

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 4 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07820

研究課題名(和文) 脳内全細胞を対象とした自閉症・統合失調症の新規創薬ターゲットの同定

研究課題名(英文) Identifying drug targets for neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders via brain transcriptome

研究代表者

野村 淳(NOMURA, Jun)

神戸大学・医学研究科・学内講師

研究者番号：70406528

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)：1q21.1染色体領域は約1Mb, 8遺伝子を含む領域であり, これまで統合失調症, 注意欠陥多動性障害(ADHD), 自閉症との関連が報告されている. 今回本染色体領域の疾患モデルとして, ヒトES(胚性幹)細胞を基に1q21.1欠失(1q21.1del), 1q21.1重複細胞(1q21.1dup)を作製し疾患表現型の解析を実施したところ, 1q21.1del細胞が神経細胞への分化が亢進する一方, 1q21.1dup細胞では抗神経細胞分化, すなわち幹細胞の性質を強く保持する傾向が認められた. さらに電気生理学的特性として, 両神経細胞はコントロール細胞に比べスパイク, バースト頻度の顕著な上昇が認められた.

研究成果の学術的意義や社会的意義

1q21.1染色体領域は, 統合失調症, ADHD, 自閉症等様々な精神疾患, 神経発達症との相関が示唆されているにもかかわらず, 疾患に至るメカニズムが不明であった. 今回, 疾患の基盤と考えられる脳内神経細胞および神経幹細胞の表現型を明らかにすべく, (1q21.1欠失および重複)細胞モデルを作製, モデルを用いた疾患表現型解析を実施した. 神経幹細胞では1q21.1欠失で易神経分化, 1q21.1重複では抗神経分化特性と真逆の表現型を認めた一方, 電気生理特性はともに発火頻度が高いという結果が得られた. 細胞モデルというシンプルなモデルのメリットを生かし, 1q21.1領域が直接関与する疾患表現型を明らかとした.

研究成果の概要(英文)：Chromosome 1q21.1 is a region containing approximately 1 Mb and 8 genes, and has been reported to be associated with schizophrenia, attention deficit hyperactivity disorder (ADHD), and autism. In this study, we generated human embryonic stem (ES) cells with a deletion of 1q21.1 (1q21.1del) and a duplication of 1q21.1 (1q21.1dup) as disease models of this chromosomal region and analyzed their phenotypes. dup cells showed a tendency toward anti-neuronal differentiation, i.e., a strong retention of stem cell characteristics. In addition, electrophysiological characteristics of these showed a marked increase in spike and burst frequency in both types of neurons compared to control cells.

研究分野：脳神経科学

キーワード：神経発達症 疾患モデル 染色体操作 コピー数多型/CNV 自閉症 統合失調症 電気生理 オルガノイド

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト 1q21.1 染色体領域 (欠失(1q del)もしくは重複(1q dup)) が統合失調症, 注意欠陥多動性障害 (ADHD), 自閉スペクトラム症 (自閉症) と遺伝的相関が認められているにもかかわらず, 疾患表現型が多様であるため, 疾患に至るメカニズムが不明であった。

(2) 複雑な疾患表現型を呈する 1q21.1 コピー数多型 (欠失および重複) を反映したヒトの細胞モデルが求められている事, さらに神経細胞の変異に起因すると考えられる精神疾患, 神経発達症の基盤となる神経細胞特異的な表現型の同定, さらに疾患表現型に至るメカニズム解明が必須であった。

2. 研究の目的

(1) 1q21.1 染色体領域の欠失, 重複ヒト ES 細胞を用いて, 神経分化を実施, 神経細胞とともに神経細胞への分化過程における神経幹細胞を形態学的に解析する. さらに, 形態変化を引き起こす分子基盤を同定する。

(2) 1q21.1 染色体領域の欠失, 重複ヒト ES 細胞を用いて, 神経分化を実施, 神経細胞における電気生理学的側面から, 1q21.1 の遺伝子コピー数変化に伴う疾患様表現型を同定する。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞, 神経幹細胞特異的な形態学的疾患様表現型の同定を行うとともに, 免疫染色等により分子レベルの変化を同定する。

(2) in vitro 神経分化を実施し, MEA (Multi Electrode Array, 多点電極アレイ) を用いて, コントロール細胞を含む分化神経細胞におけるスパイク発火, バーストの頻度を記録し, 1q21.1 染色体領域のコピー数変化に伴う神経生理学的変化を同定する。

4. 研究成果

(1) ニューロスフェア (neurosphere) は, 神経細胞への分化過程にある球状の細胞凝集塊であり, 神経幹細胞を多く含む細胞集団である. これまで, ニューロスフェアを用いた形態学的解析から, 1q del 細胞は CTRL に比べサイズが小さく, また 1q dup 細胞は CTRL 細胞に比べサイズが大きいという結果が得られている. このコピー数変化に伴う, 形態変化の分子基盤を明らかにするため, 今回神経幹細胞のマーカである SOX2 とともに (G2/M 期) 細胞増殖のマーカであるリン酸化ヒストン (Phospho histone H3: pHH3), そしてアポトーシス細胞を検出する Cleaved Caspase-3 抗体を用いて, CTRL, 1q del, 1q dup の免疫染色を行った (図 1). また, Cleaved Caspase-3 同様, アポトーシス細胞を検出する TUNNEL 染色 (TdT-mediated dUTP nick end labeling) も同時に実施し, アポトーシス細胞の定量化を行なった. この結果, 1q dup 細胞において pHH3 シグナルが増加しており, 1q dup 細胞におけるサイズ増加の表現型と一致している. 一方, 現在までアポトーシスに関しては, Cleaved-Caspase3, TUNNEL 染色のシグナル, 両方において, 1q del, CTRL, 1q dup 細胞間で顕著な差は認められないことから, サイズ変化にアポトーシスは関与しないと考えられた。

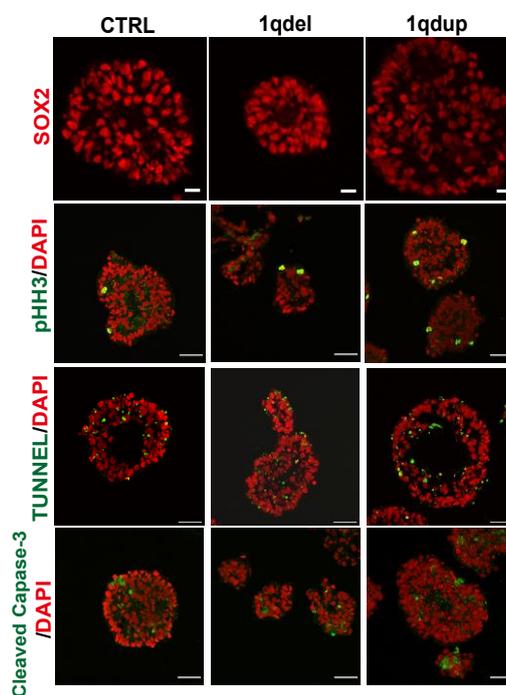


図 1. ニューロスフェアにおける表現型の違い. コントロール (CTRL), 1q21.1 欠失細胞 (1q del), 1q21.1 重複細胞 (1q dup) 細胞間の比較から, 1q dup 細胞で細胞増殖の亢進 (pHH3 シグナルの増加) が認められた。

神経幹細胞の形態には変化が認められたため、神経細胞においても同様に形態の解析を行なったが、各遺伝型 (CTRL, 1q del, 1q dup) 間で顕著な変化は認められなかった (図 2)。一方、近年の数万人規模の大規模な遺伝学解析から明らかになった自閉症リスク遺伝子群のデータセット¹を用いて実施されたパスウェイ、エンリッチメント解析からは、「神経細胞死」のみならず「細胞周期」の変化も特徴の一つとして同定されており²、細胞周期の異常は特定神経細胞への分化・系譜運命決定への影響が示唆される。

(2) 神経生理学的解析を、微小電極アレイ (microelectrode array: MEA, Multi-Channel Systems, Harvard Bioscience, Inc.) を用いる事で、遺伝型間の神経細胞の電気的特性、特に自然に発生する神経細胞のスパイク、バースト発火を解析した。MEA は、MEA プラスチックチップ上に存在する複数の電極を用い、神経細胞の電気的活動を測定する事が可能であり、神経細胞の発火とともに、神経細胞間のネットワーク発火を記録する事が可能である。

MEA チップ上に播種した神経細胞は1ヶ月を超えた辺りからスパイク活動が見られる様になり、徐々に安定したスパイクが認められる様になった。7週目における電気生理学的解析からは、1q del, 1qdup 神経細胞の両方で、CTRL 神経細胞に比べ、5分間のスパイク数の顕著な増加が認められた (図 3)。1q del/1q dup 神経細胞が CTRL に比べ過活動である事が明らかになった一方、GABAA 受容体ブロッカーのBicuculline 処置に対するスパイク数の変化に差が認められない事から、カルチャーディッシュ上においては GABA 作動性神経細胞の抑制効果というよりもグルタミン酸作動性神経細胞の内因性の影響を反映した結果と考えられた³。

(3) 1q21.1 コピー数変化が大脳皮質形成に及ぼす影響を、大脳皮質オルガノイドにより解析を行なっている。大脳皮質オルガノイドは、理研笹井らが開発した SFEBq 法に従い実施し、解析を行なっている⁴。

<引用文献>

1. Satterstrom, F. K. et al., Large-scale exome sequencing study implicates both developmental and functional changes in the neurobiology of autism., *Cell*, 2020, 180, 568-584. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.036>
2. Nomura J et al., Molecular signatures from multi-omics of autism spectrum disorders and schizophrenia., *Journal of Neurochemistry*, 2021 Nov;159(4):647-659. DOI: <https://doi.org/10.1111/jnc.15514>
3. Nomura Y et al., Reciprocal differentiation via GABAergic components and ASD-related phenotypes in hES with 1q21.1 CNV., *BioRxiv*, DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.09.13.460033>
4. Kadoshima, T. et al. Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 2013, 110, 20284-20289. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1315710110>

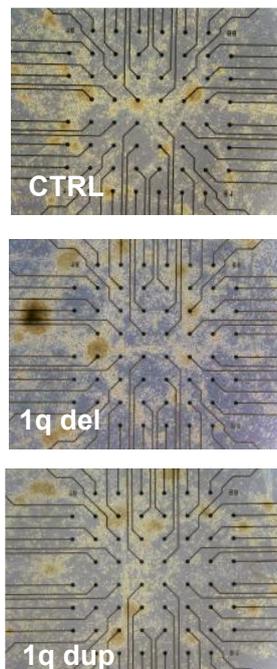


図 2. 神経細胞を多電極アレイ MEA のチップに播種し、神経細胞の形態を解析した。異なる遺伝型 (CTRL, 1qdel, 1q dup) 間で形態に顕著な変化は認められなかった。

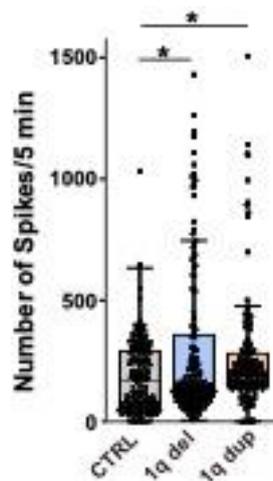


図 3. MEA による神経細胞スパイクの解析。CTRL 神経細胞に比べ 1q del, 1q dup 神経細胞のスパイク数増加が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Furukawa S, Nomura J, Hanafusa H, Maegawa H, Takumi T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Germ-cell-specific transcriptome analysis illuminates the chromatin and ubiquitin pathway in autism spectrum disorders	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Autism Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/aur.2939	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 Lin Chia-Wen, Septyaningtrias Dian E., Chao Hsu-Wen, Konda Mikiko, Atarashi Koji, Takeshita Kozue, Tamada Kota, Nomura Jun, Sasagawa Yohei, Tanaka Kaori, Nikaido Itoshi, Honda Kenya, McHugh Thomas J., Takumi Toru	4. 巻 27
2. 論文標題 A common epigenetic mechanism across different cellular origins underlies systemic immune dysregulation in an idiopathic autism mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 3343 ~ 3354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41380-022-01566-y	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 該当する

1. 著者名 Nomura J, Takumi T.	4. 巻 33
2. 論文標題 シングルセル、オルガノイド研究による細胞腫特異的自閉症リスク因子の同定	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本生物学的精神医学会誌	6. 最初と最後の頁 48-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11249/jsbpjpp.33.2_48	査読の有無 無
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 Nomura Jun, Zuko Amila, Kishimoto Keiko, Mutsumine Hiroaki, Fukatsu Kazumi, Nomura Yoshiko, Liu Xiaoxi, Nakai Nobuhiro, Takahashi Eiki, Kouno Tsukasa, Shin Jay W., Takumi Toru, ES library team	4. 巻 -
2. 論文標題 Autism in a dish: ES cell models of autism with copy number variations reveal cell-type-specific vulnerability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.02.02.478766	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Nomura Yoshiko, Nomura Jun, Nishikawa Toru, Takumi Toru	4. 巻 -
2. 論文標題 Reciprocal differentiation via GABAergic components and ASD-related phenotypes in hES with 1q21.1 CNV	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.09.13.460033	査読の有無 無
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 Nomura Jun, Mardo Matthew, Takumi Toru	4. 巻 159
2. 論文標題 Molecular signatures from multi omics of autism spectrum disorders and schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 647 ~ 659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15514	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 該当する

1. 著者名 Nomura Yoshiko, Nomura Jun, Kamiguchi Hiroyuki, Nishikawa Toru, Takumi Toru	4. 巻 171
2. 論文標題 Transcriptome analysis of human neural cells derived from isogenic embryonic stem cells with 16p11.2 deletion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 114 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.03.005	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 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nomura J. Takumi T
2. 発表標題 Autism in a dish: ES cell models of autism with copy number variations reveal cell-type-specific vulnerability
3. 学会等名 The 2nd International Symposium Multiscale Brain / MCCS-Asia (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nomura J.
2. 発表標題 ES cell models of autism with copy number variations reveal cell-type-specific vulnerability
3. 学会等名 The 1st NSN (Neuroscience Network in Kobe) Research Seminar 2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nomura J, Takumi T.
2. 発表標題 Autism in a dish., Comprehensive analysis identified CNV- and cell type specific vulnerability of autism spectrum disorder.
3. 学会等名 第4回理化学研究所BDR・神戸大学合同シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 シングルセル解析による自閉症リスク因子・パスウェイの同定
2. 発表標題 Nomura J. Takumi T.
3. 学会等名 BPCNP/PPP 4 学会(日本神経精神薬理学会/日本生物学的精神医学会/日本臨床神経薬理学会/日本精神薬学会)合同年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 シングルセル解析による細胞種特異的自閉症リスク因子の同定
2. 発表標題 Nomura J. Takumi T.
3. 学会等名 令和4年度シグナル伝達医学研究展開センター研究発表会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------