

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月11日現在

自閉症の生物学的統合研究

Integrative Biology of Autism Spectrum Disorder

課題番号：16H06316

内匠 透 (TAKUMI, TORU)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー



研究の概要（4行以内）

自閉症は社会性の障害に代表される発達障害であるが、その病態解明は未だ断片的である。本研究では、細胞・シナプス、回路・行動、さらには環境要因レベルで、それぞれの最先端技術を導入した方法論を取り入れ多面的に解析するとともに、それらの結果を連関、統合する事により、複雑な自閉症の病態解明に迫る。

研究分野：基盤・社会脳科学

キーワード：自閉症、コピー数多型、細胞モデル、神経回路、脳腸連関

1. 研究開始当初の背景

先進国、とりわけ日本の現代社会の最大の問題は少子化である。子どもの健全な発達が必須の社会状況にもかかわらず、自閉症をはじめとする発達障害は増え続けている。我が国の自閉症研究は、これまで「障碍児にどのように立ち向かうか」という（教育）心理学的な研究が中心であった。一方、欧米特に米国においては、自閉症の生物学的研究が進み、今や自閉症研究は精神疾患研究をリードする分野となっている。

我々は、世界に先駆けて染色体工学的手法を用いて染色体異常を有するヒト型自閉症モデルマウスの開発に成功し、モデルマウスを用いた多面的解析を行ってきた。

2. 研究の目的

コピー数多型 (CNV, copy number variation) はゲノム上のキロベース (Kb) からメガベース (Mb) の長さの重複、欠失等を表すが、自閉症を含む精神疾患の他、癌等の様々な疾患の原因として知られようになった。研究の第1の方向性として、網羅的な臨床例をカバーする自閉症細胞モデルによる細胞・シナプスレベルの研究、第2に、回路遺伝学をはじめとする最新の脳科学技術を駆使したマウスの回路・行動レベルの研究、第3に自閉症患者では胃腸障害が頻繁にみられるという観点から腸内細菌叢（フローラ）を含む脳腸連関に注目した環境要因レベルの研究を考案した。

すなわち、本研究では、A [細胞・シナプス]

我々が独自に開発した次世代染色体工学を用いて、これまで臨床報告された自閉症 CNV の網羅的胚性幹 (ES, embryonic stem) 細胞モデル (自閉症細胞モデル) を構築し、神経 (グリア) 細胞レベルでの表現型スクリーニングを行うとともに、トランスクリプトーム解析を行う。B [回路・行動] バーチャルリアリティ (VR) システムを利用した社会性相互作用の神経活動の解析や *in vivo* 社会行動下での神経活動リアルタイムイメージング等、最新の脳科学的手法を用いて、マウスにおける社会性に関わる神経活動及びその回路の神経基盤を明らかにする。C [環境要因] 腸内フローラの解析等、脳発達障害における脳腸連関の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

A 細胞・シナプス： CNV の網羅的自閉症細胞モデルを用いて共通又は特異的表現型を明らかにする、B 回路・行動：*in vivo* 自由行動下での神経活動記録や VR システムを用いた社会性行動試験を通して社会性の神経回路基盤を明らかにする、C 環境要因：腸内フローラ及び自律神経を介する脳腸連関解明を通じて、個体として統合的に解釈する事で、自閉症の病態理解に迫る。

4. これまでの成果

A [細胞・シナプス] A-1) 自閉症 CNV データベースの構築：自閉症のゲノム解析で得られた論文、Web 情報から CNV を有する自閉

症例の網羅的データベースを構築した。A-2) 自閉症 CNV 細胞ライブラリーの構築: TALEN 及び CRISPR/Cas のゲノム編集技術を組み合わせて、「次世代」染色体工学を確立した。本法を用いて、ヒト CNV に相当するマウス CNV を有するマウス ES 細胞モデルを作製した。A-3) 細胞分化系の構築: ES 細胞から神経細胞への分化系を確立した。A-4) CNV ライブラリーの in vitro スクリーニング: 神経細胞に分化した後、様々な形態的パラメータ(樹状突起分枝数、同長さ、細胞体サイズ等)をとり、形態的变化を検討した。同時に Ca インドikator を利用した Ca シグナルを別のスクリーニング系の指標とした。A-5) CNV 細胞モデルのトランスクリプトーム解析: 代表的な 11 モデル及びコントロールのニューロン分化系細胞を用いて、シングルセル RNA-seq 法によるトランスクリプトーム解析を行った。バイオフィオマティクスを駆使して解析し、自閉症 CNV に共通の病態パスウェイを同定した。また細胞特異的解析から、抑制性神経における自閉症リスク遺伝子群のエンリッチメントを確認した。

B [回路・行動] B-1) in vivo 自由行動下での社会性行動の神経回路解析: 自由行動下での神経細胞レベルの神経活動の評価が可能である顕微内視鏡 (nVista) を用いた生体 Ca イメージング技術を行い、マウス大脳皮質島回での神経活動を観察した。島回の 500 以上の神経細胞の神経活動を観察したところ、10% 以上の細胞(社会性細胞)で、社会性行動の際、神経活動が上昇していた。続いて、これらの細胞が実際に、社会性行動に関与していることを確認するため、光遺伝学的手法にて、神経活動の変化による社会性行動の変化を確認した。光刺激により島回の神経細胞の活動を抑制することで、社会性行動の時間の減少がみられた。島回の神経活動は社会性行動に必須であることが示唆された。B-2) VR システムを用いた社会性行動の神経ネットワーク解析: VR システムは、頭部を固定したマウスをトラックボールの上に乗せ、ボールと VR 空間内の動きを連動させる事で、顕微鏡下でイメージング中の行動試験を可能にする。G-CaMP を発現するトランスジェニックマウス行動中の大脳皮質全体のマクロ Ca イメージングを行った。大脳皮質領域間の相関係数を計算し、グラフ理論を用いてノードマップを作製することにより、リアルタイムでマウス行動中の皮質ネットワーク動態の解析が可能な系を構築した。また、機械学習を用いて、

ネットワークパターンから行動を予測できることを明らかにした。

C [環境要因] (脳腸関連研究) C-1) 腸内フローラの解析: 自閉症モデルマウス (15q dup) の腸内フローラのメタゲノム解析から 15q dup マウスに特異的な菌種を同定した。また抗生物質(ネオマイシン)投与により、15q dup マウスの超音波蹄鳴異常の改善が見られた。投与前後のメタゲノム解析を行い、社会性行動に有益な菌を同定した。

5. 今後の計画

細胞モデルではヒト ES 細胞、そしてオルガノイドモデルへ展開して、機能的病態解析を行う。回路・行動レベルの解析では、視覚、嗅覚、触覚、聴覚といった各感覚を単独、もしくは組み合わせてマルチモーダルな感覚系と(社会性)行動との関係を解析できる系に発展させる。さらに、神経ネットワークとして同時に光制御できる系を構築する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

R. Furumai, K. Tamada, X. Liu and *T. Takumi: UBE3A regulates the transcription of IRF, an anti-viral immunity. *Hum. Mol. Genet.*, in press. (査読あり)

J. Myung, C. Schmal, S. Hong, Y. Tsukizawa, P. Rosa, Y. Zhang, M. J. Holtzman, E. De Schutter, H. Herzog, G. Boryugov and *T. Takumi: The choroid plexus is an important circadian clock component. *Nature Commun.*, 9, 1062, 2018. (査読あり)

*T. Takumi and K. Tamada: CNV biology in neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 48, 183-192, 2018. (査読あり)

N. Nakai, M. Nagano, F. Saitow, Y. Watanabe, Y. Kawamura, A. Kawamoto, K. Tamada, H. Mizuma, H. Onoe, Y. Watanabe, H. Monai, H. Hirase, J. Nakatani, H. Inagaki, T. Kawada, T. Miyazaki, M. Watanabe, Y. Sato, S. Okabe, K. Kitamura, M. Kano, K. Hashimoto, H. Suzuki and *T. Takumi: Serotonin rebalances cortical tuning and behavior linked autism symptoms in 15q11-13 CNV mice. *Science Adv.*, 3, e1603001, 2017. (査読あり)

M. Nakanishi, J. Nomura, X. Ji, K. Tamada, T. Arai, E. Takahashi, M. Bucan and *T. Takumi: Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism. *PLoS Genet.*, 13, e1006940, 2017. (査読あり)

T. Takumi: Behavioral neuroscience of autism, IBNS 2017, June 26-30, 2017, Hiroshima, Presidential lecture

内匠 透: 2017 年テルモ財団賞

7. ホームページ等

<https://www.facebook.com/takumilab/>