

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト脳神経組織における体細胞変異の探索

氏名 西岡将基

統合失調症をはじめとする精神疾患は高い遺伝率が指摘されており、精神疾患の病因解明の手段として遺伝学的研究が歴史的に数多くなされてきた。近年は、ゲノムワイド関連解析や次世代シーケンサーといった遺伝学的技術の発展により網羅的な解析が可能になり、様々なリスク遺伝子の候補が同定されている。中でも、孤発性の罹患者と非罹患者両親の3名（トリオ）を比較し、罹患者における新生突然変異を検出するトリオ解析が盛んに行われている。統合失調症のトリオ解析では、シナプス関連遺伝子の変異が多く検出され、病因・病態に関連しているものと考えられる。新生突然変異として検出された変異には、細胞ごとにモザイクに存在する変異も含まれており、罹患者の発生過程において生じた体細胞変異と考えられる。特に脳神経組織にも存在する体細胞変異は、脳神経組織の機能に影響を与えると予想され、精神疾患の病因・病態に関連する可能性が想定できる。したがって、脳神経組織の体細胞変異は、生殖系列ゲノムを補完する形で精神疾患の病因・病態を説明する可能性が考えられる。

現在までに、大脳皮質形成異常や皮質形成異常を伴うてんかんにおいて、*MTOR*などの体細胞変異が罹患者脳部位で検出されており、脳奇形を伴う疾患と体細胞変異との有力な関連が報告されている。レット症候群や統合失調症患者などにおいては、レトロトランスポゾン LINE1 (Long Interspersed nuclear element 1) のコピー数上昇が患者死後脳で報告されるなど、解剖学的特徴を伴わない精神神経疾患においても体細胞変異が病因に関与している例が報告されている。また、二重皮質症候群などでは、血液試料において有力な関連候補遺伝子上の体細胞変異が検出されており、脳神経系で存在する体細胞変異が血液試料でも検出される可能性が示唆されている。

これまでの脳神経疾患に対する体細胞変異解析の報告では、候補遺伝子に限定した解析が主体であった。しかし、統合失調症をはじめとした多くの精神疾患では有力な候補遺伝子が明確ではなく、網羅的な解析を行う必要がある。以上のような背景から本研究では、体細胞一塩基変異を全ゲノムスケールで解析する方法の確立及び、健常者由来脳神経組織における生理的な体細胞変異の検出、統合失調症圏患者血液試料を用いた体細胞一塩基変異の検出を試みた。

脳試料を用いた解析では、3名の健常男性由来の1) 前頭葉と肝臓、2) 前頭葉神経細胞・非神経細胞と肝臓、3) 前頭葉と小脳の3種類の死後組織セットを用いた。これらの試料からゲノムDNAを抽出後、理論的深さ100前後の全ゲノムシーケンシングを行い、体細胞変異検出ソフトウェアである *MuTect*, *Strelka* にて組織間比較することで、体細胞一塩基変異候補を検出した。シーケンスクオリティに応じてアラインメントデータに対する適切な閾値

でのクオリティコントロールを行い、体細胞変異候補に対してもベースクオリティ、深度、ゲノム上の他領域における相同配列の有無など様々な観点からフィルタリングを行い、偽陽性・偽陰性の防止に努めた。検出した体細胞変異候補は、深度 20 万前後のターゲットアンプリコンシーケンスを行い、アレル割合を計算した。ターゲットアンプリコンシーケンスによるアレル割合の計算は、2%前後の定量性に課題はあるものの、体細胞変異をシミュレートした試料において理論的アレル割合と実験上のアレル割合は高い相関を示し、脳神経組織試料で確認した体細胞変異のアレル割合も高い再現性を認めた。同手法により、前頭葉・肝臓のセットで 6 カ所、神経細胞・非神経細胞・肝臓のセットで 12 カ所、前頭葉・小脳のセットで 13 カ所の体細胞変異（計 31 カ所）を同定することができた。脳神経組織のアレル割合は 0.7~14%で分布し、組織特異的な体細胞変異も検出することができた。

確認された体細胞変異候補は、アレル割合の高い順に発生過程で変異が生じたものと推定される。また、脳や神経細胞・非神経細胞で特徴的に認められた体細胞変異は、外胚葉と内胚葉の分化後に生じた体細胞変異である可能性が高い。本研究では、脳部位（前頭葉・小脳）や細胞腫（神経細胞・非神経細胞）間で比較を行うことにより、脳部位や細胞種ごとに体細胞変異のサイトや割合が異なることを明らかにした。また、前頭葉・小脳の比較では、各部位で特徴的に検出された体細胞変異が 1 カ所ずつ存在し、いずれも発達過程で、脳部位が別れた後に生じたものと考えられる。31 ヶ所の体細胞変異は、シトシンからチミンへの変化が 3 分の 2 を占めた。神経細胞関連遺伝子が多く検出され、脳神経組織の発生過程で神経細胞関連遺伝子群に体細胞変異が生じやすいという可能性を示唆する結果となった。

脳部位や細胞種ごとに精神・神経機能への寄与が異なることから、同じ遺伝子の体細胞変異でも、生じる脳部位や細胞種やアレル割合ごとにフェノタイプが異なると想定される。これは、精神・神経疾患の多様性を説明する有力な仮説として考えられるであろう。今後は脳神経組織における体細胞変異のメカニズム、精神疾患患者における脳組織での体細胞変異のパターンと疾患との関連、因果関係を明らかにしていく必要があると考える。

脳神経組織における解析に加え、一卵性双生児血液細胞ゲノム間の比較による体細胞一塩基変異の同定も試みた。一卵性双生児は、受精卵時点でのゲノムは同一であるが、発生過程で生じる体細胞変異のパターンは異なると予想される。現在までに 1 組の健常一卵性双生児由来血液試料の全ゲノムシーケンスを比較することで体細胞変異候補を検出し、サンガー法のクロマトグラムから体細胞変異の確認を行った先行研究がある。本研究では、統合失調症圏一卵性双生児不一致例由来試料を対象とし、より定量的な方法で体細胞変異の確認を行った。

統合失調症圏の精神疾患について不一致の一卵性双生児 5 組から提供された血液試料を用い、血液細胞由来ゲノム DNA に対して、高深度の全ゲノムシーケンスまたは全エクソームシーケンスを行った。前述と同様の方法にてアラインメントデータを比較することで、体細胞変異候補を検出した。体細胞変異候補は、深度 20 万前後のターゲットアンプリ

コンシークエンスにてアレル割合を計算し、パイロシークエンスにて更なる確認実験を行った。妄想性障害について不一致な 1 組から、ターゲットアンプリコンシークエンスにて体細胞変異を 7 ヶ所確認し、うち 4 ヶ所はパイロシークエンスでも存在を確認した。妄想性障害罹患患者において、*ABCC9* 上の体細胞一塩基変異（ミスセンス変異）がパイロシークエンスでも確認され、ターゲットアンプリコンシークエンスでのアレル割合は 7.32%であった。

一卵性双生児の解析から検出された体細胞変異は、血液試料から疾患関連体細胞変異を検出した先行研究に報告されているアレル割合と同様の範囲であった。特に *ABCC9* 上の体細胞変異は 7.32%と高い割合を示し、発生の初期で生じた体細胞変異であり、脳神経系にも同様に存在する可能性が考えられる。一方で、クローナルに増殖した血液幹細胞で生じた体細胞変異を検出した可能性も考えられる。体細胞変異は 60 歳という解析例の中では最も高齢のペアでのみ検出されており、後者の可能性も否定しがたい。妄想性障害と *ABCC9* 上体細胞変異との関連可能性が示唆されたものの、1 組のみからの検出であり、疾患との直接的な因果関係は本研究からは検討することができない。今後様々な年齢層での精神疾患不一致例、健常双生児における同様の解析を行っていく必要がある。

体細胞変異として一塩基変異に加え、脳に特徴的と報告されているレトロトランスポゾンの新規挿入位置同定法の開発も進めた。レトロトランスポゾンの中でも、転移活性の高い *LINE1* に注目し、*LINE1* 配列の中でも唯一自律的な転移活性を持つとされている *L1Hs* 配列に特異的なプライマーを片側に用いることで *L1Hs* 及びその転移後の配列を含む領域を増幅・配列決定する既存の方法 (*L1Hs-seq*) を改良し、健常者死後脳での探索を行なった。

L1Hs 配列を含む人工配列を挿入したプラスミドをヒトゲノム DNA と混合し、アレル割合 0.1~10%のレトロトランスポジションをシミュレートし、改良型 *L1Hs-seq* を行った。リファレンスゲノムに存在する対象 *L1Hs* に対して、緩い閾値設定では 97.4%、厳しい閾値設定では 83.9%と高い感度を示し、アレル割合 1%前後の体細胞変異をシミュレートした人工配列の検出能力を示すことができた。同時に、健常者死後脳でリファレンスにない *LINE1* の挿入位置を 150 個超、一塩基レベルで検出することができ、体細胞で新規挿入された *LINE1* の検出が期待できる結果となった。今回開発した改良型 *L1Hs-seq* を患者試料に適用することで、*LINE1* 新規挿入位置を一塩基レベルで決定し、精神疾患との関連を詳しく解析することができると期待される。

以上、体細胞一塩基変異を網羅的に検出する方法を開発し、健常者ヒト脳神経組織において脳部位・細胞種に特徴的な体細胞一塩基変異のパターンを見出し、精神疾患について不一致な一卵性双生児血液試料における体細胞一塩基変異を検出した。また、*LINE1* 挿入位置の網羅的な検出方法の開発を行った。今後は、脳神経組織試料を含め、精神疾患患者由来試料に対して体細胞変異の解析を大規模に行っていくことが、精神疾患発症メカニズム解明に有用であると考えられる。