

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15382

研究課題名（和文）加齢に伴う神経幹細胞の機能低下と認知症発症機序の解明

研究課題名（英文）Age-related neurogenesis decline and onset mechanism of dementia

研究代表者

本田 瑞季（Honda, Mizuki）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50828978

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、加齢に伴う神経幹細胞（NSC）の遺伝子発現制御を解明することを目標とする。そのため、独自開発した組織切片上の光照射領域に限定した遺伝子発現情報を取得できる Photo-Isolation Chemistry（PIC）法を活用する。しかし、PICは未固定切片にしか対応しておらず、未固定では NSC やその他の神経系、また老化マーカーの抗体染色がうまくいかない問題があった。そこで、ホルマリン固定切片でも解析できるよう PIC の技術改良を行った。また、PIC を ATAC-seq や ChIL-seq にも応用し、それぞれオープンクロマチンとヒストン修飾を空間的に解析できる技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PIC を用いることで、従来法では困難だった複雑な脳切片から特定の領域や細胞の遺伝子発現やその制御情報を抽出することが可能である。また、未固定のみならず、ホルマリン固定した凍結切片にも適用可能である。そのため、神経疾患患者の剖検脳の解析にも応用が可能である。したがって、本技術の臨床検体への活用により、神経系疾患の発症や進行メカニズムの理解が深まり、それに基づく新たな治療法や予防法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, our goal is to elucidate the gene expression regulation of neural stem cells (NSCs) associated with aging. To achieve this, we utilize Photo-Isolation Chemistry (PIC), a method we have developed to acquire gene expression information limited to regions of UV irradiation on tissue sections. However, PIC is only compatible with unfixed tissue sections, presenting challenges with staining NSCs, other neural components, and aging markers in unfixed tissue. Therefore, we have improved the PIC technique to enable analysis of formalin-fixed tissue sections. Additionally, we have applied PIC to ATAC-seq and ChIL-seq, establishing techniques to spatially analyze open chromatin and histone modifications, respectively.

研究分野：システム生物学

キーワード：空間オミクス解析 神経幹細胞 RNA-seq エピゲノム ゲノム解析技術

1. 研究開始当初の背景

記憶・学習能力を司る海馬には神経幹細胞が存在し、生涯にわたり新しいニューロンを産生し続ける。このように長期にわたりニューロンを生み出すため成体神経幹細胞のほとんどは静止状態を保って維持され、適切なタイミングで分裂・分化することで記憶・学習に貢献している。しかし、記憶・学習能力は加齢に伴い確実に衰える。これには海馬歯状回の神経幹細胞の減少や神経新生の低下が起因するが、なぜ加齢に伴い神経幹細胞の機能破綻が起こるのか？については未だ不明な点が多い。

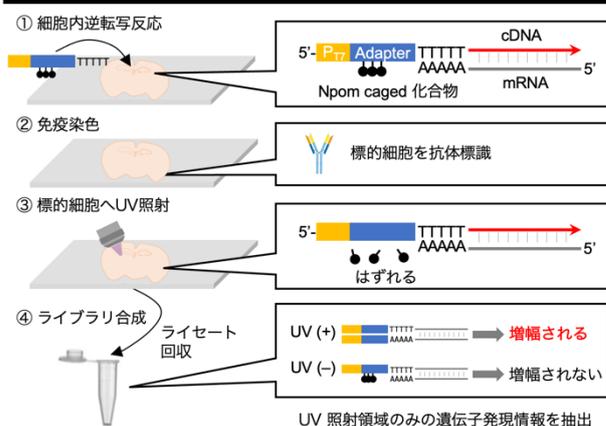
2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴う神経幹細胞 (NSC) の遺伝子発現やその制御メカニズムを詳細に解明し、これによって加齢に伴う神経幹細胞の機能低下や認知症発症の機序を明らかにすることを目標とする。この目的を達成するために、これまでに高分解能の空間トランスクリプトーム法である Photo-Isolation Chemistry (PIC) を独自に開発してきた (Honda et al., *Nat. Commun.* 2021)。この技術の詳細は「3. 研究方法-1」で後述するが、この技術を用いることで、組織切片の関心領域 (ROI) に照射することにより、ROI に限定された高深度のトランスクリプトーム情報を取得できる。しかし、PIC は未固定の新鮮凍結切片にしか対応しておらず、未固定切片では神経幹細胞やその他の神経系抗体、さらには老化マーカーの蛍光標識がうまくいかないという問題があった。そこで、本研究では、あらかじめホルマリン固定した凍結切片でも解析できるように PIC の技術改良を行う。また、PIC の原理を ATAC-seq や ChIL-seq にも応用し、それぞれオープンクロマチン領域とタンパク質-ゲノム相互作用を照射した ROI に限定して高深度に解析できる技術の確立も目指す。さらに、これらの開発技術を若齢および高齢マウス脳の神経幹細胞に適用し、加齢に伴う神経幹細胞の機能低下や認知症発症の機序を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

1. ホルマリン固定した凍結切片における PIC RNA-seq 法の確立

図1. PIC RNA-seq の原理と流れ



PIC RNA-seq は以下の工程からなる(図1)。

①ホルマリン固定や透過処理を施した細胞や組織切片に光開裂性 caged 化合物 (NPOM) を付加したオリゴ DNA を滴下し、組織切片上のすべての細胞内で逆転写反応する (in situ 逆転写反応)。その後、②ROI のマーカー分子に対する抗体で免疫染色し、③ROI に限定した照射を行うことで、cDNA につながるオリゴ DNA から NPOM が脱離する。④その後、切片の全てのライセートをチューブに回収し、常法通りにライブラリ合成を進めると、照射

された ROI に由来する cDNA だけが *in vitro* transcription (IVT) により増幅され、シーケンスされる。また、未固定の新鮮凍結切片に対する前処理として、これまで4%パラホルムアルデヒド (PFA) による固定と5% TritonX および0.1N 塩酸による透過処理を行っていた。しかし、あらかじめPFA固定した凍結切片では、上記の透過処理では細胞内逆転写反応がうまくいかず、PIC RNA-seq 解析ができなかった。そこで、ホルマリン固定凍結切片に対する、前処理条件の検討を実施した。

2. ホルマリン固定した凍結切片における PIC ATAC-seq 法の確立 (図 2a)

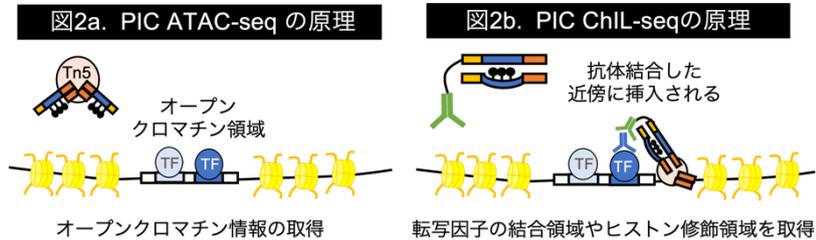
ATAC-seq はオープンクロマチン領域を同定できる技術である。この手法は、オリゴ DNA が Tn5 トランスポゼースによってオープンクロマチン領域に選択的に挿入される性質を利用する。

つまり、Tn5 で挿入されるオリゴ DNA に光開裂型のケージド化合物を挿入することことで、UV 照射依存的なライブラリ合成できる。しかし、核抽出したサンプル（通常の ATAC-seq）に比べ、ホルマリン固定した組織切片や細胞では、Tn5 トランスポゼースのゲノムへの挿入効率が悪く、検出感度に問題があることが判明した。そこで、検出感度を向上した新たな PIC ATAC-seq を開発する。

3. PIC ChIL-seq 法の確立 (図 2b)

ChIL-seq は、1 細胞レベルでのヒストン修飾解析が可能な ChIP-seq に変わる技術である。この手法もまた、ATAC-seq と同様、Tn5 トランスポゼースを用いて、抗

体に連結されたオリゴ DNA (ChIL プロブ) をゲノムに挿入するため、光開裂型のケージド化合物を付加した ChIL-probe を作製した。これを用いて成体マウス脳切片の海馬歯状回におけるヒストン H3K27ac に対する PIC ChIL-seq を行った。また、検出感度の評価のため、NIH3T3 細胞を用いたヒストン H3K27ac に対する PIC ChIL-seq も実施した。



4. 研究成果

1. ホルマリン固定した凍結切片における PIC ATAC-seq 法の確立

ホルマリン固定した組織切片に対し、さまざまな前処理条件を検討し、Tris-EDTA buffer (pH8) による加熱反応を行うことで、固定した凍結切片やパラフィン切片においても、効率よく PIC RNA-seq ライブラリが合成できることを発見した。原理証明実験として、空間オミクスでよくベンチマークテストとして行われている、マウス海馬の CA1、CA3、DG 領域に限定した PIC RNA-seq 解析を実施した(図 3a)。これらのデータのクラスタリング解析より、未固定凍結切片と同様、ホルマリン固定した凍結切片においても、領域ごとに分離できていることが確認できた (図 3b)。また、領域特異的なマーカー遺伝子の検出にも成功した(図 3c)。以上の結果より、ホルマリン固定した切片においても解析可能であることが示された。また、神経幹細胞、ニューロン、アストロサイト、ミクログリアと脳内の各種細胞タイプに限定した PIC RNA-seq を実施し、DEG 解析を行なったところ、各種細胞タイプ特異的な遺伝子を検出することに成功した (Honda et al., STAR protoc. 2022)。

(a) UV 照射領域 [成体マウス海馬領域, CA1, CA3, DG]

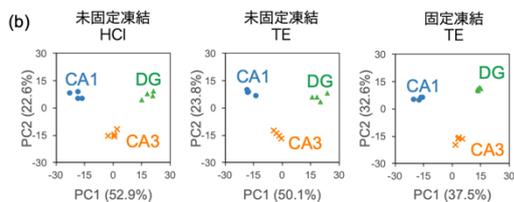
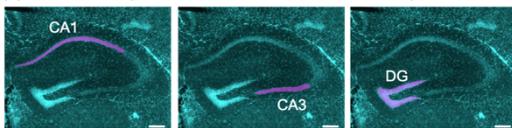


図3. PIC RNA-seq : 成体マウス海馬領域

(c)

実験条件ごとの発現変動遺伝子(DEG) (-Log₁₀P)

比較	固定	切片タイプ	DEG ROI 前処理	Wfs1	Ociad2	Prox1
				CA1	CA1+CA3	DG
CA1 vs CA3	なし	凍結	HCl	9.3	1.1	2.6
	あり	凍結	TE	23.1	1.6	1.6
CA1 vs DG	なし	凍結	HCl	4.7	4.8	28.4
	あり	凍結	TE	21.4	7.7	65.6
CA3 vs DG	なし	凍結	HCl	2.4	8.2	21.2
	あり	凍結	TE	1.0	1.1	13.6
					5.6	46.8
				1.6		19.9

2. ホルマリン固定した凍結切片における PIC ATAC-seq 法の確立

PIC ATAC-seq の検出力を向上させるため、オリゴ DNA に T7 プロモーターを付加し、IVT によりライブラリ増幅する実験系を確立した (図 4a)。これによりホルマリン固定や透過処理を施した組織切片においてもライブラリ量を数百倍に増幅することが可能となり、少数細胞からでも十分なシーケンスライブラリを得ることに成功した (図 4b)。また、成体マウスの肝臓切片における PIC ATAC-seq から、固定濃度や固定の有無にかかわらず、未固定と同様のオープンクロマチン情報を得ることができた(図 4c ; 青, オレンジ, 緑)。さらに、本研究提案で対象とする脳

切片においても UV 照射依存的な ATAC-seq ライブラリが合成できることを確認した (図 4d)。

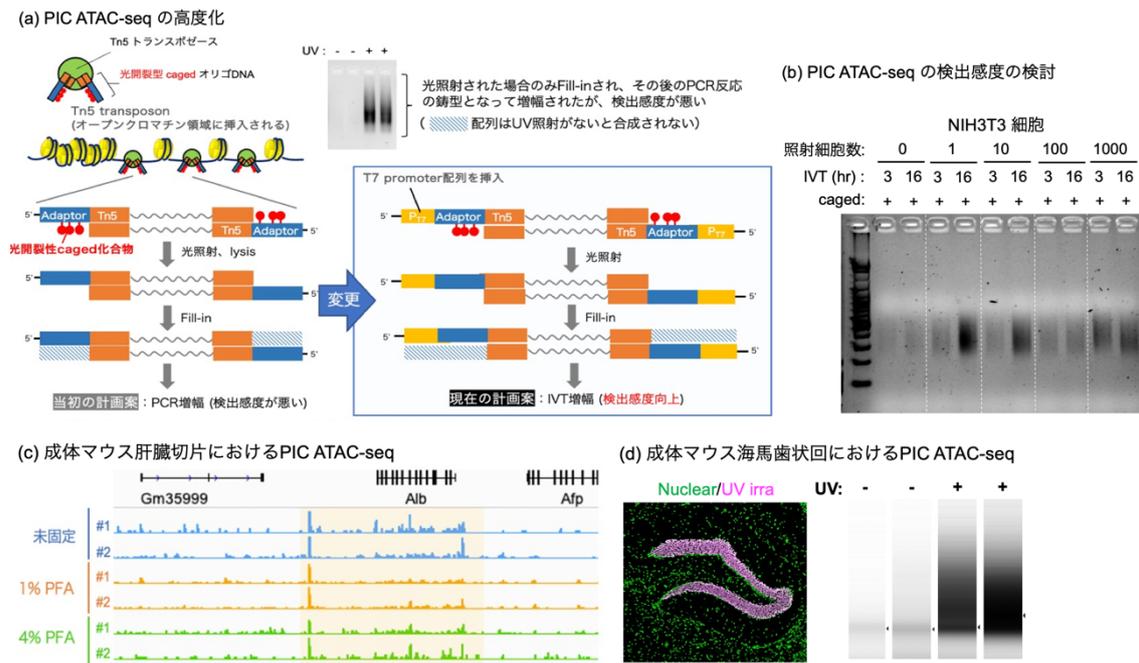
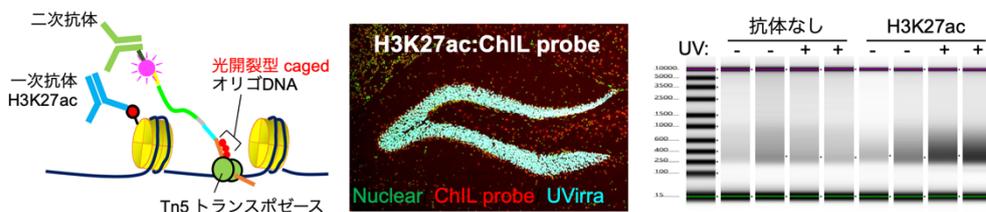


図4.ホルマリン固定した凍結切片における PIC ATAC-seq 法の確立

3. PIC ChIL-seq 法の確立

H3K27ac 抗体で一次抗体反応した成体マウス脳切片に対し、光開裂性 caged 化合物(Npom) を付加した ChIL probe を用いて二次抗体反応を行った後、海馬の歯状回に光照射し、ライブラリ合成を行った。その結果、UV 照射依存的なライブラリが合成できることを確認した (図 5a)。また、PIC ChIL-seq の検出感度を評価するため、H3K27ac 抗体で一次抗体反応した 1000 個の NIH3T3 細胞に対し、PIC ChIL probe を用いて二次抗体反応を行った。その後、1、10、100、1000 と細胞数を振って光照射し、ライブラリ合成を行なったところシングルセルからもライブラリ合成ができることを確認した。また、これらのライブラリを用い NGS 解析したところ、シングルセル照射においても、オリジナル ChIL-seq で得られる peak と同様の領域に H3K27ac の peak を検出することに成功した (図 5b)。今後は、これらの技術を若齢および高齢マウス脳の神経幹細胞に適用し、加齢に伴う神経幹細胞の機能低下や認知症発症の機序を明らかにしていく予定である。

(a) 成体マウス海馬歯状回に対する H3K27ac 抗体を用いた PIC ChIL-seq



(b) 検出感度の検討: NIH3T3 細胞に対する H3K27ac 抗体を用いた PIC ChIL-seq

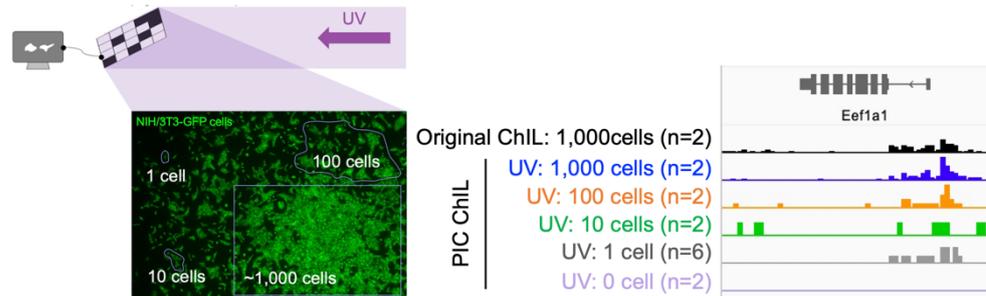


図5. PIC ChIL-seq 法の確立

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 1件）

1. 著者名 Mizuki Honda, Ryuichi Kimura, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Kaori Tanaka, Yasuyuki Ohkawa, Shinya Oki	4. 巻 3
2. 論文標題 Photo-isolation chemistry for high-resolution and deep spatial transcriptome with mouse tissue sections	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101346-101346
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2022.101346.	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 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 18件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた高深度空間トランスクリプトーム技術
3. 学会等名 広島大学 統合生命科学研究科セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 光の魔法：光で分子情報をPICK UP
3. 学会等名 Scienc-ome（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた 高深度空間トランスクリプトミクス
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mizuki Honda
2. 発表標題 High-resolution and deep Spatial transcriptomics based on microstructure
3. 学会等名 IRCMS Symposium in Kumamoto (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた高深度空間トランスクリプトミクス
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた高解像度かつ 高深度空間トランスクリプトーム技術
3. 学会等名 第6回 医薬品毒性機序研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 Photo-Isolation Chemistryを活用した組織内遺伝子発現の空間的定量解析
3. 学会等名 定量生物学の会 第11回年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 高深度空間レギュロミクスとその技術応用
3. 学会等名 第1回 多細胞休止を研究する会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた 高深度空間レギュロミクス
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた高深度空間トランスクリプトーム
3. 学会等名 広島大学 統合生命科学研究科セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 光の魔法：光で分子情報をPICK UP
3. 学会等名 Scienc-ome（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた 高深度空間トランスクリプトミクス
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2023年大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mizuki Honda
2. 発表標題 High-resolution and deep Spatial transcriptomics based on microstructure
3. 学会等名 IRCMS Symposium in Kumamoto (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた高深度空間トランスクリプトミクス
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた高解像度かつ 高深度空間トランスクリプトーム技術
3. 学会等名 第6回 医薬品毒性機序研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 Photo-Isolation Chemistryを活用した組織内遺伝子発現の空間的定量解析
3. 学会等名 定量生物学の会 第11回年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 高深度空間レギュロミクスとその技術応用
3. 学会等名 第1回 多細胞休止を研究する会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた 高深度空間レギュロミクス
3. 学会等名 日本薬学会第144年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 光単離化学（PIC）による 高解像度かつ高深度トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田 瑞季, 木村 龍一, 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かおり, 大川 恭行, 沖 真弥
2. 発表標題 Photo-Isolation Chemistry による高解像度かつ高深度空間トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 NGS EXP02022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田 瑞季, 木村 龍一, 原田 哲仁, 前原 一満, 田中 かおり, 大川 恭行, 沖 真弥
2. 発表標題 Photo-Isolation Chemistryによる高解像度かつ高深度空間トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本田 瑞季
2. 発表標題 ミクロ組織を踏まえた空間的トランスクリプトーム
3. 学会等名 第39回日本毒性病理学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 本田 瑞季, 沖 真弥	4. 発行年 2022年
2. 出版社 生物工学会誌 第100巻	5. 総ページ数 3
3. 書名 空間トランスクリプトミクス	

1. 著者名 本田 瑞季, 沖 真弥	4. 発行年 2023年
2. 出版社 月刊細胞	5. 総ページ数 4
3. 書名 空間トランスクリプトーム技術	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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