

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12277

研究課題名（和文）化学物質による自閉症発症のリスク評価：SHANK3のエピジェネティック変異解析

研究課題名（英文）Risk assessment of chemical-induced autism: epigenetic mutation analysis of SHANK3

研究代表者

新井 良和（ARAI, YOSHIKAZU）

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：90614769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：自閉症は子どもで増加する遺伝性の神経疾患である。しかし、遺伝子変異のみでは疾患発症を説明できず、環境要因との相互作用が懸念されている。本研究では環境要因として妊娠期の母体環境中に存在する化学物質に着目し、神経分化への影響を検証した。自閉症の原因遺伝子であるSHANK3にヘテロ接合型変異を加えたヒトiPS細胞では、神経細胞への分化能が低下した。さらに、5種類の化学物質（DEP、コチニン、S-421、Hg、Se）の複合暴露は、SHANK3ヘテロ欠損iPS細胞由来の神経細胞のさらなる分化能低下を引き起こした。このことは、環境要因と遺伝子変異の相互作用は、神経分化異常をさらに促進させることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症を含めた神経疾患は、遺伝子変異による遺伝的要因と、化学物質などの環境要因との相互作用で発症すると考えられている。しかし、これらの相互作用に着目した研究は依然として少ないのが現状である。本研究では、自閉症の原因遺伝子の1つであるSHANK3のヘテロ欠損ヒトiPS細胞を樹立し、環境要因として胎児期に晒される危険性のある有害な化学物質に着目した。解析の結果、遺伝的要因と環境要因の相互作用は神経細胞分化に影響し、さらなる神経分化異常を引き起こすことが示された。本研究は遺伝的要因と環境要因との相互作用を検証した新たな取り組みであり、自閉症を含めた神経疾患の発症機序の解明に繋がることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Autism is an inherited neurological disorder that has been increasing in children in recent years. However, genetic mutations alone cannot explain the disease onset, and there is concern about interactions with environmental factor(s). In this study, we focused on chemicals present in the maternal environment during pregnancy as environmental factors and examined their effects on neuronal differentiation. Human iPS cells with a heterozygous mutation in SHANK3, one of the genes responsible for autism, showed decreased ability to differentiate into neurons. Furthermore, combined exposure to five chemicals (DEP, cotinine, S-421, Hg, and Se) at maternal serum concentrations caused a further reduction in the differentiation potential of neurons derived from SHANK3 heterozygous deficient iPS cells. This suggests that environmental factors may further promote abnormal neuronal differentiation through interactions with genetic mutations.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス 環境化学物質 自閉症 DNAメチル化 ヒトiPS細胞 SHANK3

1. 研究開始当初の背景

自閉症は脳神経回路やシナプスの形成異常など、神経細胞の分化・機能異常によって生じる神経疾患である。先進国での自閉症の有病率は1%以上と言われ、子どものコミュニケーション障害が大きな社会問題となっている。一卵性双生児での自閉症の高い共発症率(36-95%)から、自閉症は先天性の遺伝病と考えられている。しかし、一卵性双生児であっても発症の有無や重篤度に個人差がある。また、これまでに数百におよぶ自閉症関連遺伝子が報告され、その複雑な遺伝子変異の組み合わせが、疾患発症の理解や有効な治療・診断法の確立を難しくしている。一方、近年、単一遺伝子変異による自閉症発症として、ヘテロ接合型の *SHANK3* 遺伝子変異が報告された。*SHANK3* は神経細胞のシナプスで発現し、神経伝達等に関わる重要なタンパク質である。*SHANK3* にヘテロ接合型変異をもつ培養細胞を用いた解析で、変異のない染色体から産生される正常な *SHANK3* タンパク質がなんらかの原因で不足し、ある閾値を下回るとシナプスの形成・機能異常が生じることが示された。ただし、*SHANK3* にヘテロ欠損変異をもつ同一家族内においても、個々人で自閉症発症の有無が異なることが知られている。つまり、*SHANK3* においても、遺伝子変異のみでは自閉症の多様な疾患症状を説明できず、遺伝子変異とともに何が“引き金”となって神経分化異常を引き起こすのか、その分子メカニズムは不明である。

近年、自閉症は遺伝子変異とともに、環境要因との相互作用で発症することが報告されている。また、自閉症は主に子どもの早期発達段階から発症するが、胎児期や出生直後は神経細胞の増殖が盛んであるため、環境要因として妊娠期の母体環境中に存在する有害な化学物質の影響が懸念されている。事実、妊娠中に高濃度の農薬に晒されたり、喫煙歴のある妊婦の子どもは自閉症の発症リスクが増加する。つまり、母体環境中の化学物質が自閉症発症の引き金になる危険性は極めて高く、その作用メカニズムの解明は自閉症を理解する鍵であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠期の母体環境中から検出される化学物質が胎児の神経細胞分化に影響し、将来の自閉症発症に関与する、という仮説のもと、*SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞の神経分化系を用いて、遺伝子変異と化学物質の相互作用による神経分化異常を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト *SHANK3* 遺伝子の DNA メチル化、遺伝子発現解析

ヒト *SHANK3* の遺伝子発現制御を明らかにするために、*SHANK3* 上流域の DNA メチル化に着目した。まず、DNA メチル化解析のために、iPS 細胞の元となった体細胞、iPS 細胞から分化誘導させた神経幹細胞、さらに分化させた神経細胞のゲノム DNA を抽出し、DNA にバイサルファイト反応を施した。得られたバイサルファイト反応済み DNA をもとに目的領域を PCR で増幅し、PCR 産物のクローニングを行ったのち、DNA メチル化状況をバイサルファイトシーケンシング法で解析した。遺伝子発現解析については、体細胞、および神経幹細胞より RNA を抽出して cDNA を合成した。*SHANK3*、およびコントロールとして *GAPDH* の PCR プライマーを用いて、得られた cDNA をもとに RT-PCR によって遺伝子発現状況を解析した。

(2) ゲノム編集を用いた *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞株の樹立

SHANK3 ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞を作製するために、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集を行った。*SHANK3* の遺伝子変異による自閉症の中で、多く変異が確認されている *SHANK3* のエクソン 22 に gRNA を設計し、遺伝子導入装置(Neon, Thermo Fisher Scientific)を用いて gRNA、および Cas9 タンパク質をヒト iPS 細胞に導入した。細胞をシングルセルクローニングによって単離し、遺伝子変異についてはゲノムシーケンシングによる配列解読で確認した。また、得られた *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞について、未分化幹細胞マーカーである OCT4、SSEA4、および TRA1-60 抗体を用いた免疫染色で、iPS 細胞の未分化状態を検証した。

(3) *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞の神経分化能評価

SHANK3 ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞の神経幹細胞、および神経細胞への分化能を解析した。未分化状態で培養した iPS 細胞について、神経幹細胞培地(PSC Neural Induction medium, Thermo Fisher Scientific)で計 12 日間培養した。その後、細胞を培養皿より剥がし、神経分化培地に再懸濁して播種し、計 14 日間の神経分化培養を行った。また、神経幹細胞、および神経細胞への分化能については、神経幹細胞、および神経細胞マーカーである NES、および III-tubulin 抗体を用いた免疫染色で解析した。III-tubulin の染色画像については、サンプルごとに 10 視野の画像を取得し、抗体陽性となる神経繊維の面積を ImageJ で測定し、*SHANK3* の遺伝子変異に伴う

神経細胞分化への影響を検証した。

(4) SHANK3ヘテロ欠損ヒトiPS細胞への化学物質暴露

遺伝子変異による遺伝的要因と、環境化学物質による環境要因との相互作用が神経分化におよぼす影響を検証するために、樹立したSHANK3ヘテロ欠損ヒトiPS細胞の神経分化系に化学物質を暴露した。環境化学物質として、妊婦の母体・臍帯血清中から検出される有害な化学物質の中で、先の報告でヒトiPS細胞のエピジェネティック状況を変化させることが示された5種類の化学物質(DEP、コチニン、S-421、Hg、Se)を用いた。これら5種類の化学物質をそれぞれ血清中濃度を基準に混合し、神経幹細胞への分化過程で4日間の複合暴露を行った。その後、化学物質を除いて神経細胞へ分化誘導させて、分化14日目に抗III-tubulin抗体を用いた免疫染色で神経細胞への分化能を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒトSHANK3上流域におけるDNAメチル化可変領域の同定

環境化学物質がエピジェネティック変異原(エピ変異原)として作用し、神経細胞分化異常に伴う自閉症発症への関与を検証するために、まず始めに自閉症発症との関連性が報告されている、SHANK3の遺伝子発現調節機構について解析した。体細胞、およびiPS細胞から分化誘導させた神経幹細胞で解析した結果、体細胞でのSHANK3発現量は極めて低く、神経幹細胞への分化に伴い発現量は有意に増加した(図1A)。次に、SHANK3遺伝子へのDNAメチル化制御の関与を検証するために、DNAメチル化酵素阻害剤である5-aza-dc処理による発現量変化を解析した。神経幹細胞に5-aza-dcを各濃度(0, 1, 5 μM)で暴露してSHANK3遺伝子発現量を解析した結果、5-aza-dc濃度依存的に発現量は有意に増加した(図1B)。このことは、SHANK3遺伝子発現がDNAメチル化によって調節されることを示唆する。さらに、SHANK3上流域におけるDNAメチル化状況をパイサルファイトシーケンス法で解析した。体細胞、iPS細胞では中程度のメチル化状況を示したが(44.9%, 42.3%)、一方で、神経幹細胞、神経細胞では高度にメチル化にされており(84.6%, 83.3%)、SHANK3のDNAメチル化可変領域が明らかとなった(図1C)。発現量が高いと考えられる神経幹細胞や神経細胞では高メチル化状況であったことから、本研究で明らかとなったDNAメチル化可変領域は、SHANK3の発現抑制に関わる因子の結合領域である可能性が考えられる。

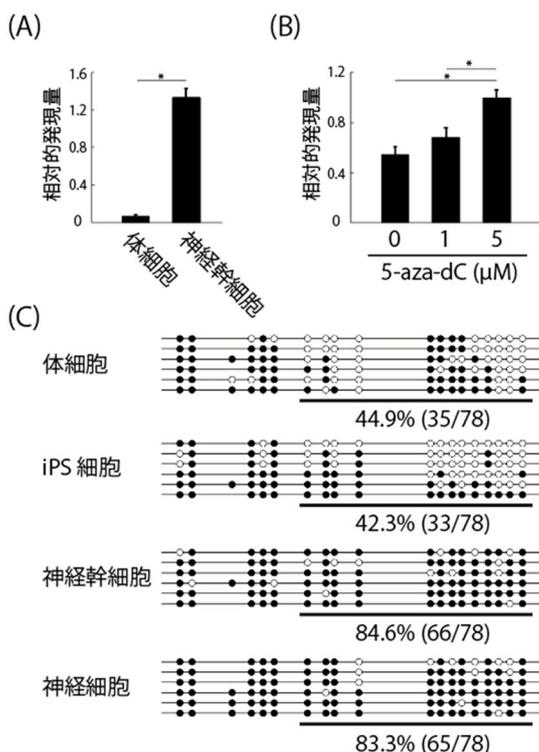


図1. SHANK3のDNAメチル化制御
 (A) RT-PCRによるSHANK3の遺伝子発現解析。*, $p < 0.05$
 (B) 神経幹細胞への5-aza-dc処理によるSHANK3遺伝子発現変化
 (C) SHANK3上流域におけるパイサルファイトシーケンスによるDNAメチル化解析。黒丸はメチル化、白丸は非メチル化 CpG

(2) SHANK3ヘテロ欠損ヒトiPS細胞株の樹立

自閉症における神経分化異常について、遺伝的要因、および環境要因による相互作用を検証するために、遺伝的要因としてSHANK3にヘテロ接合型変異をもつヒトiPS細胞株の樹立を試みた。SHANK3のエクソン22にゲノム編集用のgRNAを設計し、CRISPR/Cas9による遺伝子改変を行った。ゲノム編集後のシングルセルクローニングによって、片方の遺伝子にのみ8塩基の欠損をもち、転写されるRNAはフレームシフト変異によって分解されるSHANK3ヘテロ欠損ヒトiPS細胞株が得られた(図2A)。樹立したSHANK3ヘテロ欠損ヒトiPS細胞は、変異のない野生型iPS細胞株と同様に、未分化iPS細胞マーカーであるOCT4、SSEA4、TRA1-60を発現しており、iPS細胞の未分化性が確認できた(図2B)。また、未分化SHANK3ヘテロ欠損iPS細胞を神経幹細胞へ分化誘導させた結果、野生型と同様に神経幹細胞マーカーであるNESを発現しており(図2C)、野生型との間に増殖能や形態的な違いも認められなかった。続いて、SHANK3の発現量を解析した結果、SHANK3ヘテロ欠損iPS細胞株に由来する神経幹細胞は野生型由来の細胞に比べて、SHANK3の発現量が約半分に低下していた(図2D)。以上より、片方の遺伝子が機能不全となった、SHANK3ヘテロ欠損ヒトiPS細胞株の樹立に成功した。

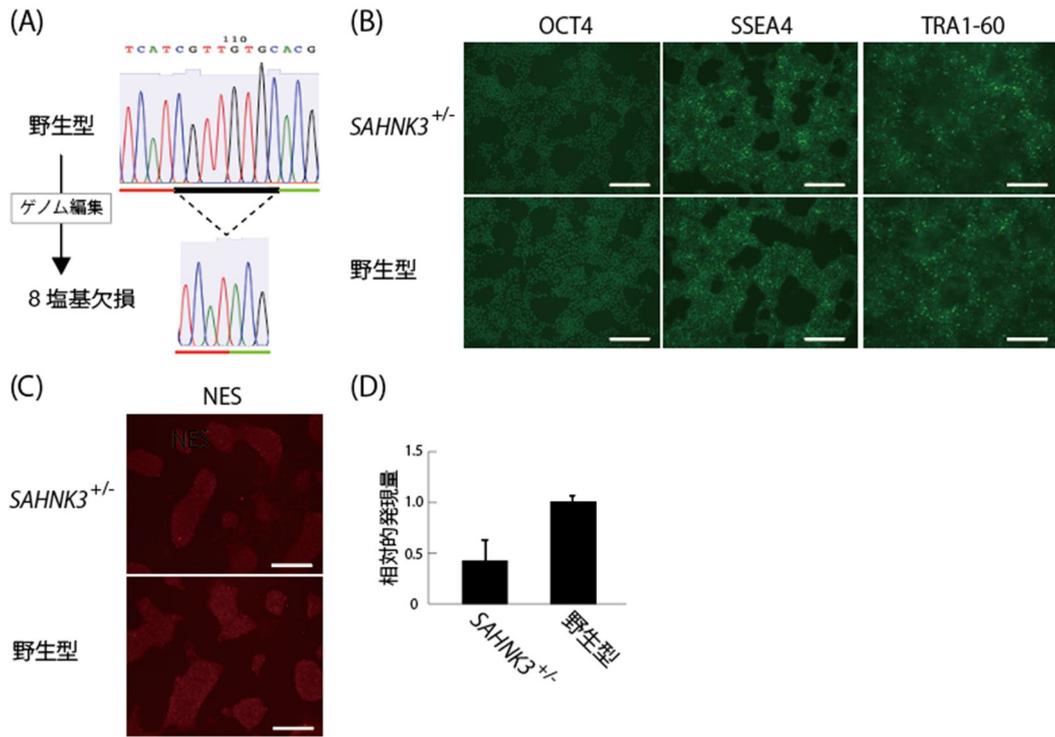


図 2. *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞の樹立
 (A) ゲノム編集によって *SHANK3* の片方のアリルの Ex 22 に 8 塩基の欠損が生じ、フレームシフト変異で RNA が分解されるヒト iPS 細胞株を樹立できた
 (B) *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞 (*SHANK3*^{+/-}) での免疫染色による幹細胞マーカー発現解析。スケールバー, 500 μm
 (C) *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞に由来する神経幹細胞での免疫染色によるマーカー (NES) 発現解析
 (D) *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞に由来する神経幹細胞での qPCR による *SHANK3* 発現解析

(3) *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞では神経分化能が低下する

SHANK3 ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞の神経細胞への分化能について、III-tubulin 抗体を用いた免疫染色で検証した。神経幹細胞を神経細胞へ分化誘導させた結果、野生型 iPS 細胞由来の神経幹細胞に比べて *SHANK3* ヘテロ欠損細胞では、III-tubulin 陽性となる神経繊維の面積が有意に減少した。このことは、*SHANK3* 遺伝子のヘテロ接合型変異は、神経細胞への分化能を低下させることを示すものである。

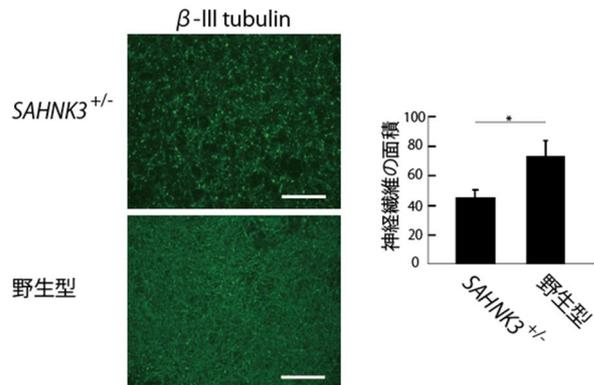


図 3. *SHANK3* 遺伝子変異による神経細胞分化への影響評価
SHANK3 ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞由来の神経細胞における分化能評価
 ImageJ で βIII-tubulin 陽性の神経繊維の面積を測定した。
 スケールバー, 500 μm; *, p < 0.05

(4) 環境化学物質は *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞の神経分化能の低下を助長する

続いて、遺伝的要因と環境要因の相互作用による神経細胞分化への影響を検証した。先の研究でエピ変異原として同定された 5 種類の化学物質 (DEP、コチニン、S-421、Hg、Se) を母体・臍帯血清中濃度を基準に、*SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞に複合暴露した。化学物質が暴露された神経幹細胞と、化学物質の溶媒が暴露された対象群の神経幹細胞は、共に神経幹細胞マーカーである NES を発現しており、化学物質暴露による神経幹細胞の未分化性への影響は認められなかった (図 4A)。神経幹細胞への暴露 4 日目に化学物質を除去して、その後神経細胞へ分化誘導させた結果、対象群に比べて化学物質暴露の神経細胞では、III-tubulin 陽性となる神経繊維の面積が有意に減少した。このことは、遺伝的要因と環境要因の相互作用は神経細胞分化への影響を助長し、神経分化能のさらなる低下を引き起こすことを示唆する。

自閉症を含めた神経疾患は、遺伝子変異による遺伝的要因と、化学物質などの環境要因との相互作用で発症すると考えられている。しかし、これらの相互作用に着目した研究は進んでおらず、神経疾患の多くはその発症機序が不明である。本研究では、自閉症の原因遺伝子の 1 つである *SHANK3* のヘテロ欠損ヒト iPS 細胞を樹立し、環境要因として胎児期に母体環境中で晒される危険性のある有害な化学物質に着目した。神経細胞への分化系を用いた解析によって、遺伝的要因と環境要因の相互作用は神経分化への影響を助長し、さらなる神経分化異常を引き起こすことが示された。さらに、本研究より *SHANK3* 遺伝子上流域に DNA メチル化可変領域を発見し、

このことは *SHANK3* 遺伝子発現が DNA メチル化によって調節される可能性を示すものである。また、本研究に用いた 5 種類の化学物質は、先の研究でエピ変異原として同定されている。以上の結果より、化学物質が *SHANK3* 遺伝子の DNA メチル化制御を乱し、このことが引き金となって神経繊維の伸長低下といった神経分化異常を引き起こした可能性が考えられる。

本研究は体外でのヒト iPS 細胞の神経分化系を用いて、遺伝的要因と環境要因との相互作用を検証した新たな取り組みであり、これらの相互作用がさらなる神経分化異常を引き起こすことが示された。今後、神経細胞、および神経分化過程において、化学物質曝露による *SHANK3* の DNA メチル化にもとづく遺伝子発現制御への影響を検証することで、自閉症発症機序の理解が深まることが期待できる。

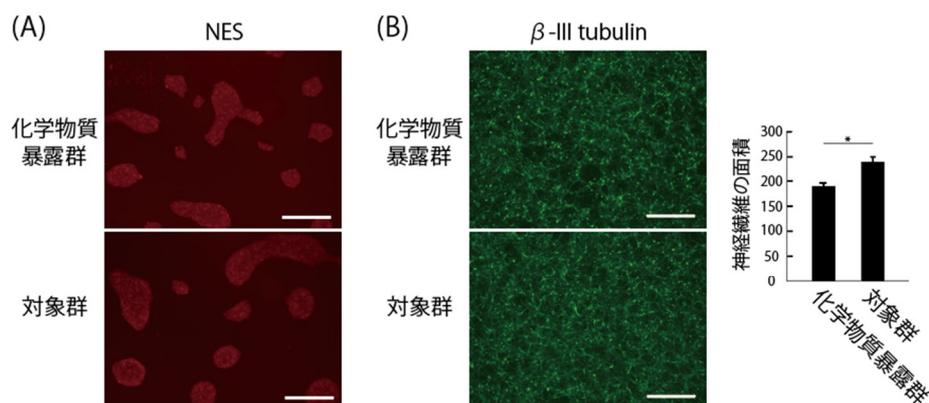


図 4. *SHANK3* ヘテロ欠損ヒト iPS 細胞由来の神経幹細胞への化学物質曝露による神経細胞分化への影響評価
 (A) *SHANK3* ヘテロ欠損 iPS 細胞に由来する神経幹細胞に 5 種類の化学物質 (DEP, コチニン, S-421, Hg, Se) を血清中濃度を基準に複合曝露して、神経幹細胞でのマーカー遺伝子 (NES) 発現を免疫染色で解析した
 (B) 化学物質、または対照として溶媒が曝露された *SHANK3* ヘテロ欠損 iPS 細胞由来の神経細胞について、ImageJ で β -III-tubulin 陽性の神経繊維の面積を測定した。スケールバー, 500 μ m; *, $p < 0.05$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arai Yoshikazu, Nishino Koichiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Epigenetic mutagen-like environmental chemicals alter neural differentiation of human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 571 ~ 583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.48.571	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------