統合失調症患者死後脳における体細胞変異検出のための解析パイプラインの確立と検証

岩本和也

熊本大学大学院生命科学研究部 分子脳科学分野

【研究の背景】

脳神経系のゲノムでは、発達過程で様々な変異が蓄積していくことが明らかになりつつある。これらは一塩基変異に加え、コピー数多型、染色体異数性、トランスポゾンの転移パターンなど多岐にわたり、神経発達段階の初期に生じるものや神経活動依存的に生じるものなど、生成のメカニズムも大きく異なっていると考えられている。脳神経系に生じている体細胞変異は、脳機能に影響を与え、統合失調症の病因・病態と大きく関わると想定されるが、現在まで体系的な研究はほとんど行われておらず、健常者脳における生理的な基礎知見も欠落している。

申請者らはこれまで精神疾患患者死後脳試料を用いたエピゲノム解析を行ってきたが、その過程で近年、統合失調症患者前頭葉神経細胞においてトランスポゾンLINE-1のゲノムコピー数が増大していることを明らかにした(Bundo et al., Neuron 2014)。本所見は脳神経系における体細胞変異と精神疾患との関係を示したものであるが、今後、トランスポゾン動態だけではなく一塩基変異やコピー数多型など様々な体細胞変異についての検討を行い、統合失調症の病因・病態への影響を統合的に検討していく必要があるであろう。

現在、一塩基変異やコピー数多型といった体細胞変異の研究は癌研究分野において進んでいるが、癌のような異常増殖を伴わない統合失調症脳神経系細胞における体細胞変異は出現頻度が小さく、検出にあたっては癌研究以上の困難が予想される。本研究計画では、1)脳神経系ゲノムにおける高深度全ゲノム解析データから、体細胞変異カタログ化のための解析パイプラインの確立と、2)確立した解析手法を適用して健常者死後脳神経細胞における生理的な体細胞変異ランドスケープを明らかにし、今後の統合失調症の体細胞変異解析に貢献することを目的とする。

【目的】

本研究計画では、1) 脳神経系ゲノムにおける高深度全ゲノム解析データから、体細胞変異カタログ化のための解析パイプラインの確立と、2) 確立した解析手法を適用して健常者死後脳神経細胞における生理的な体細胞変異ランドスケープを明らかにし、今後の統合失調症の体細胞変異解析に貢献することを目的とする。

【方 法】

脳サンプルとして、1) 前頭葉および肝臓(セット 1)、2) 前頭葉から神経細胞・非神経細胞に分離した試料(セット 2)、3) 前頭葉と小脳(セット3)、の3 セットを使用した。試料はそれぞれアメリカスタンレー財団、東京都老人総合研究所、札幌医科大学から入手したものである。各試料からゲノム DNA を抽出後、イルミナ社 HiSeq2500 または HiSeqX により深度 X100 程度の全ゲノム解析(WGS)を行った。PCR による偽陽性を防ぐため、可能な限り PCRを用いない方法でシークエンスライブラリーの調整を行った。

全ゲノム解析データに対してクオリティコントロール (QC)を行い、標準ヒトゲノムにアラインメントを行った。アラインメントデータに対し再び QC を行った後、体細胞変異検出ソフトウェア Mutect を用いて体細胞変異の候補を抽出した。同定した体細胞変異候補から、特に相同配列の多い領域を除外し、シークエンスクオリティやアラインメントの深度といったパラメーターについて体系的に検討を行った。各パラメーター操作後の体細胞変異候補に対して、小型次世代シークエンサーを用いたターゲットアンプリコンシークエンス(TAS)法を行い、WGS から計算された出現頻度との比較を行った。セット1のサンプルで確立した解析・検証手法を用いて、セット2 および3 の脳試料における体細胞変異を網羅的に検出し Gene Ontology 解析を行った。

【結 果】

セット 1 における Mutect の解析では 2 万個を超える体細胞変異候補が抽出された。このうち、ゲノムの中で他領域と相動性の高い領域 99%の変異候補が集中して同定されており、これらを除外した。さらに、変異候補周辺ゲノム領域についても同様に他ゲノム領域との相同性が高い場合、候補から除外した。また、体細胞変異をサポートするシークエンスリードの QC を厳しくした。本条件下で選択された候補変異領域を TAS 法にて検証したところ、6 個について体細胞変異を支持する結果が得られた。

セット 1 で確立した条件下で、セット 2 および 3 の解析を同様に行い、TAS 法にて検証を行ったところ、最終的にセット 2 では 12 個、セット 3 では 13 個について、体細胞変異を支持する結果が得られた。セット 2 では、神経細胞と非神経細胞、および肝臓で WGS を行っているが、12 個中 11 個で全ての試料にて体細胞性が検出された。残り 1 個については肝臓では認められず、脳特異的な変異であることが示唆された。セット 3 においては、前頭葉皮質と小脳で WGS を行っているが、13 個中 10 個は両組織で体細胞性が検出された。残り 2 個はそれぞれ皮質特異的、小脳特異的な体細胞性を示した。最終的に 3 検体より、31 個の体細胞変異を検出した。

検出した 31 個の変異について、特徴を調べたところ、変異の頻度は~14%であり、大部分が 10%以下であった。また、C>T 変異が大部分を占め、アミノ酸配列の変化を伴うものは 1 ヶ所のみであった。Gene Ontology 解析を行ったところ、neuron projection membrane, neuronal cell body など神経の機能・構造に関わる遺伝子に多く体細胞変異が生じていることが示唆された。

【考 察】

今回同定できた体細胞変異は比較的頻度の高いものが多く、セット間で共通して認められるものが多かった。変異の頻度と生じた発生時期は相関していると考えられているため、これらは初期発生過程で生じたものであろう。一方で、個々の分裂後の神経細胞に生じる変異については出現する期待頻度はさらに低く、X100のWGSでは効率的に検出できない恐れがある。これらに関しては、単一神経細胞でのWGS解析が必要になると考えられる。変異が生じた領域はほとんどがアミノ酸置換を伴わないものであった。これは今回健常者の試料を用いたことと矛盾しない。また、変異が生じる領域は神経機能に関連する遺伝子に多く認められた。これは、そのような遺伝子群が他の機能を持つ遺伝子群に比べ、単純に長いからであると考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、脳組織の WGS から効率的に体細胞変異を検出・検証する手法が確立できた。将来的に統合失調症患者 検体を含む多検体での検討に道筋がついたと言える。今回検出できた体細胞変異は初期発生過程に生じた比較的頻度の 高い変異が多く、このことは血液を含む末梢組織での検討にも応用可能であることが示唆された。また、確立した手法は WGS だけではなく、より高いカバレッジが期待できるエクソーム解析などのシークエンスデータにも応用可能であり、既に蓄 積されている大量のデータからの再解析により、体細胞変異を検出していくことも期待される。