

助成番号 26-2-25

## 第三世代シーケンサーによる新たな神経変性機序の解明

名古屋大学大学院医学系研究科 機能組織学

永田 健一

### 1. 諸言

ヒトやマウスのような高等生物においてもいわゆる遺伝子 (protein coding gene) の数は他の生物と大差ない。特に中枢神経系は他の臓器よりも転写産物の多様性に富むため<sup>1)</sup>、神経変性疾患の発症機序を探索する上では各遺伝子から産生される多種多様な転写産物の全貌を理解することが重要である。ただ、技術的限界のため研究の多くが遺伝子レベルの解析にとどまっている。最近、大規模なヒト死後脳サンプルを対象として次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析が行われた<sup>2)</sup>。この研究では、新規の情報解析ツール<sup>3)</sup>を適用することで疾患と関連する数百のスプライシングを検出し、さらに遺伝的な多様性との関連を明らかにした。この報告は1つのブレークスルーとなるアプローチであったが、ヒト死後脳サンプルであるため、検出されたスプライシング異常が疾患発症の原因なのか結果なのかは議論の余地がある。

そこで本研究では、シンプルなマウスモデルを使って、神経変性に先立って発現する転写産物を新規に同定することを目指した。申請時点では、次世代シーケンサーによるスクリーニングを行った後、標的を十分に絞り込んでから第三世代シーケンサーによる解析を行う予定としていた。実際には、次世代シーケンサーの結果が出た後に、結果の妥当性を検証するため方法の一部を変更した。

### 2. 方法

解析対象のモデルには舌下神経損傷モデルを用いた。このモデルでは、数日でグリアの増殖、血管透過性の亢進などの炎症反応が惹起され、1ヶ月後から徐々に神経細胞死が生じる。8週齢の雄マウスの片側舌下神経を切断し、7日後に舌下神経核を回収した。また、コントロールとして、非損傷の舌下神経核も同じように回収した。5~10匹分の神経核よりRNAを抽出し、Illumina社の次世代シーケンサーでRNA-seqを行った。シーケンスタデータはDEXSeqを使ってExon単位で比較し、損傷応答性の変化を探索した。

次世代シーケンサーで得られた結果を精査するため、同じく神経損傷7日後の舌下神経核を対象としてシングルセルRNA-seqを行った。組織より定法に従って細胞核を回収

し、10x Genomics 社の Chromium を用いて 1 細胞ごとに区別しながらライブラリー調整を行った。次世代シーケンサーによって得られたシーケンスデータは Seurat (参照 URL: <https://satijalab.org/seurat/>) を用いて解析した。

### 3.結果

まず、得られた RNA-seq を遺伝子レベルで評価したところサイトカインのリガンドやその受容体、インターフェロン誘導遺伝子群、腫瘍壊死因子およびその関連遺伝子など 1,000 を超える有意な発現変動が検出された。基準は 2 倍以上とした。変動の大半は損傷側における発現上昇であったが、これにはミクログリアの著しい増殖が影響していると考えられる。結果の一部は、qPCR 法によって再現性を確認した。また、G タンパク質共役受容体の遺伝子群を対象とした過去の報告<sup>4)</sup> からも支持されるものであった。変動した遺伝子群のリストを使ってエンリッチメント解析を行ったところ、炎症応答のカテゴリーが多数を占めていた (図 1)。

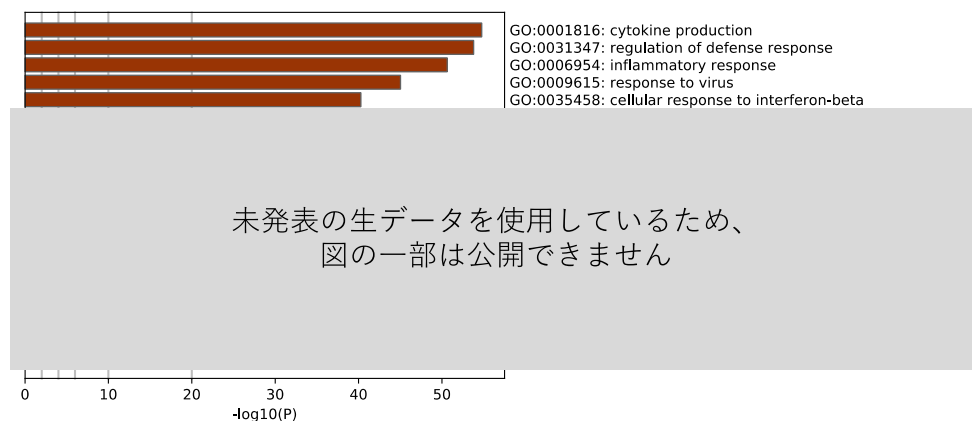


図1. 遺伝子レベルのエンリッチメント解析結果

次に、Exon レベルで結果を再解析した。推奨プロトコルに従って解析を進めたところ 1,700 程度の遺伝子で 1 箇所以上の違いが検出された。得られたリストを元にエンリッチメント解析を行ったところ、形態形成に関連するカテゴリーなどが同定された (図 2)。

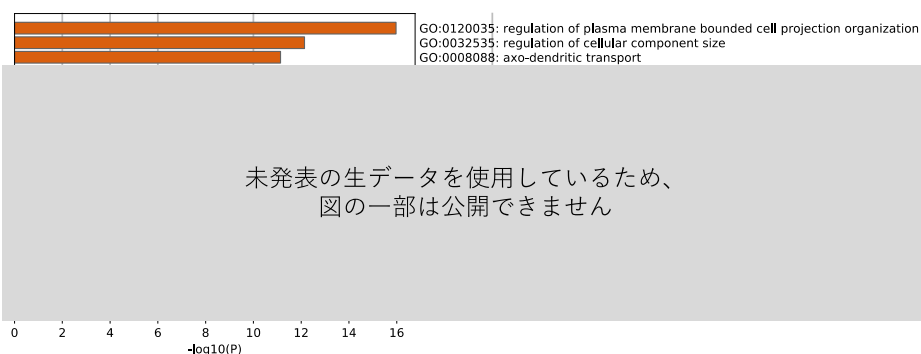


図2. Exonレベルのエンリッチメント解析結果

損傷側ではグリアの著しい増殖が生じる。このため、組織中の細胞構成比率の変化による「みかけ上の変動」が生じる可能性があった。例えば、神経細胞とグリア細胞の両方で発現しており、さらに細胞間で異なるアイソフォームを持つ遺伝子などで偽陽性の可能性が生じる。第三世代シーケンサーのスループットが高くないことを考えると、事前に、別の手法に基づいて偽陽性を排除することが必要であった。そこで、シングルセル RNA-seq を用いて 1 細胞レベルで神経損傷後の発現プロファイルを得ることを試みた。10x Genomics のシステムを用いてコントロール側で 18,240 細胞、損傷側で 24,618 細胞を対象に RNA-seq を行った。コントロールの平均リード数は 38,465、損傷側は 23,099 であった。2 サンプルから得られた遺伝子発現データを次元削減し、2 次元マップ上で表現した (図 3)。細胞タイプごとに独立したクラスターが形成されており、神経細胞やオリゴデンドロサイトのクラスターなどではコントロール側、損傷側で目立った違いがみられなかった。一方、ミクログリアのクラスター (no.5) では、細胞の増殖を反映してより大きなクラスターが形成されていた。また、末梢由来の免疫細胞クラスター (no.10) は損傷側でのみ明確に認められた。これらのクラスターについては、さらにサブクラスター解析を行い、新規の細胞集団を見出した。単なるバッチエフェクトの可能性を排除するため、組織切片や 3 次元イメージングによって組織学的に検証し、生物学的に意味のある現象であることを確認した。

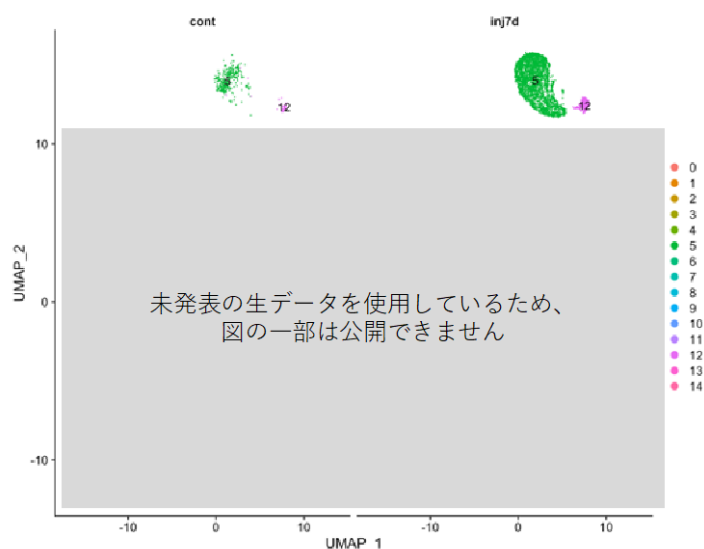


図3. コントロール (左) と損傷 (右) のシングルセルRNA-seqの結果

#### 4.考察

次世代シーケンサーは汎用性が高く、遺伝子発現解析のための強力なツールとして普及している。ただし、そのリード長は単一エクソン相当の 150 塩基ほどしかない。そのため、転写産物の情報は断片的となり、全長がどのような配列なのかを直接知ることは困難であ

る。第三世代シーケンサーは DNA や RNA の全長を 1 分子ごとに配列解析できるため、特定の遺伝子から派生した転写産物の網羅的な取得が可能である。唯一の課題であるスループットの低さを克服するため、本研究では予め次世代シーケンサーで候補を絞り、特定の転写産物に焦点をあててその全長を取得することを目指した。

RNA-seq の結果からは遺伝子レベル、Exon レベルのカテゴリーの違いが明らかとなった。これらは神経損傷に起因する変化の異なる側面を反映していると考えられる。現在、シングルセル RNA-seq の結果との照らし合わせを行っている。みかけ上の変化を排除することで、損傷応答性を有する転写産物の多様性について明らかにしていく予定である。

## 5.結語

RNA-seq によるスクリーニングにより神経損傷に応答する多数の変動をとらえることに成功した。これまでに舌下神経損傷モデルを対象とした RNA-seq、シングルセル RNA-seq の報告はなく、本研究の結果は神経変性疾患の機序解明のための貴重なデータセットを提供するものである。結果を精査した後に第三世代シーケンサーを駆使して全長レベルでの評価を進めることで、経変性機序の分子メカニズムが深く理解できるようになると期待できる。

最後に、多大なるご支援を賜りました大阪難病研究財団に深く感謝いたします。

## 6.文献

- 1) G. Yeo, D. Holste, G. Kreiman, C. B. Burge, Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome biology* 5, R74 (2004).
- 2) T. Raj, Y. I. Li, G. Wong, J. Humphrey, M. Wang, S. Ramdhani et al., Integrative transcriptome analyses of the aging brain implicate altered splicing in Alzheimer's disease susceptibility. *Nature genetics* 50, 1584-1592 (2018).
- 3) Y. I. Li, D. A. Knowles, J. Humphrey, A. N. Barbeira, S. P. Dickinson, H. K. Im et al., Annotation-free quantification of RNA splicing using LeafCutter. *Nature genetics* 50, 151-158 (2018).
- 4) K. Gamo, S. Kiryu-Seo, H. Konishi, S. Aoki, K. Matsushima, K. Wada et al., G-protein-coupled receptor screen reveals a role for chemokine receptor CCR5 in suppressing microglial neurotoxicity. *J Neurosci* 28(46), 11980-8 (2008)

## 7.成果発表

現在なし