

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：13101
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2016～2019
課題番号：15KK0339
研究課題名（和文）自閉症多発罹患家系の全エクソン解析に基づくリスク変異の同定（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Identification of risk variants based on whole-exome analysis of autism multiplex family(Fostering Joint International Research)

研究代表者
江川 純（Egawa, Jun）

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：80648527
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円
渡航期間： 17ヶ月

研究成果の概要（和文）：全エクソン解析などの網羅的な遺伝子解析により有力な自閉症リスク遺伝子は多数同定されており、個々のリスク遺伝子の機能解析は進んできているが、膨大な数のリスク遺伝子が描く病態の全体像が見えてこない。その主な理由は自閉症患者群の遺伝子レベルの生物学的不均一性にあると考えられる。本研究では、自閉症リスク遺伝子群の網羅的操作を行い、形態マルチパラメータを指標として、同様の变化を示す遺伝子群を類型化するという細胞レベルの網羅的解析を可能とするためにその実験系の確立を目指すものである。そのために必要な長期培養された細胞のシナプス数をHigh Content Screening機器で計測する実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症に罹患することは社会的不適応につながり、虐待・いじめ・ひきこもりなどの多様な社会問題に影響しているため、その病態解明は急務と言える。自閉症の病態解明が進まない最も大きな原因である自閉症患者群の遺伝子的背景の不均一性を解消する細胞レベルの網羅的解析を可能にする実験系の確立したことにより本研究の意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A huge number of Autism risk genes have been identified by comprehensive gene analysis such as all-exome analysis, and functional analysis of individual risk genes has been advanced. However, the whole picture of the pathological condition drawn by a huge number of Autism risk genes is elusive. The main reason seems to be the genetic heterogeneity of Autism patients. This study aimed to establish an experimental system for comprehensive analysis at the cell level. Therefore, we established an experimental system to measure the number of synapses of long-term cultured cells counted with a High Content Screening machine.

研究分野：発達精神医学

キーワード：自閉症 High Content Screening 培養神経細胞 Kinase inhibitor

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (autism spectrum disorder: ASD) は、有病率が 2% 前後 (Baron-Cohen et al., 2009; Kim et al., 2011) と比較的頻度が高く、幼児期より症状が明らかになる神経発達障害である。その社会的コミュニケーションの困難さより学校などで早期から社会的不適応につながり、虐待・いじめ・ひきこもりなどの多様な社会問題に影響しているため、その病態解明は急務と言える。この 20 年の間に、ゲノムワイド関連解析や全エクソーム解析など仮説を置かないバイアスを極力排除した遺伝子レベルの網羅的探索により再現性のある ASD リスク遺伝子が数多く報告されてきた (Vorstman et al., Nat Rev Genet, 2017)。それらの疾患リスク遺伝子の一つ一つは ASD と診断される集団のごく一部の病態を説明するに過ぎないが、それは ASD と診断される集団の遺伝子的背景が不均一であることを意味する。これまでに脆弱 X 症候群 (FMR1 遺伝子) に対する Arbaclofen (GABAB 受容体アゴニスト)、レット症候群 (MECP2 遺伝子) に対するインスリン様成長因子 1 (IGF-1)、結節性硬化症 (TSC1 もしくは 2 遺伝子) に対する Rapamycin など ASD 症状を示す単一遺伝子疾患のモデルマウスにおいて効果が示された治療薬が、遺伝子的背景が不均一な ASD 患者集団を対象とした臨床試験において結果が芳しくないのも不思議ではない (Jacquemont et al, Psychopharmacology, 2014; Castro et al, PNAS, 2014)。

2. 研究の目的

これまで行われてきた分子遺伝研究から 1,000 種類以上の ASD リスク遺伝子が報告されているが (Vorstman et al., 2017 Nat Rev Genet)、我々も ASD 複数罹患者系の全エクソーム解析により複数の ASD 候補リスク遺伝子を同定してきた (Egawa et al., Plos One, 2015; Inoue et al., Plos one, 2015; Egawa et al., Psychiatry Res, 2015; Egawa et al., Psychiatry Clin Neurosci, 2015)。これらの分子遺伝研究の知見をもとに、個々のリスク遺伝子の機能解析は進んできているが、膨大な数のリスク遺伝子が描く ASD 病態の全体像が見えてこないため、未だ生物学的治療の目途は立っていない。これまでに、症候性 ASD リスク遺伝子の動物実験で有効性が示された Rapamycin や IGF-1 などの臨床試験が行われてきたが望ましい結果は得られていない (Jacquemont et al, Psychopharmacology, 2014; Castro et al, PNAS, 2014)。その主な理由は ASD 患者群の遺伝子レベルの生物学的不均一性にあると考えられる。そのため本研究で次に述べる実験を可能にする実験系の確立を目指した。培養神経細胞において ASD リスク遺伝子群の操作 (過剰発現もしくは発現抑制) を網羅的に行い、形態マルチパラメータ (神経細胞数、神経突起数・長・分岐数、シナプス数) を指標として、同様のパターンを示す遺伝子群を類型化し、パスウェイ解析を行う。次に、類型化した遺伝子群ごとに形態パラメータに最も影響が強かった遺伝子をそれぞれ選出し、その変異を導入した共培養系に対して、4 億種類以上の化合物の効果を調べることのできる混合物ベースおよび共通構造ランキングアプローチを用いて (Al-Ali et al., ACS Med Chem Lett, 2018)、遺伝子変異導入による影響を改善する化合物を特定する。このバイアスを極力排除した網羅的解析により、それぞれの遺伝子群に共通の分子シグナルパスウェイおよびそれらに作用する候補治療薬の特定することができる。

本研究ではマルチパラメータ解析のうち長期培養されたシナプス数を自動形態計測装置 (High Content Screening 機器) で計測する実験系は確立していないため、その実験系の確立のために長期培養 (2 週間) した神経細胞に、先行研究で神経精神疾患およびシナプス形成に影響すると考えられている Kinase の阻害剤を添加してコントロールと差が検出できるかを検証した。

3. 研究の方法

妊娠 18 週のラットの胎仔より海馬を摘出して、96 ウェルプレート上 (9,000cell/well) で培養した。1 週間培養後、シナプス発達および神経精神疾患に関連が報告されている Kinase (TAOK2i, TNIKi, CDKL5i, LRRKi, GAKi, AKTi, RO48) に注目し (Crino, 2015; Duchon and Herault, 2016; Baltussen et al., 2018)、それらの同一の Kinase に複数の inhibitor 候補がある LRRK2i (LRRK2-IN-1, JH-II-127, MLI-2, GSK2578215A の 4 種類) はそれらも添加した (表 1)。これらの化合物は 20, 5, 1.25, 0.3125mM を添加後にさらに 1 週間培養し固定した。その後、プレシナプスマーカーに抗 Synaptophysin1 抗体、ポストシナプスマーカーに抗 SHANK2 抗体を用いてシナプスを染色した。High Content Screening (HCS) 機器 (ThermoFisher Cellomics ArrayScan VTI) を用いてプレシナプスとポストシナプスのシグナルが重なり合った点の数をカウントして、それを神経細胞数 (DAPI で染色カウント) で割った値をシナプス数の指標とした (図 1)。

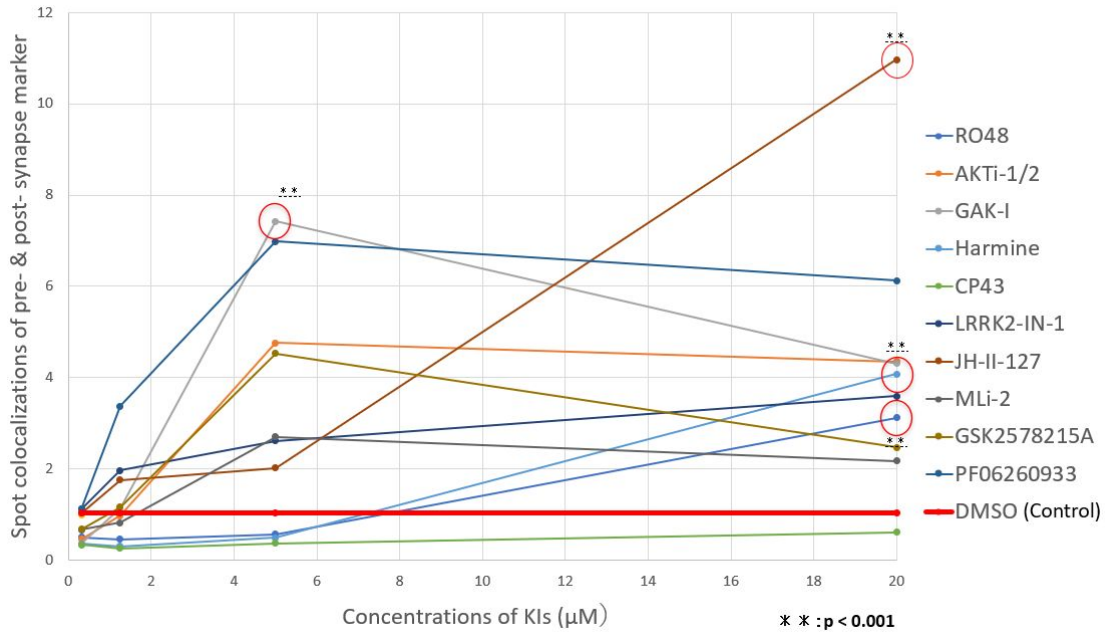
表1. 培養神経細胞のシナプス形成に影響を及ぼす Kinase Inhibitors の探索

Kinase	Kinase inhibitor	Reference
TAOK2	CP43	-
AKT	AKTi-1/2	Zhang et al., 2016
DYRK1A	Harmine	Haider et al., 2018
TNKi	PF 06260933 dihydrochloride	Roth et al., 2015
LRRK2	LRRK2-IN-1	Malik et al., 2017
	JH-II-127	Hatcher et al., 2015
	MLi-2	Scott et al., 2017
	GSK2578215A	Reith et al., 2012
GAK	SGC-GAK-1	Asquith et al., 2019

4. 研究成果

JH-II-27 (20 μ M)、SGC-GAK-I (5 μ M)、Harmin (20 μ M)、RO48 (20 μ M)が $p < 0.001$ の有意水準において DMSO 処理 (Control) と比較してシナプスシグナルの数が多かった (図 1)。

図1. Kinase inhibitorsの培養神経細胞におけるシナプス形成に及ぼす影響



パーキンソン病の原因遺伝子である LRRK および GAK に加え、ASD の有力なリスク遺伝子である DYRK1 (SFARI gene にて最もエビデンスが高い Category 1) の阻害剤が有意にシナプス形成を促進していたことは興味深い。また、本研究によりシナプス数を指標とした HCS が可能であることを示唆できたため、このパラメータを形態マルチパラメータ (神経細胞数、神経突起数・長・分岐数、シナプス数) に加えたうえで、ASD リスク遺伝子群の操作 (過剰発現もしくは発現抑制) を加えた培養神経細胞の神経発達を計測することが可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kushima Itaru, Egawa Jun et al	4. 巻 24
2. 論文標題 Comparative Analyses of Copy-Number Variation in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Reveal Etiological Overlap and Biological Insights	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2838 ~ 2856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yu Yanjie, Egawa Jun et al	4. 巻 8
2. 論文標題 Rare loss of function mutations in N-methyl-d-aspartate glutamate receptors and their contributions to schizophrenia susceptibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 12-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-017-0061-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishizuka K, Fujita Y, Kawabata T, Kimura H, Iwayama Y, Inada T, Okahisa Y, Egawa J, Usami M, Kushima I, Uno Y, Okada T, Ikeda M, Aleksic B, Mori D, Someya To, Yoshikawa T, Iwata N, Nakamura H, Yamashita T, Ozaki N	4. 巻 7
2. 論文標題 Rare genetic variants in CX3CR1 and their contribution to the increased risk of schizophrenia and autism spectrum disorders	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 e1184 ~ e1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/tp.2017.173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Taketsugu, Akikawa Ryota, Kawasaki Keisuke, Egawa Jun, Minamimoto Takafumi, Kobayashi Kazuto, Kato Shigeki, Hori Yukiko, Nagai Yuji, Iijima Atsuhiko, Someya Toshiyuki, Hasegawa Isao	4. 巻 30
2. 論文標題 Macaques Exhibit Implicit Gaze Bias Anticipating Others' False-Belief-Driven Actions via Medial Prefrontal Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 4433 ~ 4444.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igeta Hirofumi, Watanabe Yuichiro, Morikawa Ryo, Ikeda Masashi, Otsuka Ikuo, Hoya Satoshi, Koizumi Masataka, Egawa Jun, Hishimoto Akitoyo, Iwata Nakao, Someya Toshiyuki	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 <p>Rare compound heterozygous missense SPATA7 variations and risk of schizophrenia; whole-exome sequencing in a consanguineous family with affected siblings, follow-up sequencing and a case-control study</p>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychiatric Disease and Treatment	6. 最初と最後の頁 2353 ~ 2363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S218773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Motegi Takaharu, Fukui Naoki, Hashijiri Koyo, Tsuboya Ryusuke, Sugai Takuro, Egawa Jun, Mitome Setsuko, Araki Rie, Haino Kazufumi, Yamaguchi Masayuki, Takakuwa Koichi, Enomoto Takayuki, Someya Toshiyuki	4. 巻 73
2. 論文標題 Identifying the factor structure of the Mother to Infant Bonding Scale for post partum women and examining its consistency during pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 661 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 江川純, 五十嵐道弘, 染矢俊幸
2. 発表標題 自閉症リスク遺伝子NeuroLigin3の機能的リン酸化部位の機能解析
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江川純, 杉本篤言, 吉永清宏, 林剛丞, 染矢俊幸
2. 発表標題 拡散テンソル画像を用いた脳機能結合と自閉スペクトラム症との関連解析
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugimoto A, Suzuki Y, Yoshinaga K, Orime N, Hayashi T, Egawa J, Ono S, Sugai T, Someya T
2. 発表標題 Relationship between prefrontal cortex activity during task execution and ADHD symptoms of adult patients, and their changes by atomoxetine.
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hoya S, Igeta H, Watanabe Y, Nunokawa A, Inoue E, Shibuya M, Egawa J, Someya T:
2. 発表標題 Resequencing of the SETD1A gene in Japanese patients with schizophrenia
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akikawa R, Hayashi T, Kawasaki K, Egawa J, Minamimoto T, Kobayashi K, Kato S, Hori Y, Nagai Y, Iijima A, Someya T, Hasegawa I
2. 発表標題 Neural activity in the macaque medial prefrontal cortex plays a causal role in false-belief attribution.
3. 学会等名 49th Annual Meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	レモン ヴァンス (Lemmon Vance)	マイアミ大学・神経外科学・教授	