

新潟大学脳研究所
「病理リソースを活用した脳神経病態共同研究拠点」
共同利用・共同研究報告書

ロングリードシーケンスを用いた 脳部位特異的に発現するアイソフォームの探索

研究代表者 嶋多 美穂子^{1), 2)}
研究分担者 柿田 明美³⁾, 宮川 卓²⁾

- 1) 国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 研究所 ゲノム医科学プロジェクト (戸山)
2) 公益財団法人東京都医学総合研究所 精神医学行動分野 睡眠プロジェクト
3) 新潟大学脳研究所病理学分野

研究要旨

本研究では前年度までに、脳に大きな神経変性がなく、感染症などの脳に影響を与え得る疾患で亡くなっていない、疾患研究のコントロールとなり得るサンプルを対象として、ロングリード遺伝子発現解析を実施した。同一サンプル由来の小脳、視床下部、側頭葉皮質の3つの異なる脳部位について解析を行った結果、2つ以上の部位で発現しているアイソフォームに絞っても、その半数以上が新規のものであり、脳部位特異的に発現するアイソフォームなどを複数同定することができた。そこで本解析を疾患研究にも応用するべく、本年度は進行性核上性麻痺 (PSP) と大脳基底核変性症 (CBD) という2つの疾患を対象とすることとした。神経変性部位に特徴的なアイソフォームについて検討することにより、CBD はアストロサイトプラークが特徴的であるのに対し、PSP はタフトアストロサイトが見られるといった両疾患の違いの本質に迫る結果を得ることを目的とする。

A. 研究目的

本研究で解析対象とする PSP と CBD はその鑑別が難しく、病理学的検査でも、特異性は 90%程度との報告がある (1)。PSP は、大脳 基底核、脳幹、小脳といった部位の神経細胞が減少し、転びやすくなる、下の方が見にくい、しゃべりにくい、飲み込みにくいといった症状が出現する疾患である。発症して間もないころはパーキンソン病とよく似た症状がみられるが、パーキンソン病の治療薬があまり効かず、症状がより早く進む傾向がある。一方 CBD は大脳皮質と皮質下神経核の神経細胞が脱落し、神経細胞及びグリア細胞内に異常リン酸化タウが蓄積する疾患である。典型的には、大脳皮質徴候として肢節運動失行、観念運動失行などが現れ、錐体外路徴候として無動・筋強剛やジストニア、ミオクローヌスが出現する。典型的

にはこれらの神経症候に顕著な左右差がみられるが、左右差のない例、進行性核上性麻痺の臨床症候を呈した例など非典型例が数多く報告されており、その臨床像は多彩である。

PSP と CBD の鑑別には、アストロサイト内のタウ病理が重要であるとされる。具体的には、アストロサイトの病変に関して、CBD はアストロサイトプラークが特徴的であり、PSP はタフトアストロサイトが特徴とされる。共に 4 リピート (4R) タウの異常蓄積が見られるが、ウェスタンブロットで検出されるタウタンパク質のバンドとして、PSP では低分子量タウ断片の中に 33kDa のバンドが優勢であるのに対し、CBD では約 37kDa の2本のバンド (ダブレット) が主に確認される (2)。Ressler らによる、PSP におけるヒトの死後脳の網羅的な RNA-seq の研究なども報告されているが、

PSP と CBD におけるタウタンパクの mRNA のスプライシングバリエントを、ロングリード法などを用いて高精度に比較した研究は乏しく、なぜタウタンパクの蓄積パターンが両疾患で異なるのかは未だ不明である。

そこで本研究では、両疾患の死後脳のサンプルを用いて、ロングリード法にて網羅的に遺伝子発現解析を行うことにより、各々の疾患の病変部位におけるタウタンパクの mRNA について詳細に検討すると共に、それ以外の遺伝子についても疾患特異的なアイソフォームの発現があるかを探索し、タウタンパク蓄積の機序や、疾患発症メカニズムの解明を目指すと共に、PSP と CBD の鑑別に役立つ知見を得ることを目的とする。

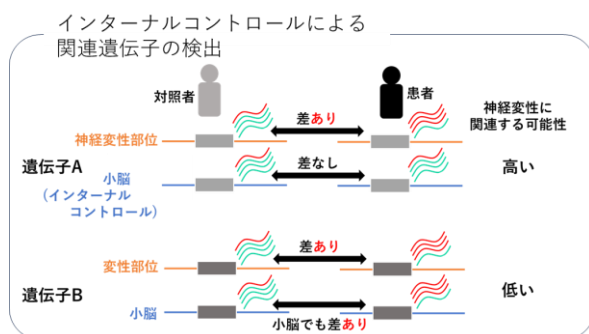
B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

PSP と CBD の 2 疾患の死後脳に対してそれぞれ 4 症例(合計 8 症例)を対象として、以下の 2 部位の脳組織を切り出し、RNA を抽出し、ロングリード法を用いた RNA-seq (Iso-seq, PacBio) にて解析を行う。

① 運動野 (大脳皮質)

② 小脳皮質

なお我々が行った先行研究から、マイナーなアイソフォームの発現には大きな個人差があり、複数症例を解析した際に、1 人の被験者でしか発現していないアイソフォームが数多く存在していることを確認している (3)。そのため、単純に神経変性が起こる大脳皮質のみを解析して比較するよりも、神経変性が起こらない小脳皮質のデータをインターナルコントロールとして用いることで、より感度高く、両疾患に関わるアイソフォームを特定できると考え、同一サンプルから 2 部位について解析する研究デザインとしている。



なお、本研究はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則に則り実施され、国立国際医療研究センター、東京都医学総合研究所並びに新潟大学の倫理委員会の承諾を得ている。また全ての被験者からは書面でのインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

本年度は、研究計画の立案を主に行い、実施予定のサンプルの半数について、切り出しを行っていただき、現在 RNA の抽出作業を実施中である。

D. 考察

ロングリード法を用いることで、これまでのショートリード法では見つかっていなかった新規のアイソフォームについての情報が多く得られることから、特に神経変性部位において PSP と CBD に関連するアイソフォームが同定されることが期待される。

E. 結論

PSP と CBD のタウタンパクの蓄積パターンの違い、発症メカニズムに関わるアイソフォームの同定を目指し、次年度さらに研究を進めていく予定である。

F. 研究発表 (上記課題名に関するもの)

1. 論文発表 (今年度はなし。前年度まで)

- Mihoko Shimada*, Yosuke Omae, Akiyoshi Kakita, Ramil Gabdul Khaev, Yuki Hitomi, Taku Miyagawa, Makoto Honda, Akihiro Fujimoto, and Katsushi Tokunaga. Identification of region-specific gene isoforms in the human brain using long-read transcriptome sequencing. Science Advances 10(4): eadj5279 2024

2. 学会発表 (今年度はなし。前年度まで)

- 日本人類遺伝学会 2023. 10. 14 東京
Mihoko Shimada, Yosuke Omae, Akiyoshi Kakita, Ramil Gabdul Khaev, Taku Miyagawa, Makoto Honda, Akihiro Fujimoto, and Katsushi Tokunaga.

Region-specific gene isoforms in the human brain using long-read sequencing and their correlation with DNA methylation.

2. 日本人類遺伝学会 2023. 10. 12 東京（招待講演）

嶋多美穂子. ロングリード RNA シーケンス Iso-Seq を用いたヒトの脳の部位間でのトランスクリプトームの比較

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当なし

※ なお、本研究は脳研究所からご提供いただいたサンプルにより実施している。また研究デザインを検討する際には、脳研究所の先生方から様々ご指導を賜っており、関係する方々に心より御礼申し上げます。

【参考文献】

- (1) Probst et al., Acta Neuropathol, 2007
- (2) Tetsuaki Arai et al. Ann Neurol, 2004
- (3) Shimada et al. Science Adv, 2024