

特集 2 精神神経疾患における体細胞変異研究の最前線**3. 統合失調症患者死後脳を用いたシングルセルレベルでの LINE-1 挿入部位の解析**

文東 美紀*, 岩本 和也*

抄録: 体細胞変異は、受精後の発生段階の途中で生じ、個体中にモザイク状に存在するゲノム変異を指し、生じる時期によっては脳組織に特異的な変異となる。またこのような脳特異的な変異の一部には、神経疾患の原因になるものも報告されている。筆者らは体細胞変異の中でもレトロトランスポゾン的一种である long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) 挿入に着目しており、これまでに統合失調症患者の神経細胞において LINE-1 コピー数が増大していること、LINE-1 が新規挿入された部位は神経機能に関与する遺伝子の近傍に多いことを示してきた。このような LINE-1 挿入ゲノム部位プロファイルをより詳細に決定するため、筆者らは新たなシングルセルレベルでの解析法である NECO-seq 法を確立し、統合失調症患者死後脳を使用してケース・コントロール解析を行った。合計 1,000 個以上の神経細胞核の解析の結果、患者群において神経発生の比較的初期で生じたと考えられる LINE-1 挿入は、神経関連遺伝子の近傍に蓄積されていることが示された。LINE-1 挿入が生じた遺伝子には神経伝達物質受容体などが含まれており、このような LINE-1 挿入は、神経細胞の形態や機能に多大な影響を与えたと考えられた。

日本生物学的精神医学会誌 34 (4) : 161-164, 2023

Key words : somatic mutation, LINE-1, postmortem brain, single-cell analysis**1. 疾患と体細胞変異**

統合失調症は妄想や幻覚などを主訴とする、重篤な症状を示す精神疾患の一つである。その病因の多くは未だ明らかになっていないが、患者家系を対象とした疫学研究により、発症には遺伝要因が大きく関与することが示唆されている。そのため、これまでに数万人を対象とした大規模な全ゲノム関連解析などの遺伝研究が行われており、発症に関与すると考えられる多くのゲノム領域が同定されている。しかしそれらの発症に対するオッズ比は最大でも 1.2 程度と低い¹⁰⁾ ことから、統合失調症には発症に対する効果が少ない変異が多数かかわると解釈されてきた。現在では、発症のリスクを予測するために、それぞれの変異に重み付けを与えて算出するポリジェニックリスクスコアの構築などが、遺伝研究の主流を占めているといえる。

これらの遺伝研究の多くでは、解析サンプルとし

て血液・唾液由来の DNA が使用されており、患者のすべての細胞に存在する生殖細胞変異を対象として行われている。しかし近年になり、体細胞変異とよばれる、受精後の発生段階の途中で生じる変異が発症にかかわる可能性が示唆されるようになった⁸⁾。体細胞変異は神経発生の初期に神経幹細胞などで生じた場合、脳特異的に存在することになる。健常ヒト前頭葉皮質や海馬歯状回の 1 神経細胞から検出される一塩基変異型の体細胞変異は数千カ所にのぼるといふ報告もあり⁷⁾、脳特異的な変異が病因と考えられている、片側巨脳症のような疾患も報告されている⁶⁾。脳特異的体細胞変異は、これまでの精神疾患遺伝研究であまり顧みられていない領域であり、発症要因の一つとして検証される余地が残されているといえる。

Analysis of LINE-1 insertion sites of the postmortem brains of patients with schizophrenia

*熊本大学大学院 生命科学研究部 分子脳科学講座 (〒 860-8556 熊本県熊本市中央区本荘 1-1-1) Miki Bundo, Kazuya Iwamoto : Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, 1-1-1 Honjo, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan

【文東 美紀 E-mail : bundo@kumamoto-u.ac.jp】

2. LINE-1 と統合失調症

筆者らは脳特異的体細胞変異の一つとして、特にレトロトランスポゾン的一种である long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) に着目している。LINE-1 は全長 6 kb ほどの配列であり、ヒトゲノムに約 50 万コピー存在しており、ヒトゲノムの約 17% を占めている³⁾。LINE-1 は、自身の配列を転写・逆転写を介して複製し、ゲノムの他の場所に挿入する(コピー & ペースト)という、転移とよばれる反応を起こすことで、自身のコピーをゲノムの中で増やすことができる。LINE-1 転移の一部は、ゲノム構造や機能の破壊を引き起こすことで疾患の発症につながるということが知られている。例えばデュシェンヌ型筋ジストロフィーでは、*DMD* 遺伝子のエクソン内に LINE-1 挿入が起きることによりエクソンスキップが生じ、タンパク質構造が破壊されることで、発症につながるということが知られている⁵⁾。

元来、このようなゲノム構造の破壊を防ぐため、LINE-1 の転移活性は DNA メチル化などによって厳密に抑制されており、生殖細胞や発生のごく初期にのみまれに転移活性を示すと考えられていた。しかし 2009 年に LINE-1 はヒト神経前駆細胞で転移活性を示すこと、ヒト脳以外の組織と比較すると、脳で LINE-1 コピー数が増大していること、LINE-1 が挿入されるゲノム領域は、神経細胞で発現している遺伝子の近傍に多いことが示された⁴⁾。筆者らは統合失調症の発症に LINE-1 転移が関与しているという仮説を基に、患者前頭葉死後脳と健常者で LINE-1 のコピー数の定量を行ったところ、患者の神経細胞で LINE-1 のコピー数が増大していることを見いだした。また全ゲノムシーケンシングにより、脳特異的な新規 LINE-1 の挿入は、シナプス関連など神経細胞の機能に関与する遺伝子の近傍に多く生じていることを示した¹⁾。このような遺伝子内やその近傍に生じた LINE-1 挿入は、神経細胞の構造や機能を破壊することによって、統合失調症の発症に関与する可能性がある。

3. 統合失調症患者の シングルセルレベルでの LINE-1 解析

上記の研究は、患者死後脳の前頭葉凍結試料を使用して行ったものであり、数十万個程度の細胞由来の DNA から LINE-1 検出を行っている。しかし LINE-1 の新規挿入は細胞ごとに生じるゲノム位置が異なっていることが考えられ、正確な LINE-1 挿入

入プロファイルを得るためには、シングルセルレベルの解析が必要になる。そのため、筆者らはシングルセルレベルで LINE-1 挿入を解析するための技術開発を行った。Novel Elements Concentrated-sequence (NECO-seq) と名付けた本法では、凍結死後脳試料からセルソーターにより神経細胞核群を分画し、その後、Fluidigm 社の C1 Single-Cell Auto Prep を用い、1 細胞核をトラップした微小流路系で全ゲノム増幅を行った後、ヒト特異的 LINE-1 配列である L1Hs の 3' 側と、その 3' 側に隣接するゲノム領域について PCR 増幅を行い、次世代シーケンシングにより網羅的に LINE-1 挿入部位の検出を行う²⁾。本法では、標準ゲノム配列に登録されている L1Hs の約 90% を検出することが可能である。また、標準ゲノム配列にない L1Hs について、外部データベースを用い既知の L1 配列を除外し、さらに新規転移をサポートするシーケンズリードを精査することにより、新規転移候補の L1 を同定する。新規転移候補 L1 について、Sanger 法などによる validation 成功率は約 67% であり、類似手法と比較しても高い精度を示している。

NECO-seq 法を用い、統合失調症患者・健常者 (n = 10 ずつ) の前頭葉皮質 (ブロードマン 46 野) から、それぞれ約 50 個、合計 1,000 個以上の神経細胞核について、LINE-1 の新規挿入部位の解析を行った。どちらの群でも 1 神経細胞あたり平均数十カ所の新規転移を検出した。交絡因子による LINE-1 検出数への影響を確認したところ、年齢、性別、死後経過時間、pH、抗精神病薬服薬量との相関はみられなかった。

LINE-1 新規挿入が起きたゲノム領域については、患者・健常者いずれの群においてもそのほとんどが遺伝子間領域やイントロンに認められたが、一部はエクソンやプライス部位にも認められ、それらが遺伝子の構造や機能に影響を与えている可能性が示された。また遺伝子内・近傍に生じた LINE-1 新規挿入部位について、Gene Ontology (GO) 解析を行った結果、患者、健常者いずれの群においても、神経細胞やシナプスに関係するタームが多く検出され、疾患解析においても自閉症や神経発達症に関与するタームが多く検出された。患者、健常者ともに神経機能にかかわる遺伝子のそばで LINE-1 挿入が多く検出された原因として、1) 神経関連遺伝子は他の遺伝子と比較して、非常に長いことが知られているため、ランダムに LINE-1 挿入が起きた場合、神経機能関連遺伝子の近傍に検出されやすい⁹⁾、2) 神経細胞で転写されている遺伝子はオープンクロマ

チン構造を取っているため、LINE-1 が挿入されやすい、などが考えられる。次に複数の神経細胞で検出された LINE-1 挿入遺伝子に限定して、GO 解析を行った。これは発生段階の比較的初期で生じ、より多くの神経細胞で共有されている LINE-1 挿入に着目して解析を行っていることになるが、その結果、患者群においてのみ神経やシナプス関係のタームが有意に見いだされた。また、実際に挿入が生じている遺伝子には神経伝達物質受容体などが含まれていた。

今後、患者で生じている LINE-1 の新規挿入によって、神経細胞にどのような形態・機能変化をもたらすのか、また、どのような神経回路に蓄積しているのかを空間解析技術により明らかにしていきたいと考えている。

本論文における研究はすべて倫理的配慮を行っている。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, et al (2014) Increased l1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron*, 81 (2) : 306-313.
- 2) Bundo M and Iwamoto K (2023) A method for detection of somatic LINE-1 insertions at the single-cell level from postmortem human brain. *Methods Mol Biol*, 2577 : 147-159.
- 3) Cordaux R and Batzer MA (2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet*, 10 (10) : 691-703.
- 4) Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, et al (2009) L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*, 460 (7259) : 1127-1131.
- 5) Kaer K and Speek M (2013) Retroelements in human disease. *Gene*, 518 (2) : 231-241.
- 6) Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, et al (2012) De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat Genet*, 44 (8) : 941-945.
- 7) Lodato MA, Rodin RE, Bohrsen CL, et al (2018) Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science*, 359 (6375) : 555-559.
- 8) Nishioka M, Bundo M, Iwamoto K, et al (2019) Somatic mutations in the human brain : implications for psychiatric research. *Mol Psychiatry*, 24 (6) : 839-856.
- 9) Thomas CA, Paquola AC and Muotri AR (2012) LINE-1 retrotransposition in the nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28 : 555-573.
- 10) Trubetskoy V, Pardinas AF, Qi T, et al (2022) Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia. *Nature*, 604 (7906) : 502-508.

■ ABSTRACT

Analysis of LINE-1 insertion sites of the postmortem brains of patients with schizophrenia

Miki Bundo, Kazuya Iwamoto

Department of Molecular Brain Science, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

Somatic mutations are a kind of genomic variants that occur during the developmental stages after fertilization and exist in a mosaic-like pattern in individuals. Some of the brain-specific somatic mutations have been reported to cause neurological diseases. We have especially focused on long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) insertions, a type of retrotransposon, and have found that the LINE-1 copy number was increased in neurons of schizophrenia patients and that the newly inserted LINE-1 were located near the genes involved in neuronal functions. To identify the detailed profiles of the LINE-1 insertion genomic sites, we established a new single-cell-level analysis method, NECO-seq, and performed a case-control analysis using the postmortem brains of schizophrenia patients. Analysis of a total of more than 1,000 neuronal nuclei showed that LINE-1 insertions that occurred at a relatively early stage in neurogenesis accumulated near the neuron-related genes, including neurotransmitter receptors. These LINE-1 insertions may have a profound effect on neuronal morphology and function.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 34 (4) : 161-164, 2023)
