

統合失調症患者死後脳のさまざまな細胞種画分からのシングルセル遺伝子発現解析

文東美紀

熊本大学大学院 生命科学研究部 分子脳科学講座

【研究の背景】

これまで、精神疾患患者死後脳を使用した遺伝子発現解析などのオミックス解析に関する報告が多く行われているが、これらの研究は、脳を構成する細胞種の複雑性を考慮せず、バルク脳組織を用いて行われたものであり、どの細胞種の発現変動が疾患の病態により深く関わるかを推定することは困難であった。我々はその問題を解消するために、死後脳組織からさまざまな細胞種由来の細胞核を、セルソーターを用いて分画する技術の開発を行ってきており、これまでに神経細胞・非神経細胞ごとに特有の DNA メチル化状態や、レトロトランスポゾンのゲノムへの新規挿入、体細胞変異解析などのデータを発表してきた。近年では、死後脳から単離された細胞核を使用して、シングルセルレベルで RNA-seq を行ったのち、in silico によるデータ解析により細胞種を分画し発現解析を行う技術が急速に発展してきている。しかし、統合失調症患者死後脳に応用した報告は、中脳部位を使用した例など、ごく少数に限られている。また、バルク脳からのシングルセル解析では、使用する脳試料に多く含まれる細胞種の解析が中心となり、特定の細胞種についての解析の解像度が不十分になる欠点がある。

【目 的】

本研究では、我々が確立した技術により、死後脳から複数の細胞種由来の細胞核を分画し、充分量の均質な細胞集団を担保したのち、シングルセル遺伝子発現解析を行う。細胞種ごとに充分な解像度での解析を行うことで、新たな遺伝子発現変化や病的な性質を示すサブ細胞種を同定することを目的とする。

【方 法】

統合失調症患者・健常者 (n=10 ずつ) の死後脳前頭葉組織から生化学的に細胞核画分を調製し、特定の細胞種の細胞核に特異的に発現しているマーカータンパク質に対する抗体染色を行ったのち、神経細胞、オリゴデンドロサイト、活性型マイクログリア、アストロサイト、その他のグリア細胞由来の細胞核をセルソーターで分画した。まず、細胞種のベースとなる発現量を知るために、それぞれの細胞種およびバルク核画分から、100 個ずつの細胞核を使用して、RamDA-seq 法でライブラリ作成を行い、Illumina 社の Nova-Seq6000 を使用してトランスクリプトームデータを取得した。

【結 果】

Seurat ツールを使用してデータの正規化を行い、すべてのデータを使用して UMAP によるクラスタ解析を行ったところ、各細胞群は明確に 5 群のクラスタに分画されたため、細胞の分画実験が適切に行われていることが示唆された。それぞれの細胞群で患者-健常者で発現の変化を示す遺伝子の同定を行ったのち、検出された遺伝子についてパスウェイ解析を行った。その結果、神経細胞画分において、複数の neurotransmitter release cycle、RAB regulation of trafficking、またマイクログリア画分において influenza infection、innate immune system といった reactome に、患者-健常者で発現差がある遺伝子の蓄積が検出された。他の細胞種では、パスウェイ解析で有意な reactome の検出はされなかった。

【考 察】

細胞種ごとに分画したトランスクリプトーム解析の結果、統合失調症患者の神経細胞では神経伝達物質の放出や小胞の輸送、またマイクログリアではウイルス感染や自然免疫系に関与する遺伝子に発現差が見られた。これらは先行研究の結果ともよく一致するものである。特に神経細胞画分では精神遅滞や知的能力障害といった疾患に関与する遺伝子についても発現差を認めているため、これらの遺伝子発現異常が統合失調症の病因となりうる可能性が考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では、統合失調症患者死後脳から、現行の方法より詳細な細胞種ごとの発現変動を検出することが可能であり、疾患の分子病態についてより深く所見を得られると考えられる。今後行う予定の細胞種ごとのシングルセルトランスクリプトーム解析により、精度の高い診断へつながるバイオマーカーの創出や、新たな候補分子をターゲットとする創薬への端緒が得られることが期待される。