

平成 31 年 4 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09965

研究課題名(和文) 遺伝子発現制御ネットワークに着目したウィリアムス症候群の病態解明と治療への応用

研究課題名(英文) Integrative network analysis of Williams syndrome

研究代表者

木村 亮 (Kimura, Ryo)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20636641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ウィリアムス症候群の症状と遺伝子との関係を明らかにするため、患者家族会等の協力を得て集めた多数の血液検体を用いて、遺伝子の発現を網羅的に調べた。その結果、ウィリアムス症候群では欠失した遺伝子だけでなく、多数の遺伝子が発現変動していることが判明した。次に、類似した発現変化を示す遺伝子をグループ化して抽出する解析を実施し、複数の遺伝子群が症状と関連していることがわかった。とくにウィリアムス症候群と最も強い相関を示した遺伝子群は、欠失した遺伝子以外で構成され、免疫系と関連していた。さらに、このような大規模な遺伝子の発現変動が生じる要因の一つとしてマイクロRNAが関わっている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウィリアムス症候群では、7番染色体の片方にある約28個の遺伝子が失われていることが知られている。これまで、これら失われた遺伝子に着目した研究が進められてきましたが、症状と遺伝子との関係については十分に明らかになっていませんでした。

本研究では、多数のウィリアムス症候群の患者検体を用いて、大規模で網羅的遺伝子発現およびマイクロRNA解析を実施することで、失われた遺伝子以外の遺伝子やマイクロRNAが病態に関与しているということを初めて明らかにした。今後、病気に対するさらなる理解と将来的な治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)： Our results show that the upregulation of multiple co-expression modules containing genes located outside of the standard 7q11.23 deletion region may significantly contribute to the intermediate and highly variable Williams syndrome phenotypes. The effects of the glial cell activation-mediated mRNA/miRNA regulatory network provide novel insight into the biological mechanisms underlying Williams syndrome neuropsychiatric phenotypes. The downregulation of one miRNA module appears to have significant consequences on the transcriptome, leading to the upregulation of three mRNA modules, all of which include genes that are dispersed throughout the genome.

To our knowledge, this is the first time that the dysregulated mRNA and miRNA transcriptomic networks have been broadly evaluated in association with the complex phenotypes observed in Williams syndrome patients.

研究分野：精神医学、神経発達障害

キーワード：ウィリアムス症候群 7q11.23 トランスクリプトーム解析 マイクロRNA ネットワーク解析 自閉スペクトラム障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウィリアムス症候群 (WS) は、7 番染色体長腕 (7q11.23 領域) の片側にある約 28 個の遺伝子が欠失しており、発達や知的な遅れ、過度な社交性、心血管異常など多彩な症状が生じる疾患である。これまで、欠失領域内にある遺伝子について多くの研究が行われてきたが、症状と遺伝子との関係については十分解明されていない。我々はこれまでに少数検体を用いた研究で、WS では欠失している遺伝子だけでなく、他の領域の遺伝子も発現変動が顕著であることを見出した。この結果は、WS では遺伝子発現を制御しているネットワークが破綻している可能性を示唆しているのではないかと考えた。しかし、このようなゲノム全域に生じる遺伝子発現異常の原因や臨床症状との関係は明らかになっていない。

遺伝子の発現を調節する重要な因子の一つとして、マイクロ RNA (miRNA) が知られており、近年、精神神経疾患との関係が多数報告されている。1 種類の miRNA は、複数の遺伝子を調節しており、標的遺伝子のタンパク質への翻訳を阻害することで、標的の遺伝子発現を抑制することが知られている。そこで、miRNA を介した遺伝子発現制御ネットワークの解析により、症状に関わる複数の遺伝子を標的とする miRNA が同定できれば、WS の病態の解明だけでなく、その miRNA をターゲットとした治療への応用が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、患者検体を用いて疾患特異的な遺伝子発現および miRNA 発現プロファイルを明らかにし、共発現ネットワーク解析等のバイオインフォマティクス的手法を適応することで、遺伝子発現や miRNA の変動が WS の症状とどのように関わるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) WS 患者群および健常群のリクルートと臨床症状評価

患者家族会等の協力を得て、研究参加に同意を得たウィリアムス症候群患者と年齢・性別を適合させた健常群をリクルートした。

精神症状については、子供および大人の問題行動チェックリスト (CBCL/ABCL) を、社会性については、対人応答性尺度 (SRS-2) を用いて、各項目について比較検定を行い、精神症状・社会性のどの項目に差が認められるのか検討した。

(2) 血液検体から RNA, miRNA の抽出と品質評価

被検者の血液から PAXgene kit を使って RNA 及び miRNA を抽出し、分光光度計とバイオアナライザを用いてサンプルの品質確認を行った。RNA は、品質の指標である RIN 値が 8 以上のサンプルを以下の解析に供した。

(3) 網羅的な遺伝子発現および miRNA 発現解析

遺伝子発現については、Human GE マイクロアレイ 8×60K (アジレント社) を用いて網羅的に発現変動を調べた。得られたデータは、統計解析ソフト R の Limma package 等にて解析を行った。さらに遺伝子発現が増加した群、減少した群について、Gene Ontology および Pathway 解析を行い、どのような機能を有する遺伝子が増減したか確認した。

miRNA 発現については、Human miRNA マイクロアレイ 8×60K (アジレント社) を用いて網羅的に発現変動を調べた。得られたデータは、統計解析ソフト R の AgiMicroRna package 等にて解析を行った。さらに、miRNA の標的遺伝子について、TargetScan や miWalk 等のデータベースを使って探索・推定した。

(4) 加重遺伝子共発現ネットワーク解析 (WGCNA)

得られた遺伝子発現プロファイル及び miRNA 発現プロファイルに、WGCNA (Horvath, S. Weighted Network Analysis. 2011) という共発現ネットワーク解析を適応した。具体的には、統計解析ソフト R の WGCNA package を用いて実施し、2 つの発現パターンに重みづけを行い、遺伝子間または miRNA 間の関連性を算出。すべての組合せ計算を行い、関連性が類似する遺伝子群 (モジュール) および miRNA 群を抽出した後、臨床評価スコアを加えて解析し、有意に相関するモジュールを同定した。

共発現ネットワーク解析で得られた遺伝子発現とマイクロ RNA 発現の各モジュールについて、逆相関を有するモジュールを探索・同定した。

4. 研究成果

(1) 被検者の臨床症状評価と抽出した DNA, miRNA の品質確認

本研究に用いた被検者のデータを表 1 に示す。遺伝子発現解析には、WS 群 32 名及び健常群 30 名を、miRNA 発現解析には、WS 群 35 名及び健常群 31 名を用いて解析を行った。遺伝子発現セットと miRNA 発現セットのサンプルは、70% がオーバーラップしている。

臨床評価については、遺伝子発現セットのみ実施し、CBCL/ABCL 及び SRS-2 とともに WS 群では健常群に比し、有意に高いスコアを示しており、行動・社会性の障害がみられた。

表 1: 被検者 (WS 群及び健常群) の特徴

遺伝子発現セット	miRNA 発現セット
----------	-------------

	WS	Control	WS	Control
Individuals, n	32	30	35	31
Age, mean years	21.6(8.2)	23.9(4.1)	22.1(8.3)	25.6(5.6)
Sex, male (%)	16(50.0)	15(50.0)	15(42.9)	13(42.0)
RIN	8.8(0.4)	8.9(0.3)	8.8(0.4)	8.7(0.4)
CBCL/ABCL				
Internalizing problems	60.2(6.7)	54.0(11.2)*	-	-
Externalizing problems	57.9(7.7)	47.4(9.4)*	-	-
SRS-2				
Total score	74.9(28.9)	34.6(17.6)*	-	-

(2) WS の遺伝子発現プロファイルの同定

網羅的な遺伝子発現の結果を示す(図1)。WS群では、欠失領域(7q11.23)が最も有意な発現変動がみられたが、他の染色体領域にも有意な発現変動がみられた。

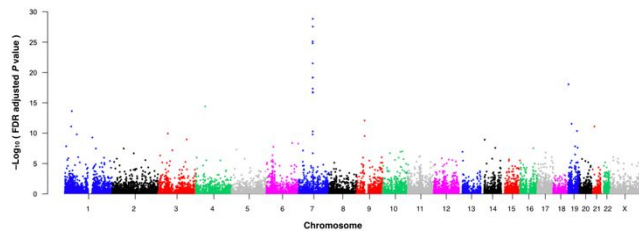


図1: WS群におけるゲノムワイドな発現変動(発表論文 参照)

(3) WGCNAによるWSの遺伝子発現関連モジュールの同定

次に得られた遺伝子発現プロファイルをもとに、WGCNAを行い、WSに関連するモジュールの同定を試みた。その結果、6つのWS関連モジュールを見出した(図2)。そのうち、4モジュールについてのGO解析の結果を示す(図3)。とくにM11モジュールは発現上昇遺伝子からなり、免疫系と強い関連がみられた(図3)。M11モジュールのハブ遺伝子を示す(図4)。

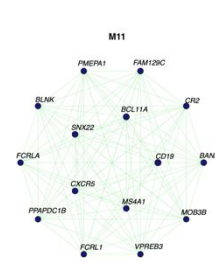
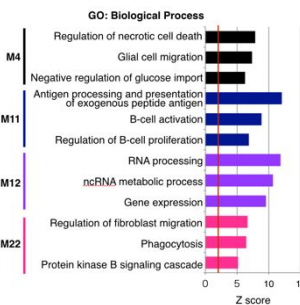
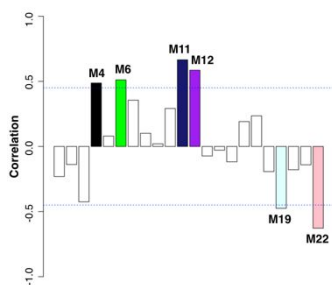


図2: 同定されたモジュール

図3: 各モジュールのGO解析

図4: M11のハブ遺伝子

(4) WGCNAによるWSのmiRNA発現関連モジュールの同定

miRNA発現プロファイルについても、同様にWGCNAを行い、1つのWS関連モジュールを同定した(図5)。MM7モジュールのハブmiRNAを示す(図6)。

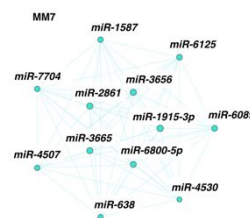
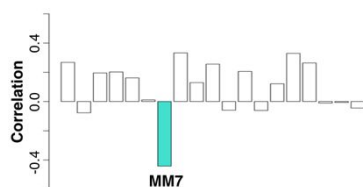


図5: 同定されたmiRNAモジュール

図6: MM7のハブmiRNA

(5) WSに関連した遺伝子発現とmiRNA発現のモジュールの相関

次に、遺伝子発現モジュールとmiRNA発現モジュールの相関について調べた。miRNAモジュールであるMM7を構成するハブmiRNAの標的遺伝子についてデータベースで探索し、それらが各々の遺伝子発現モジュールのハブ遺伝子と逆相関するかどうかが調べた。その結果、M11、M12、M4モジュールが、MM7モジュールと逆相関することがわかった(図7)。さらにそれら相関ネットワークを図8に示す。

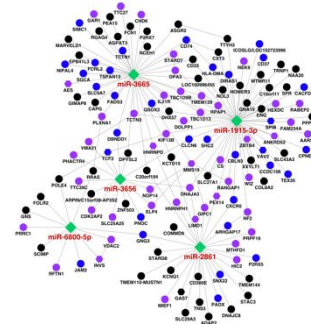
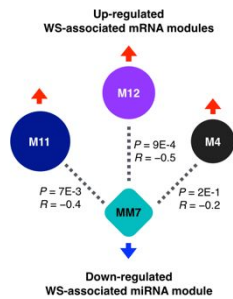


図7: 遺伝子発現とmiRNAモジュールの相関

図8: M11, M12, M4とMM7のネットワーク

以上の結果から、ウィリアムス症候群と最も強い相関を示したモジュール(M11)は、欠失領域にはない遺伝子で構成されており、免疫系と関連していることが明らかになった。さらに、このような大規模な遺伝子の発現変動が生じる要因の一つとしてmiRNAが関わっている可能性を見出した。本研究は、多数の患者さんの検体を用いて、欠失領域外の遺伝子も病態に関与しているということを明らかにしたという点で、大変意義のある成果だと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Benítez-Burraco A, Kimura R. Robust candidates for language development and evolution are significantly dysregulated in the blood of people with Williams syndrome. *Frontiers in Neuroscience*, 査読有, 13:258, 2019. doi.org/10.3389/fnins.2019.00258

Kimura R, Swarup V, Tomiwa K, Gandal MJ, Parikshak NN, Funabiki Y, Nakata M, Awaya T, Kato T, Iida K, Okazaki S, Matsushima K, Kato T, Murai T, Heike T, Geschwind DH, Hagiwara M. Integrative network analysis reveals biological pathways associated with Williams syndrome. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 査読有, 2019, 60(5):585-598. doi:10.1111/jcpp.12999

Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Okada T, Uno Y, Morikawa M, Ishizuka K, Shiino T, Kimura H, Arioka Y, Yoshimi A, Takasaki Y, Yu Y, Nakamura Y, Yamamoto M, Iidaka T, Iritani S, Inada T, Ogawa N, Shishido E, Torii Y, Kawano N, Omura Y, Yoshikawa T, Uchiyama T, Yamamoto T, Ikeda M, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Someya T, Watanabe Y, Egawa J, Nunokawa A, Itokawa M, Arai M, Miyashita M, Kobori A, Suzuki M, Takahashi T, Usami M, Kodaira M, Watanabe K, Sasaki T, Kuwabara H, Tochigi M, Nishimura F, Yamasue H, Eriguchi Y, Benner S, Kojima M, Yassin W, Munesue T, Yokoyama S, Kimura R, Funabiki Y, Kosaka H, Ishitobi M, Ohmori T, Numata S, Yoshikawa T, Toyota T, Yamakawa K, Suzuki T, Inoue Y, Nakaoka K, Goto YI, Inagaki M, Hashimoto N, Kusumi I, Son S, Murai T, Ikegame T, Okada N, Kasai K, Kunimoto S, Mori D, Iwata N, Ozaki N. Comparative Analyses of Copy-Number Variation in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Reveal Etiological Overlap and Biological Insights. *Cell Reports*, 査読有, 2018, 24(11) 2838-2856. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.022.

Kimura R, Ishii Y, Tomiwa K, Awaya T, Nakata M, Kato T, Okazaki S, Heike T, Hagiwara M. Williams-Beuren Syndrome as a Potential Risk Factor for Burkitt Lymphoma. *Frontiers in Genetics*, 査読有, 2018, 9:368. doi: 10.3389/fgene.2018.00368

Yoshida, T, Awaya, T, Jonouchi, T, Kimura, R, Kimura, S, Era, T, Heike, T, and Sakurai, H. A Skeletal Muscle Model of Infantile-onset Pompe Disease with Patient-specific iPSCs. *Scientific Reports*, 査読有, 2017, 7, Article number:13473. doi: 10.1038/s41598-017-14063-y

[学会発表](計6件)

Kimura R, Awaya T, Nakata M, Kato T, Funabiki Y, Tomiwa K, Heike T, Hagiwara M. A potential blood-based DNA methylation biomarker for autism spectrum disorder. SfN's 48th annual meeting, 2018, San Diego, USA.

木村亮, 粟屋智就, 中田昌利, 加藤竹雄, 富和清隆, 岡崎伸, 平家俊男, 萩原正敏. Epigenome-wide association study of DNA methylation in Williams syndrome. 第 63 回日本人類遺伝学会, 2018, 神奈川県横浜市

木村亮, 粟屋智就, 中田昌利, 加藤竹雄, 富和清隆, 平家俊男, 萩原正敏. Epigenome-wide association study of Williams syndrome. 第 123 回日本解剖学会総会, 2018 年, 東京都武蔵野市.

Kimura R, Awaya T, Nakata M, Kato T, Funabiki Y, Tomiwa K, Heike T, Hagiwara M. An epigenome-wide association study of Williams syndrome. American Society of Human Genetics, 2017, Orland, USA.

Kimura R, Nakata M, Awaya T, Kato T, Funabiki F, Murai T, Heike T, Hagiwara M. Aberrant expression of microRNAs as specific blood-based biomarkers for autism spectrum disorder. The 13th World Congress of Biological Psychiatry, 2017, Copenhagen, Denmark.

Kimura R, Tomiwa K, Awaya T, Kato T, Nakata M, Funabiki F, Heike T, Hagiwara M. Gene co-expression network analysis identifies gene modules associated with clinical phenotype in Williams syndrome. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016, Kyoto, Japan.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 自閉症スペクトラム障害のバイオマーカー

発明者: 萩原正敏、木村亮、中田昌利

権利者: 国立大学法人京都大学

種類: 特許

番号: JP2016-203605

出願年: 2016 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

アウトリーチ活動 (計 2 件)

ウィリアムズ症候群家族会「エルフィン関西」総会での講演 (2016-2018 年度)

ウィリアムズ症候群家族会「スマイルズム」総会での講演 (2018 年度)

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 富和 清隆

ローマ字氏名: Tomiwa Kiyotaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。