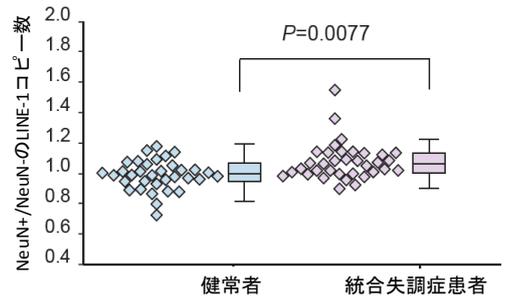


精神疾患患者ゲノムにおける L1 新規挿入部位の決定

熊本大学大学院・生命科学研究部・分子脳科学分野
文東 美紀

1. はじめに

統合失調症は一般人口における罹患率が1%ほどと比較的高く、社会・経済的損失も大きい重篤な疾患である。発症には遺伝要因が関与することが予測されているが、これまでの末梢血や唾液由来DNAを使用して行われてきた精神疾患のゲノムワイド関連解析では、オッズ比が1.1-1.2ほどの効果量の小さな因子の同定にとどまっている。一方、近年のゲノム研究では、同一個人のゲノムも細胞によって様々な種類の体細胞変異を含み、それらが疾患に関与する可能性が報告されている。我々も統合失調症患者の神経細胞で、レトロトランスポゾン的一种であるLINE-1のコピー数が増幅していることを報告した (Bundo et al., 2014) (図1)。しかし脳は様々な細胞種が混在する組織であるため、細胞種を分画して解析を行う必要がある。これまで我々は凍結脳試料から神経細胞マーカーを利用し神経細胞核と非神経細胞核を高精度に分画する技術を確認してきた。本研究ではこの技術を発展させ、神経細胞核画分から特定の神経細胞、非神経細胞画分からマイクログリアなど、さらに多くの細胞種に分画することを目指した。最終的に、分画した単一脳由来細胞核からレトロトランスポゾンLINE-1の新規挿入を検出する手法を開発することを目的とした。



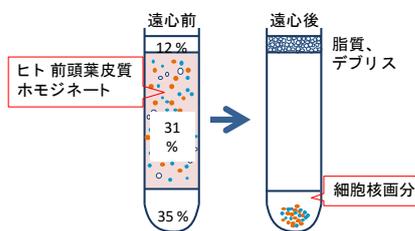
<図1>

2. 方法

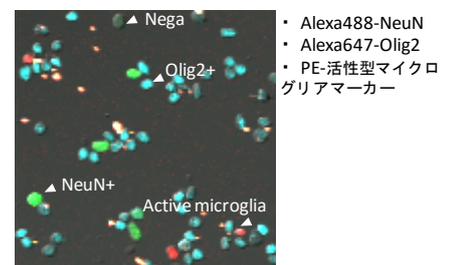
<2-1> 死後脳からの細胞核の単離

はじめに、ヒト健常者前頭葉組織を使用して、さまざまな脳細胞から細胞核を分画する技術の確立を行った。これまで我々は、ヒト死後脳から神経細胞核調整法(Iwamoto, Bundo et al., 2011, Bundo et al., 2015, 2016)を確立している。本手法では、凍結組織片からパーコール密度勾配法を使用して粗細胞核画分を調整したのち、神経細胞核に特異的に発現しているNeuNに対する蛍光標識済み抗体を用いて、神経細胞核を蛍光標識し、セルソーターを用いて神経・非神経細胞核の分画を行う。近年、我々はオリゴデンドロサイト核に特異的に発現している転写因子Olig2に対する抗体を使用し、非神経細胞核画分からオリゴデンドロサイト核を分画することに成功している。本研究ではさらに、非神経細胞核画分よりマイクログリア、神経細胞核画分より興奮性ニューロンの細胞核の単離を試みた (図2)。

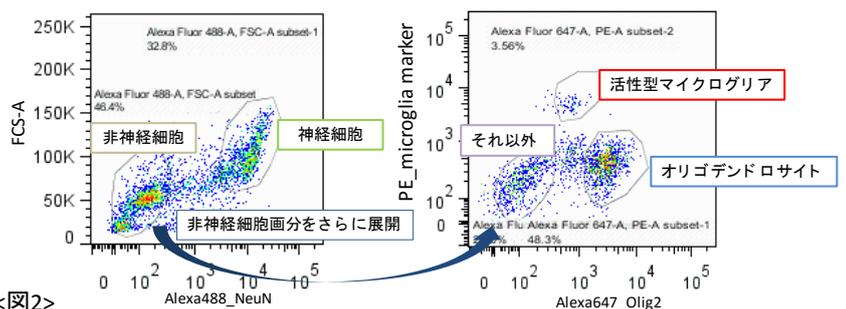
1. Percoll密度勾配遠心法による細胞核画分の精製



2. 核画分の抗体染色



3. セルソーターによる分画

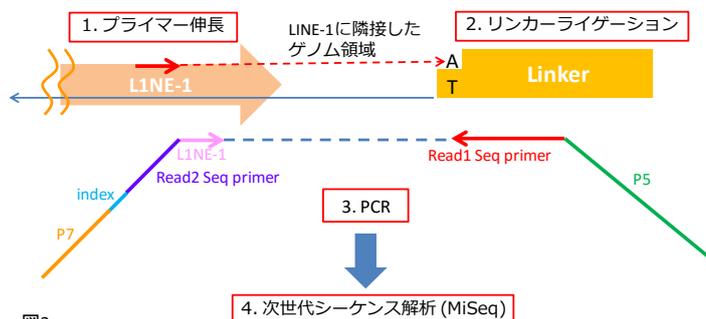


<図2>

<2-2> LIHs-seqによる新規LINE-1挿入部位の検出法の確立

上記の方法を使用して、精神・神経疾患のない93歳日本人女性の前頭葉皮質組織から、神経細胞核画分の調整を行い、分画した単一神経細胞からフリーダムのC1システムを使用して、全ゲノム増幅を行った。

神経細胞バルクDNAと、単一細胞核から全ゲノム増幅を行ったDNA (n=3)を使用し、



<図3>

ヒトに特異的なLINE-1配列 (L1Hs)だけをPCRで濃縮する手法であるL1Hs-PCRを行った。この手法では、L1Hsの3' UTRに特異的なプライマーからプライマー伸長を行い、アダプターをライゲーションしたのち、L1Hsの3' UTRに特異的なプライマーとアダプター配列に対するプライマーを用いてPCRを行うことにより、L1Hsの3'側に隣接する配列を濃縮することができる。このPCR産物を次世代シーケンサー(イルミナ社MiSeq)で解析することにより、L1Hsの挿入部位の検出を行った(図3)。単一細胞核でL1Hsの新規挿入が認められたゲノム領域については、PCRとサンガーシーケンス法で確認を行った。

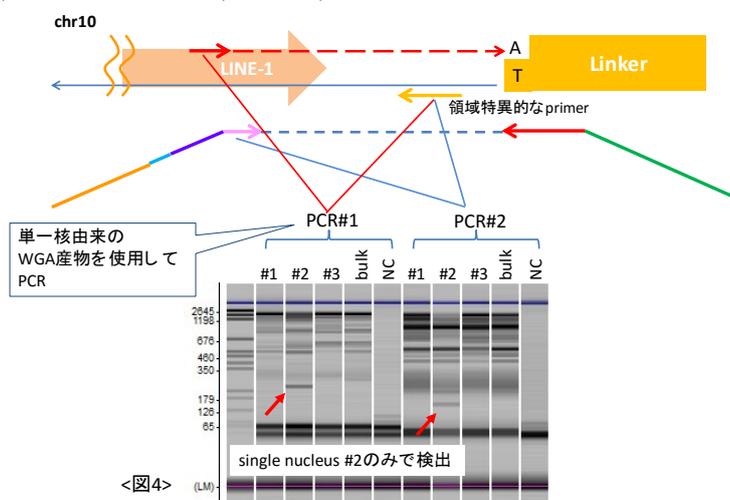
3. 結果

<3-1> 死後脳からの細胞核の単離

ヒト健常者前頭葉組織を使用して細胞核画分を調整し、さまざまな細胞種由来の細胞核の画分を試みた。これまで画分に成功していた神経細胞・非神経細胞・オリゴデンドロサイトに加え、活性型マイクログリア・興奮性ニューロンの細胞核に存在するマーカーに対する抗体を使用して、非神経細胞核画分から活性型マイクログリア細胞核の画分、神経細胞核画分から興奮性ニューロンの細胞核の画分に成功した(図2)。

<3-2> L1Hs-seqによる新規LINE-1挿入部位の検出法の確立

死後脳から画分した神経細胞のバルクDNAおよび、単一神経細胞核から全ゲノム増幅したDNA (n=3)を使用してL1Hs-seqを行った。MiSeqで得られたデータ(1サンプルあたり、およそ20万リード)から解析を行ったところ、ヒトリファレンスゲノム (hg38)に存在するL1Hs (859ヶ所)のうち、神経細胞バルクDNAからは781ヶ所(感度91.4%)、単一細胞核由来DNAからは677-749ヶ所(感度78.8-87.2%)のL1Hsが検出され、高い検出感度を示した。さらに、hg38に存在せず、これまでにL1挿入部位として報告のない新規挿入L1Hsは、神経細胞バルクDNAから31ヶ所、単一細胞核由来DNAからは52-106ヶ所検出された。単一細胞核のみで新規挿入が認められた部位に対して、PCRによるvalidationを行った(図4)。L1Hsの3'側に位置するprimerと、L1Hs-seqで検出された領域特異的primerを使用してPCRを行ったところ、1つの単一細胞核由来DNAのみでバンドが検出された。このPCR産物のサンガーシーケンシングを行ったところ、新規挿入L1Hsと隣接ゲノム領域のジャンクション部位を決定することが可能であった。



4. まとめ

これまでに行われてきたヒト死後脳を用いたゲノム研究の多くは、バルクDNAを使用したものか、神経細胞・非神経細胞の2つの画分からのDNAを使用したものがほとんどであった。本研究により、ヒト死後脳の神経細胞から、興奮性ニューロン・その他のニューロン、非神経細胞からオリゴデンドロサイト・活性型マイクログリア・その他の非神経細胞の細胞核を単離することが可能になった。これにより、これらの細胞種ごとにゲノム・エピゲノム解析を行うことが可能になり、今後の解析が期待される。

また本研究では、単一細胞核から全ゲノム増幅を行い、LINE-1周辺配列を濃縮する方法を確立した。健常者を使用した解析により、シングルセルレベルで50-100ヶ所程度のLINE-1の新規挿入が起きていることを示した。これらの新規挿入は、細胞ごとに異なった部位で起きているため、脳由来細胞の機能や形態を細胞ごとに変化を起こしている可能性がある。今後は精神疾患患者死後脳で同様の解析を行い、疾患特異的にLINE-1が挿入されている領域を同定し、病因との因果関係を検討していきたい。

5. 参考文献

1. Bundo M et al., Increased L1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron* 2014,81:306-313.
2. Iwamoto K, Bundo M et al., Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Res* 2011,21:688-696.
3. Bundo M, Kato T, Iwamoto K. Estimation of LINE-1 Copy Number in the Brain Tissue and Isolated Neuronal Nuclei. In: Frade J., Gage F. (eds) *Genomic Mosaicism in Neurons and Other Cell Types. Neuromethods*, 2017 vol 131. Humana Press, New York, NY
4. Bundo M, Kato T, Iwamoto K. Cell Type-Specific DNA Methylation Analysis in Neurons and Glia. In: Karpova N. (eds) *Epigenetic Methods in Neuroscience Research. Neuromethods*, 2016 vol 105. Humana Press, New York, NY