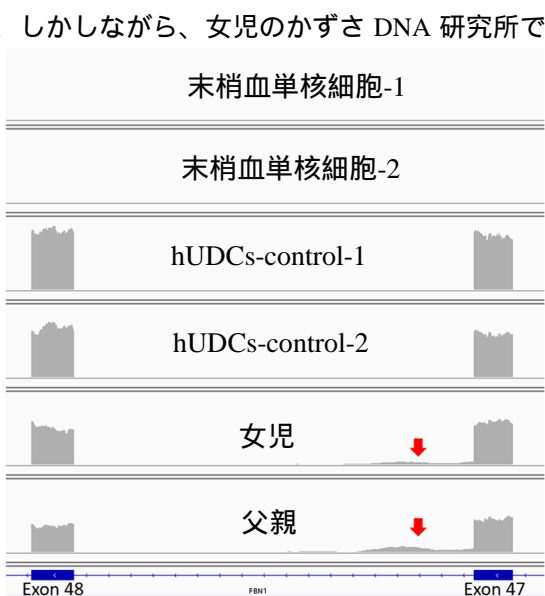
また、公共のデータベースから以下の HPO term ("hypomyelination", "CNS demyelination", "Abnormal CNS myelination", "Delayed myelination") に関連する 247 遺伝子を抽出し、その発現量を TPM を指標に比較した。一般的に TPM 10 以上を高発現、TPM < 1 は低発現と考えられる。図 3 に示すように、hUDCs は 247 遺伝子中、低発現の遺伝子が最も少ない細胞であり、7 割の遺伝子が高発現していた。このことから、hUDCs は遺伝性白質疾患の RNA シークエンス解析に、皮膚線維芽細胞 (Fibroblast) と同等以上に適していることが分かった。更に、hUDCs を用いたマルチオミクス解析によって 1 例において、疾患原因バリエーションの同定に成功した。症例は

図 3. 各細胞における高発現 (TPM > 10)、中発現 (1 < TPM < 10) および低発現 (TPM < 1) の遺伝子の割合



13 歳の女児で、大動脈瘤の手術既往のある父親とともに臨床的に Marfan 症候群と診断された (改訂 Ghent 基準は女児が 9 点で父親が 7 点) のパネル検査、および父親の信州大学遺伝性結合組織疾患パネル検査では異常が認められなかったため、浜松医科大学で全ゲノム解析と hUDCs を用いた RNA シークエンス解析を行った。その結果、Marfan 症候群の原因遺伝子である *FBNI* 遺伝子にイントロンバリエーション (イントロン 47, NM_000138.4:c.5789-15G>A) を認め、RNA シークエンスでは、イントロン 47 にアライメントされるリードを認め (赤矢印) RT-PCR でイントロン保持を確認した (図 4)。

図 4. RNA-seq アライメント (IGV を使用)



更に RNA シークエンスにおいて、ゲノムでは両アレル性のバリエーションを有しているにも関わらず RNA では片アレルが優位に発現している遺伝子を調べたところ、*FBNI* において片アレルが優位に発現していることが分かった。これらの知見から、*FBNI* のイントロンバリエーションによって異常なスプライシング起こり、その異常転写産物が壊されることで片アレル性発現を呈していると結論付けられた (Hiraide et al., *J Hum Genet.* 2021)。

特筆すべき点として、図 4 に示すように

末梢血単核細胞を用いた RNA-seq データでは *FBNI* 遺伝子のリードでデプスは極めて低く、末梢血単核細胞では解析が不可能であった。また、Exon 47 と Exon 49 上に立てたプライマーで逆転写 PCR を行ったところ、イントロン保持のバンドは長いためか増幅されず、仮に RNA-seq をせずに逆転写 PCR のみで評価した場合には、異常トランスクリプトを見逃す可能性も考えられた。転写異常を俯瞰的に調べるためには RNA-seq が極めて有用であり、hUDCs を用いたマルチオミクス解析は、これまでのゴールドスタンダードである皮膚線維芽細胞細胞と発現プロファイルが酷似しており、更に非侵襲的である点で優れてる。マルチオミクス解析におけるパラダイムシフトを起こすことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hiraide Takuya, Shimizu Kenji, Miyamoto Sachiko, Aoto Kazushi, Nakashima Mitsuko, Yamaguchi Tomomi, Koshu Tomoki, Ogata Tsutomu, Saitu Hiroto	4. 巻 -
2. 論文標題 Genome sequencing and RNA sequencing of urinary cells reveal an intronic FBN1 variant causing aberrant splicing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	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/s10038-022-01016-1	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0件

〔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
研究協力者	宮本 祥子 (Miyamoto Sachiko)		
研究協力者	青戸 一司 (Aoto Kazushi)		

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