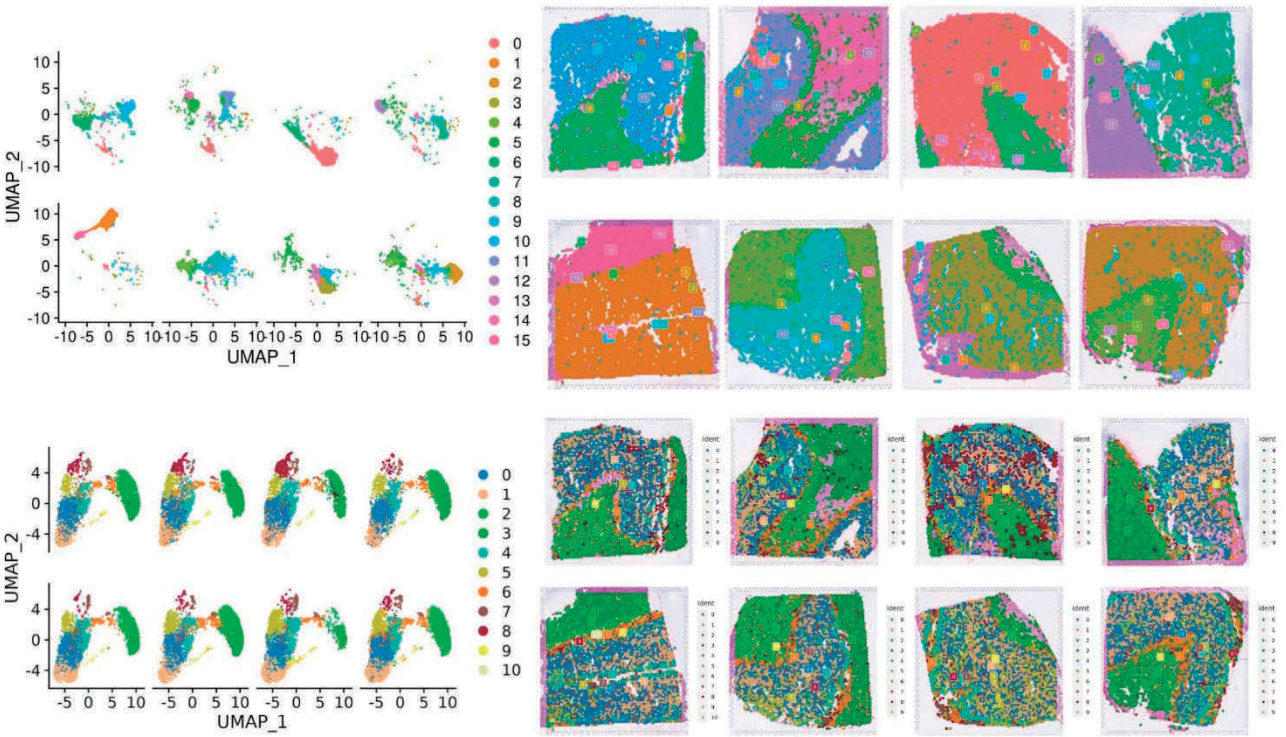
68　生命科学と情報学の融合研究による精神疾患の病態解明	久保　健一郎

【目的】近年、単一細胞解析（single cell RNA sequence）の技術が進展し、さらに、細胞の空間配置と結びついた解析が可能な空間的遺伝子発現解析（Spatial transcriptomics ; Visium、GeoMx DSP 等、2021 年 1 月の Nature Methods で “Method of the Year 2020” に選ばれた）が登場した。これらの解析で得られる情報量は膨大であるため、情報学的解析が必須となる。そこで、生命科学と情報学が連携して融合研究を行うことにより、脳全体での解析では不明な変化も、細胞集団特異的に、かつ、細胞の空間配置と関連付けながら、検出することが可能になると期待される。このため、本研究は、最先端の遺伝子発現解析技術と情報学との融合研究により、統合失調症の病態において鍵となる細胞集団を明らかにすることを目的とした。

【方法】統合失調症に罹患した患者と正常対照者の稀少な死後脳組織を用いて、単一細胞解析と最先端の空間的遺伝子発現解析を行い、得られた大規模データを用いて、情報学的解析を行った。解析結果について、死後脳の組織を用いて、免疫組織化学法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた組織学的検証を行った。

【結果】単一細胞解析と最先端の空間的遺伝子発現解析で得られたデータの情報学的解析を行ったところ、統合失調症の死後脳組織では、正常対照群と比較して、アストロサイトに関連する分子の遺伝子発現が増加していることを見いだした。免疫組織化学法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた組織学的検証を行ったところ、確かに統合失調症の死後脳組織において、アストロサイトに関連するシグナルの増強が確認された。アストロサイトは脳実質内において、脳血管を取り巻いて血液脳関門を形成するとともに、血流、代謝の維持・調節に重要な役割を担っている。精神疾患の発症には、発生・発達段階での様々な要因が関与することが想定されているが、それらの要因によって、今回見出されたアストロサイト関連シグナルの変化が生じている可能性があると考えられた。

統合失調症の患者と正常対照者の死後脳組織の空間的遺伝子発現解析



68. 生命科学と情報学の融合研究による精神疾患の病態解明

久保　健一郎

東京慈恵会医科大学 医学部 医学科 解剖学講座

Key words：精神疾患，統合失調症，単一細胞解析，空間的遺伝子発現解析，情報学的解析

緒　言

統合失調症をはじめとする精神疾患は、罹患した個人や家族のみならず、職場や地域等の周囲に与える影響が大きく、社会的な課題としての取り組みが求められている。それにもかかわらず、精神疾患の病態は依然として不明な点が多い。また、新たな作用機序に基づいた薬剤の候補が存在しないなど、治療法の開発が滞っている。その要因の一つとして、ヒトの脳サンプルを得ることが著しく困難であることが挙げられる。ヒトの脳は他の動物に比べて高度に発達しており、ヒトに特徴的な細胞も存在する（紡錘細胞、白質神経細胞、等）。このため、精神疾患の脳における分子細胞生物学的な変化を知るためには、ヒトの死後脳を用いた解析が必須である。ところが、正常の脳を含めた、研究利用が可能なヒトの脳サンプルの数が極めて少ないため、精神疾患の脳の中でどのような細胞分子的な変化が起きているのかは未だに不明な点が多い。

他方で、近年、単一細胞解析（single cell RNA sequence）の技術が進展し、さらに、細胞の空間配置と結びついた解析が可能な空間的遺伝子発現解析（Spatial transcriptomics；Visium、GeoMx DSP 等、2021 年 1 月の Nature Methods で“Method of the Year 2020”に選ばれた）が登場した。これらの解析で得られる情報量は膨大であるため、情報学的解析が必須となる。そこで、生命科学と情報学が連携して融合研究を行うことにより、脳全体での解析では不明な変化も、細胞集団特異的に、かつ、細胞の空間配置と関連付けながら、検出することが可能であると期待される。

このため、本研究は、最先端の遺伝子発現解析技術と情報学との融合研究により、統合失調症の病態において鍵となる細胞集団を明らかにすることを目的とした。統合失調症に罹患した患者と正常対照者の稀少な死後脳組織を用いて、単一細胞解析と最先端の空間的遺伝子発現解析を行い、得られた大規模データを用いて、情報学的解析を行った。解析結果について、死後脳の組織を用いた検証を行い、統合失調症の脳において遺伝子発現が変化している細胞集団の探索を行った。また、マウスを用いて、統合失調症の病態において注目される脳部位である前障について新規の発生機構を解明するとともに、統合失調症で低下するとされる前頭葉機能の新たな改善方法を明らかにした［1，2］。

方法および結果

1. 単一細胞核の遺伝子発現解析

精神疾患死後脳・DNA バンクから供与された、統合失調症に罹患した患者と正常対照者の凍結脳組織 4 例ずつの前帯状皮質について、10X Genomics 社のマルチオーム（multiome）用解析キットを購入したのち、それぞれの凍結脳組織から単一細胞核を分離し、遺伝子発現解析として、RNA シークエンス（snRNA-seq）と ATAC-seq を行った。

2. 空間的遺伝子発現解析

上記と同じ、統合失調症に罹患した患者と正常対照者の凍結脳組織 4 例ずつの前帯状皮質について、薄切した脳組織を解析用スライドグラスに貼付けた空間的遺伝子発現解析（10X Genomics 社 Visium、解析用スライドグラス上の 1 スポット 55 μm の各スポットで遺伝子発現解析）を行った。

3. ホルマリン固定パラフィン切片を用いた空間的遺伝子発現解析

精神疾患死後脳・DNA バンクから供与された、統合失調症に罹患した患者と正常対照者のホルマリン固定パラフィン切片 3 例ずつについて、薄切した脳組織を解析用スライドグラスに貼付けたのち、それぞれのスライド上の解析領域（ROI）について、空間的遺伝子発現解析（Nanostring 社 GeoMx Human Whole Transcriptomics Atlas、組織染色に基づき、任意の ROI において 18,000 遺伝子について発現解析）を行った。

4. 組織学的検証

空間的遺伝子発現解析のうち、特に Visium によって得られた解析結果に基づいて、統合失調症に罹患した患者と正常対照者の脳組織標本を用いて、免疫組織化学法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた組織学的検証を行った。

5. 前障の発生における細胞機構の解析

新たに導入した神経細胞ラベル方法であるフラッシュ・タグ法や子宮内電気穿孔法を用いて、マウスの脳の発生過程において、前障の神経細胞を可視化して、経時的に観察することで、前障の発生における細胞機構の解析を行った。

6. マウスを用いた前頭葉機能刺激方法の解析

子宮内電気穿孔法を用いてチャネルロドプシンをマウス前頭前皮質の表層の神経細胞に導入し、4 Hz という低周波数帯での活動刺激を行った。その際に、前頭前皮質に記録電極を刺入して局所脳活動（Local field potential）を測定した他、種々の行動解析試験（Y-maze test、Radial-maze test、Three chamber test）を用いて前頭葉機能を解析した。

結果および考察

1. 死後脳の遺伝子発現解析

精神疾患死後脳・DNA バンクから供与された、統合失調症に罹患した患者と正常対照者の凍結脳組織 4 例ずつの前帯状皮質について、薄切した脳組織を解析用スライドグラスに貼付けた空間的遺伝子発現解析（10X Genomics 社 Visium、解析用スライドグラス上の 1 スポット 55μm の各スポットで遺伝子発現解析）を行った。解析で得られた Visium で解析を行ったスライドグラス上の各スポットの UMAP と、各スポットの位置情報を用いてスライドガラス上の空間的な分布で示したデータを図 1a に示す。得られたデータそのものは、各標本による違いが大きく、例えば、同じ白質であっても、異なる遺伝子発現を示すクラスターとして分類されていた。そのため、このままの状態では、標本間での比較が難しい状態であった。

このため、上記の図 1a のデータに対して、情報学の手法を用いて、標準化のためのアルゴリズムである Harmony によるデータ統合を行った。この情報学的データ処理によって、Visium で解析を行ったスライドグラス上の各スポットを、共通の組織ドメインに分類し直すことができた。さらに、遺伝子発現の情報から、それぞれの組織ドメインの特徴を抽出し、図 1b に示すように、皮質第 I 層、灰白質 5 ドメイン、白質 2 ドメイン、抑制性ニューロン、皮髄境界領域、血管周囲関連クラスター、血管関連クラスターに分類した。

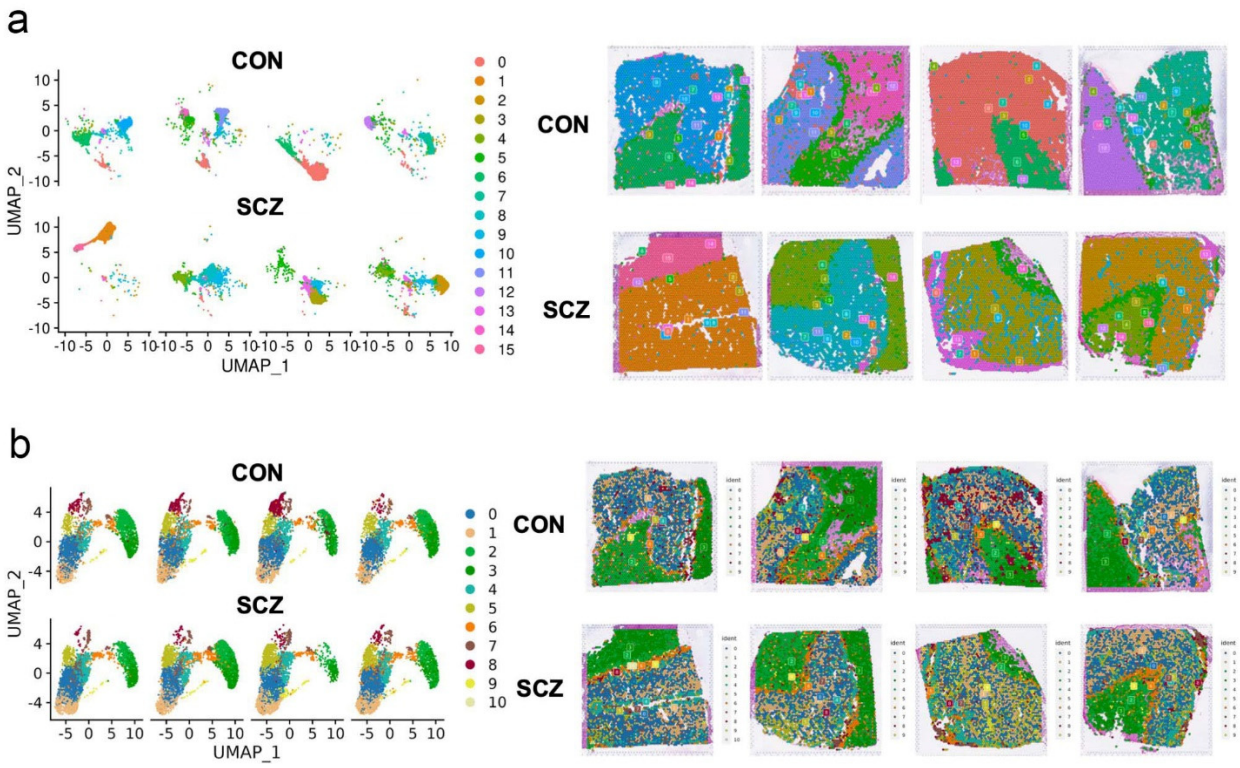


図 1. 統合失調症の患者と正常対照者の死後脳組織の空間的遺伝子発現解析

a) 統合失調症の患者と正常対照者の凍結脳組織 4 例ずつの前帯状皮質を、空間的遺伝子発現解析方法の一つである Visium 法を用いて解析した。左に UMAP のパネルを、右に UMAP 上のクラスターを位置情報に基づいて空間的に再構成したパネルを示した。

b) 上記の図 1a のデータに対して、標準化のためのアルゴリズムである Harmony によるデータ統合を行った。この情報学的データ処理によって、各スポットを、共通の組織ドメインに分類した上で、遺伝子発現の情報から、それぞれの組織ドメインの特徴を抽出した。それぞれの組織ドメインを、異なる色を用いて、UMAP 上のクラスター（左）と空間的に再構成したパネル（右）に表示した。

さらに、同じ組織を用いて行った単一細胞核の遺伝子発現解析の結果をもとに、それぞれのドメインを細胞種特異的に分類して比較した。すると、統合失調症（SCZ）のサンプルでは、正常対照群（CON）と比較して、アストロサイトに関連する分子の遺伝子発現が増加していることを見いだした（図 2a）。これと一致して、組織ドメインごとに、統合失調症（SCZ）と正常対照群（CON）のサンプル間での遺伝子発現の比較を行ったところ、多くの組織ドメインでアストロサイト関連遺伝子の発現が増加していた（図 2b）。

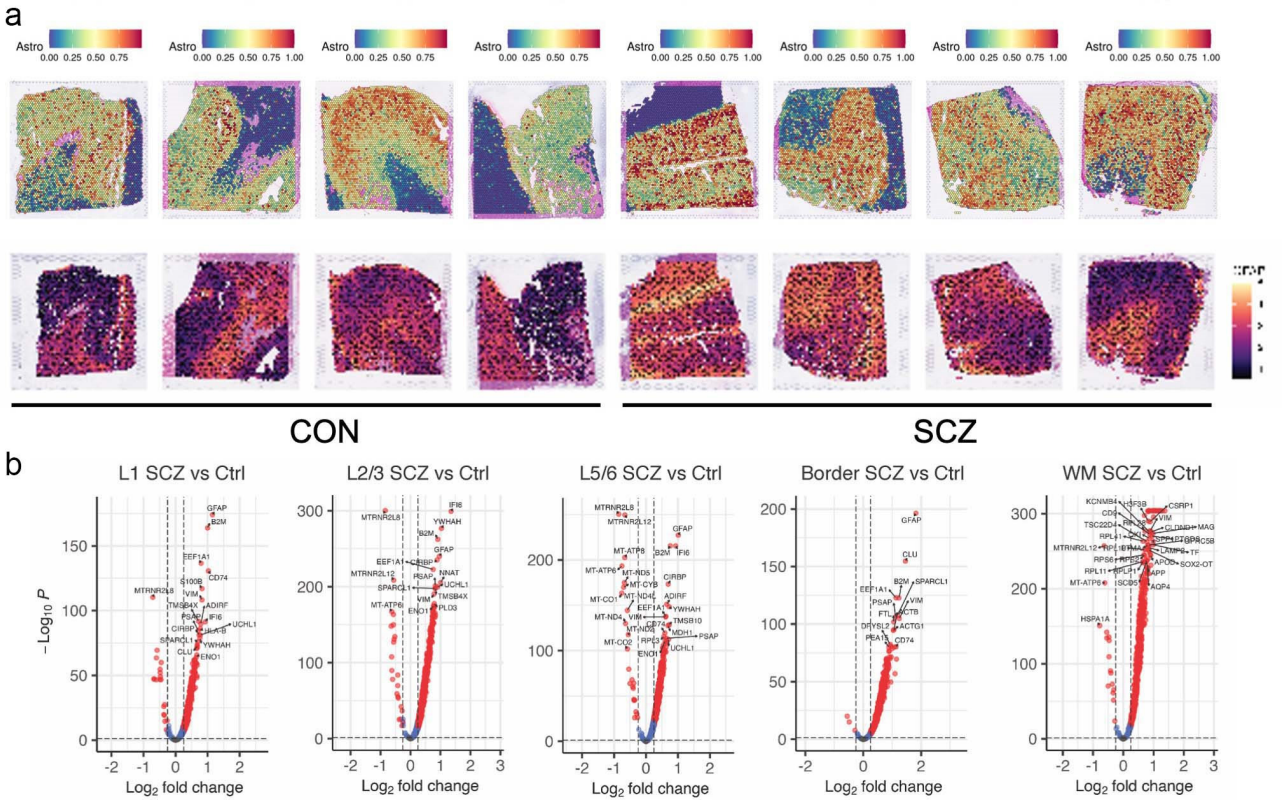


図 2. 統合失調症の患者と正常対照者の死後脳組織でのアストロサイトシグナル

a) 統合失調症の患者と正常対照者の凍結脳組織 4 例ずつの前帯状皮質を、空間的遺伝子発現解析方法の一つである Visium 法を用いて解析した。それぞれのスポットのアストロサイトに関連するシグナルを抽出したところ、統合失調症の患者の凍結脳組織において、アストロサイトに関連するシグナルの増強を認めた。シグナルの強度が強いスポットは赤い色で示されている。

b) 組織ドメインごとの遺伝子発現変化を、統合失調症の患者と正常対照者で比較した。特に発現変化が大きかった遺伝子名がグラフ上に示されている。この比較においても、アストロサイトに関連するシグナルの増強が認められた。

この空間的遺伝子発現解析で得られた結果に基づき、統合失調症に罹患した患者と正常対照者の脳組織標本を用いて、免疫組織化学法および *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた組織学的検証を行った。アストロサイトのマーカーであるビメンチン（VIM）や GFAP（グリア細胞繊維性酸性タンパク質）を用いた検証を行ったところ、確かに統合失調症（SCZ）のサンプルでのビメンチンおよび GFAP シグナルの増強が確認された（図 3）。

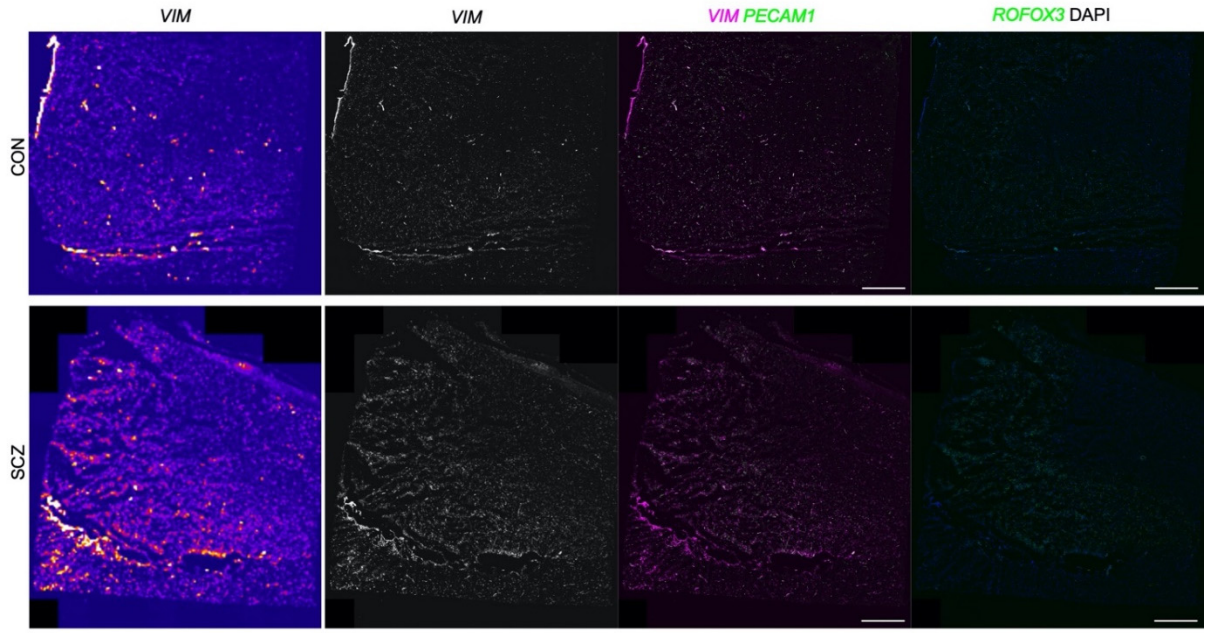


図 3. 統合失調症の患者と正常対照者の死後脳組織を用いた組織学的検証

空間的遺伝子発現解析方法の一つである Visium 法を用いて解析した統合失調症の患者と正常対照者の凍結脳組織の前帯状皮質の薄切標本を作製して、in situ ハイブリダイゼーション法を用いてビメンチン（VIM）、血管内皮細胞に発現している CD31（PECAM）、神経細胞のマーカーである NeuN（ROFOX3）の多重染色を行った。ビメンチンは血管とアストロサイトに発現するため、血管に発現するビメンチン（左から 3 つ目のパネルで白色のシグナル）を差し引いてアストロサイトに発現するビメンチンのシグナル（左から 3 つ目のパネルでマジェンタ色のシグナル）を比較したところ、統合失調症（SCZ）のサンプルにおいて、ビメンチンのシグナル増強が確認された（スケールバー：1,000 μm）。

アストロサイトは脳実質内において、脳血管を取り巻いて血液脳関門を形成するとともに、血流、代謝の維持・調節に重要な役割を担っている。精神疾患の発症には、発生・発達段階での様々な要因が関与することが想定されているが、それらの要因によって、今回見出されたアストロサイト関連シグナルの変化が生じている可能性がある。実際の死後脳の組織標本を用いた検証をさらに行うとともに、これらの所見をまとめて発表するための論文を準備中である。

2. 前障の発生における細胞機構の解析

前障は大脳皮質の深部に位置する領域で、近年、精神疾患やその症状との関連が報告されている。脳の多くの部位と結合する特徴を持ち、サリエンス（salience）の検出や注意の制御、意識などを含む様々な高次脳機能に関わるとされ、その機能が注目されているが、その発生過程は未解明であった。このため、新たに導入した、フラッシュ・タグ法を最適化した手法を用いて、前障の神経細胞を可視化した上で、発生過程の解析を行った。

まず、マウスの脳において前障の神経細胞が誕生する時期を調べたところ、妊娠 11.5 日目に誕生する細胞が多いことが明らかになった。そこで、妊娠 11.5 日目に蛍光色素（CFSE）をマウス胎児の脳室内に注入したあと、1 日ごとに経時的な観察を行った。すると、前障の神経細胞は、妊娠 14.5 日目では最終目的地である前障の位置を一度通過した後、脳の表層に配置していた。その後、妊娠 15.5 日目および妊娠 16.5 日目になると、本来の最終目的地である将来の前障の位置に分布していた。

この様子を脳のスライス培養を行った上で、時間経過を追ってタイムラプス撮影を行ったところ、移動方向を反転させ、来た経路を逆向きに移動して最終目的地にたどり着くという特徴的な移動をすることを見出し、論文発表を行った［1］。

3. マウスを用いた前頭葉機能刺激方法の解析

これまでの知見では、精神疾患での機能低下が想定されている抑制性神経細胞（特にPV陽性細胞）が高周波数帯の脳波活動に関わることから、前頭葉機能と高周波数帯の脳波活動の関わりが注目されている。一方、我々は以前に、妊娠16.5日目に虚血を誘導した胎児期虚血のモデルマウス［3］において、子宮内電気穿孔法を用いて人工受容体をマウスの前頭葉皮質に遺伝子導入することで、マウス前頭葉皮質の表層の神経細胞を特異的に刺激した際に、認知機能や社交性などに代表される前頭葉機能が改善するとともに、低周波数帯の活動が増加していることを観察した。しかし、観察された低周波数帯の活動増加が、前頭葉機能の改善にどのように関わっているかは未解明であった。

そこで、低周波数帯の活動増加が、前頭葉機能の改善にどのように関わるのかを明らかにするために、光遺伝学の手法を用いて、低周波数帯での前頭葉刺激を試みた。手法としては、子宮内電気穿孔法を用いてチャネルロドプシンをマウス前頭葉皮質の表層の神経細胞に導入し、4 Hz という低周波数帯での活動刺激を行った。前頭葉皮質に記録電極を刺入して局所脳活動（Local field potential）を測定したところ、4 Hzという低周波数帯での光刺激によって、実際に前頭葉皮質の低周波数帯での脳波活動が増大していることがわかった。

この低周波数帯での光刺激を行ったところ、Y-maze testやRadial-maze testによって測定される認知機能の改善を認めた。また、この低周波数帯での光刺激は、3室社交性試験（Three chamber test）によって測定される社会性の改善を認めた。

これらの結果から、低周波数帯での前頭葉刺激は、認知機能や社会性をはじめとする前頭葉機能改善効果を持つと考えられた。得られた所見をまとめて、論文発表を行った［2］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所生命医科学研究センターのJay W. ShinおよびJulio L. Incioである。

文　献

1） Oshima K, Yoshinaga S, Kitazawa A, Hirota Y, Nakajima K, Kubo KI. A Unique "Reversed" Migration of Neurons in the Developing Claustrum. J Neurosci. 2023 Feb 1;43(5):693-708. Epub 2023 Jan 11. PMID: 36631266 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0704-22.2022

2） Hazra D, Yoshinaga S, Yoshida K, Takata N, Tanaka KF, Kubo KI, Nakajima K. Rhythmic activation of excitatory neurons in the mouse frontal cortex improves the prefrontal cortex-mediated cognitive function. Cereb Cortex. 2022 Nov 21;32(23):5243-5258. PMID: 35136976 DOI: 10.1093/cercor/bhac011

3） Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. JCI Insight. 2017 May 18;2(10):e88609. eCollection 2017 May 18. PMID: 28515367 DOI: 10.1172/jci.insight.88609.