

平成 31 年 4 月 26 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 443

氏 名 高橋 遼 郎

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： メリーランド州ボルチモア （国名： アメリカ合衆国 ）

2. 研究課題名（和文）

死後脳を用いた、統合失調症発症に相関する一塩基多型と DRD2 遺伝子発現の関連解明

3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Lieber Institute for Brain Development, Johns Hopkins University

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

5. 所期の目的の遂行状況及び成果 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入のもの也可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

本研究の目的は統合失調症の発症リスクに相関する一塩基多型の意義を、ヒト死後脳のデータを元に解明し、統合失調症の病態解明や死後診断へ応用することである。

1. 統合失調症発症に相関する一塩基多型と DRD2 遺伝子発現の関連

第一の検索対象として、統合失調症の病態に関与が指摘され抗精神病薬の標的でもあるドパミン D2 受容体 (DRD2) 遺伝子の発現と、DRD2 遺伝子の上流約 47kb に位置し統合失調症の発症リスクと強く相関する一塩基多型である rs2514218 ($p=2.75 \times 10^{-11}$ 、アليل頻度約 19%) との関連に焦点を当てた。疾病や薬物の影響のない成人のコントロール死後脳 200 例以上を用いて、前頭前皮質、海馬、尾状核などの諸部位から RNA を抽出し、RNA-seq 法により DRD2 遺伝子の発現量を測定した。その結果、いずれの部位においても上記一塩基多型と DRD2 遺伝子の発現量に相関を認めることが出来なかった。

これは意外な結果であったが、対象とした死後脳サンプル数や解析技術は十分であり統計学的な力不足は考え難いことを考慮すると、考えられる仮説として、①一塩基多型は発達段階での特定の時期のみ (例えば子宮内や出生直後) でのみ DRD2 遺伝子発現量に影響を与える、②DRD2 遺伝子の発現調節は各細胞種間で異なっており、一塩基多型は一部の細胞種のみに影響を与える、あるいは細胞種間で背反的に発現量の増減が生じる、③一塩基多型は DRD2 遺伝子の全転写産物の発現量に影響を及ぼすのではなく、特定のスプライシングバリエーションの発現やその割合に影響を与える、などが考えられた。①に関しては十分なサンプル数の検討を行うことが現時点では困難であるため、②および③の仮説を検証することとした。

2. 凍結死後脳からの、単細胞および同一細胞集団を対象とした遺伝子発現解析

上記②に関連して、DRD2 遺伝子発現調節は細胞種間で異なっているとすると、死後脳からの解析には、多種の細胞種を含む混合組織からの RNA 抽出ではなく、各細胞種ごとに分類された細胞集団からの解析が必要と思われた (これまでの方法では 50g 程度のブロック状の凍結死後脳から RNA を抽出していた)。凍結死後脳からの単細胞の分離は技術的に確立していないが、核抽出は可能であるため、代替法として、凍結死後脳から核を分離し核内の遺伝子発現について解析を行うこととした。つまり、凍結死後脳から細胞核を分離・抽出し、単核内の RNA 発現形態の特徴から細胞核を神経由来・支持細胞由来などに分類し、さらに興奮性ニューロン由来・抑制性ニューロン由来などに再分類した後、収集された核集団から RNA を抽出し、一塩基多型と遺伝子発現量の関連を調べることにした。

単核内の RNA 発現形態の特徴から細胞核を分類する方法として、PrimeFlow™ RNA Assay Technology を用いることにした。この方法においては、細胞種マーカーとなる核内の特定の RNA、例えば抑制性ニューロンにおいて特異的に発現する GAD1 遺伝子や興奮性ニューロンで発現する SLC17A7 (GLUT1) 遺伝子を、ISH 法に類似した方法により蛍光標識し、その蛍光強度を元に、セルソーターを用いて核を由来する細胞種ごとに分類した。図 1 に PrimeFlow™ RNA Assay Technology を用いたセルソーターによる凍結死後脳からの核分類の様子を示している。本解析により、興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、ミクログリアなどに由来する核を凍結死後脳から抽出・分離することに成功した。次なる検討事項として、各分類後の核内 RNA の品質が、続く RNA-seq 法あるいは RT-PCR 法に耐えうるものであるかを検討する必要がある。またこの方法の制限として核外に存在する RNA 情報が欠落するため、あらかじめ培養細胞などを用いて核内・核外の RNA の分布について理解しておく必要がある。

一方、この方法の応用として、死後脳からの単細胞エピジェネティクス解析が考えられる。核の抽出・分離の過程において核内のクロマチン構造はほぼ損なわれないことが推定されるため、ヒストン修飾や DNA メチル化解析などを視野に入れている。さらに、近年神経細胞の DNA 配列における de novo 突然変異や遺伝的モザイクの存在が精神疾患の発症に関与しているという報告がある。これらに関しても、凍結死後脳からの単核分類による解析法が有効と考えられ、現在、抽出分離後の核について全ゲノム増幅を行い、その有効性を検討している。

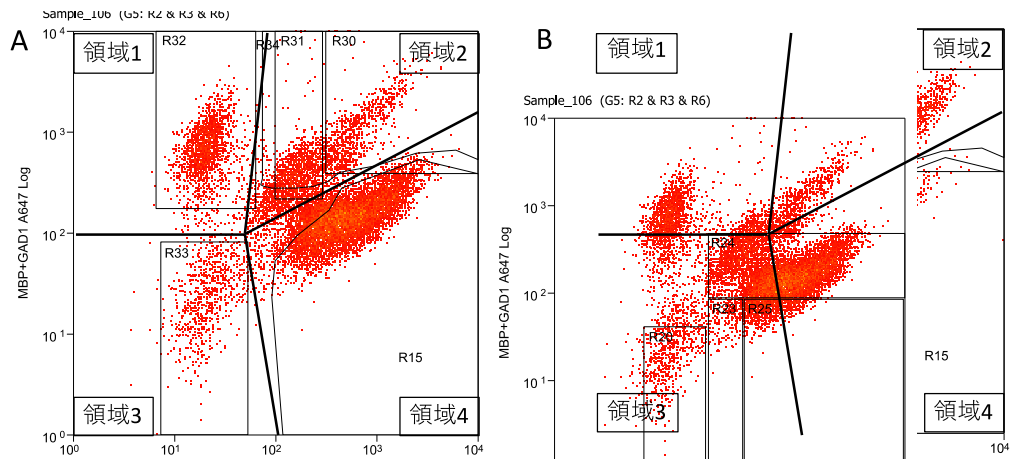


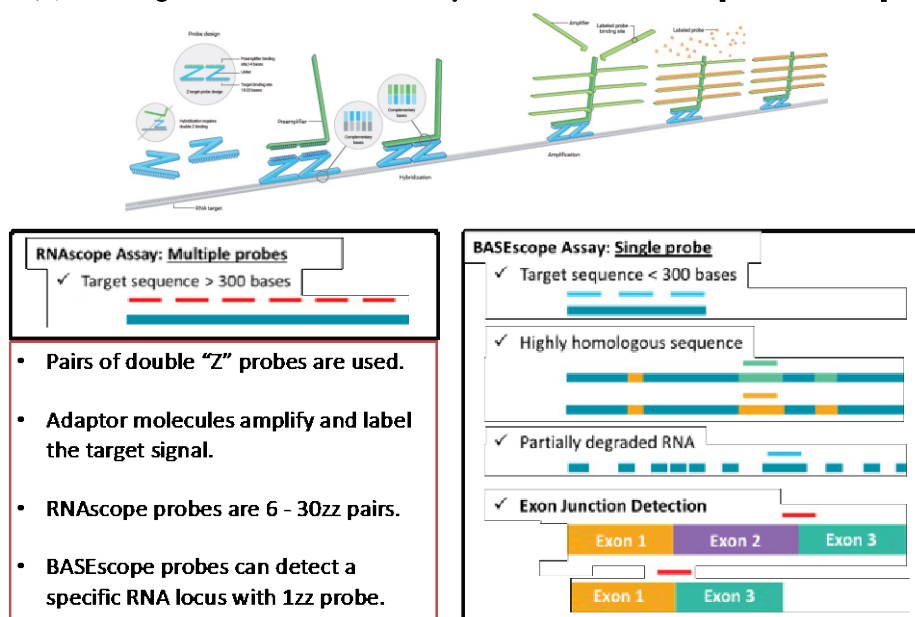
図1. セルソーターを用いた凍結死後脳からの核分類。A) X軸は SNAP25、Y軸は MBP 及び GAD1 の蛍光強度を示す。領域1：ミクログリア、領域2：抑制性ニューロン、領域3：その他のグリア細胞、領域4：その他の神経細胞（興奮性ニューロン）。B) X軸は SNAP25、Y軸は MBP 及び SLC17A7 の蛍光強度を示す。領域1：某突起細胞、領域2：興奮性ニューロン、領域3：その他のグリア細胞、領域4：その他の神経細胞（抑制性ニューロン）。

3. 凍結死後脳からの、スプライシングバリエントを対象とした遺伝子発現解析

上記③に関連して、一塩基多型は DRD2 遺伝子の全転写産物の発現量に影響を及ぼすのではなく、特定のスプライシングバリエントの発現やその割合に影響を与えるとする、既存の RNA-seq 法による全転写産物の定量ではなく、種々のスプライシングバリエントを対象とした限定的な転写産物の解析が必要となった。既存の RNA-seq 法ではその遺伝子増幅の仕組みから 5' 端に偏った領域の解析が行われるため、スプライシングバリエントの検索に使用することは可能であっても正確な定量解析が困難である。一方、特定のエクソンジャンクションを標識した RT-PCR は特定のスプライシングバリエントのみの定量が可能であるが、上述の通り多様な細胞腫の混合資料からの解析では結果は限定的である。そこで、これらを解決するためにスライドガラス状に添付した凍結死後脳スライスからの in situ hybridization (ISH) 法による、特定転写産物の定量解析を行うこととした。

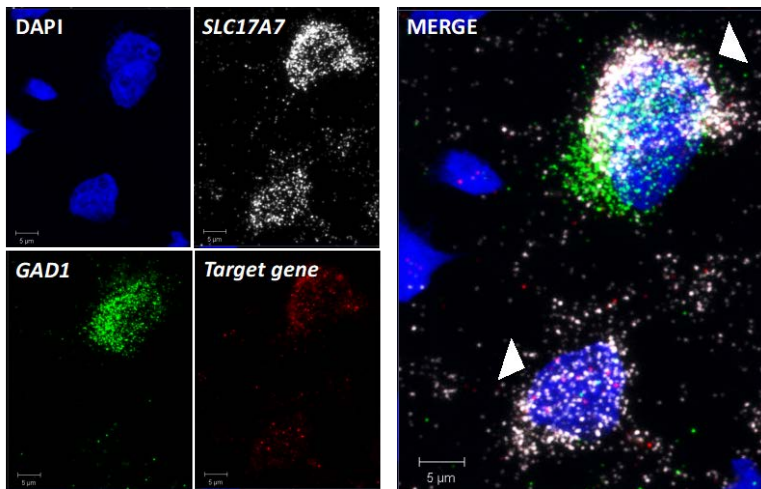
我々の過去の研究により、死後脳の前頭前皮質において、AS3MT 遺伝子及び SNX19 遺伝子の上流にある統合失調症の発症リスクに相関する一塩基多型が同遺伝子のスプライシングバリエントの発現量に影響を与えることが示されている。これを背景に、これらの遺伝子を対象として、死後脳からのスプライシングバリエントの ISH 法について有効性を検討した。概要を以下に記す。

図1. Single molecule in situ hybridization: RNAscope & BASEscope



3-1. 方法

AS3MT 遺伝子及び SNX19 遺伝子を対象としたそれぞれの研究において、統合失調症発症リスクに相関する一塩基多型を持つ個人 3 人（リスク群）及び持たない個人 3 人（非リスク群）に由来する死後脳を解析に用いた。各死後脳の前頭前皮質外側背野(dorsolateral prefrontal cortex: DLPFC)に対して、単一分子を標的とした高感度 RNA ISH 法により、AS3MT 遺伝子及び SNX19 遺伝子の発現量を、各細胞に対するマーカーRNA の発現の有無とともに、単一細胞レベルで計測した（図 1、図 2）。これらの計測は、プ



ローブに由来する蛍光シグナルの数を、新規のコンピュータプログラムを用いて解析するものであり、バイアスの加わる余地が少なく高い再現性を持っている。さらに、超高感度 RNA ISH 法により、特定のスプライシングバリエーションを対象として同様の実験を行った。

図 2. Localization of target gene with cell type markers using RNAscope in postmortem human DLPFC

3-2. 結果

- 定量的・定性的計測の背景として、リスク群と非リスク群との間で、各細胞腫（興奮性神経細胞・抑制性神経細胞・星状膠細胞・その他の細胞）の数及びその比率を計測した。現在、コンピュータプログラムの改良を加えた最終結果を集計中である。
- AS3MT 遺伝子及び SNX19 遺伝子の発現量を単一細胞レベルで計測した。現在、コンピュータプログラムの改良を加えた最終結果を集計中である。また、リスク群と非リスク群との間での発現量の際について統計学的な検討を加えている。
- AS3MT 遺伝子及び SNX19 遺伝子について、統合失調症発症リスクと最も相関するスプライシングバリエーション及びそれ以外の主要なスプライシングバリエーションを対象として、上記 b. と同様な計測を行った。手動計測の中間結果として、AS3MT 遺伝子と SNX19 遺伝子の双方において、①リスクと相関するスプライシングバリエーションとそれ以外の主要なスプライシングバリエーションの発現分布に、統計学的な有意差を指摘できなかったが、リスクと相関するスプライシングバリエーションの方が、細胞取得的な発現が少なく、普遍的に発現する傾向が認められた。また②AS3MT 遺伝子及び SNX19 遺伝子の発現分布には顕著な差がみられ、AS3MT 遺伝子はグリア細胞よりも神経細胞において高度に発現し、特に抑制性神経細胞において高度に発現していた一方、②SNX19 遺伝子も同様にグリア細胞よりも神経細胞において高度に発現していたが、興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の間で発現量の分布に有意な差を指摘し得なかった。

4. まとめ

高感度 RNA ISH 法により、統合失調症発症リスクに相関するスプライシングバリエーションの発現分布について一細胞レベルでの解析を行うことが出来た。また、統合失調症発症リスクに相関する一塩基多型の有無による発現分布変化について現在解析の最終段階に達しており、当初の目的であった統合失調症発症リスクに相関する一塩基多型の意義についても新規の知見が得られることが期待される。これらの成果について国際学会において発表を予定しており、また学術雑誌へ投稿するための論文も作成中である。また、今回用いた手法についての解説を中心に、2018 年の学術会議で既に発表を行っている（下記）。

Maynard KR, Takahashi Y, Tippianni M, Jaffe AE, Weinberger DR, Hyde TM, Martinowich K. In Situ Visualization and Quantification of Transcripts Associated With Risk for Psychiatric Disease in Postmortem Human Brain Tissue. 57th Annual Meeting of American College of Neuropsychopharmacology (ACNP), USA, 2018.12.11.