

## 特集 2 自閉症学の魅力

## 1. 自閉症基礎研究を加速させる新技術とその展望

野村 淳<sup>1)</sup>, 内匠 透<sup>1, 2)</sup>

**抄録:** 社会性行動の障害をコアドメインとする『自閉スペクトラム症 (自閉症)』は、コア症状に付随する表現型が多岐に及ぶ神経発達障害である。名称に含まれる『スペクトラム』とは、境界が曖昧でありかつ連続体という意味であり、自閉症疾患表現型の多彩さ、複雑さを意味している。既に複数のヒト死後脳、モデル動物脳を用いた解析から自閉症に共通して変動する遺伝子、パスウェイ、ネットワークの同定が進んでいるが、これら臓器レベルの解析結果は多数の細胞種の影響を受けやすく、マイナーな細胞種の表現型はマスクされる傾向にある。これを解決したのが次世代シーケンスを用いた一細胞 RNA シークエンス (scRNA-seq) である。本技術は、一細胞レベルの解析を可能にしたことで、マイナーな細胞群での転写産物解析のみならず、メジャーな細胞も発現様式に応じて細かく分類し、解析を行う事が可能となった。本稿では scRNA-seq を用いた最新の研究結果の紹介、そして本技術を用いた自閉症研究の展望を行う。

日本生物学的精神医学会誌 31 (2) : 71-75, 2020

**Key words :** single cell RNA-seq, autism, cell type-specific analysis, CRISPR

## 1. 自閉症研究を加速させる新技術

近年、一細胞レベルの分解能を持つトランスクリプトーム解析、一細胞 RNA シークエンス (scRNA-seq : single cell RNA sequence) が生物系の基礎研究に大きなブレイクスルーをもたらしている。特に 2015 年に Cell 誌で back-to-back で発表されたハーバード大学の Steve McCarroll のグループ<sup>14)</sup>、そして David A. Weitz と Marc W. Kirschner の共同研究グループ<sup>11)</sup> による Drop-seq 法は一細胞と識別バーコードをマイクロ流路内でナノリットルレベルのドロップ (液滴) に分離することで、一細胞レベルでの分析、そしてハイスループットを同時に実現した。実際、本手法を用いることで McCarroll のグループは 44,808 個のマウス網膜細胞から 39 種類の遺伝子発現パターンの異なる細胞クラスターを同定、Weitz と Kirschner はマウス ES 細胞からマイナーな細胞クラスターの同定に成功している。

一細胞解析とともに近年脚光を浴びた技術として

は、CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeat) /Cas9 に代表されるゲノム編集技術が挙げられる<sup>12)</sup>。本手法を用いた細胞 / 動物モデルは多数作製されており、モデル作製のデフォルト技術となった感がある。現在、先に紹介した一細胞解析技術とゲノム編集技術を組み合わせた Perturb-seq<sup>1, 6)</sup>、CRISP-seq<sup>9)</sup>、そして CROP-seq<sup>5)</sup> など興味深い技術が次々に開発されている。Perturb-seq は“Perturb”の名の通り、ユニークなバーコード (Guide Barcode : GBC) が付加された guide RNA (gRNA) のプール型ライブラリーを細胞に導入し、ゲノム編集された細胞を一細胞レベルで解析を行う。CRISP-seq、CROP-seq とともに Perturb-seq とは細かい点で手技手法が異なるものの、プール型 gRNA を細胞に導入するという点で同一である。

次世代シーケンサーによる scRNA-seq は膨大なアウトプットデータを生み出すことから、それらを適切に処理するバイオインフォマティクスの解析パ

Emerging technologies for autism spectrum disorders

1) 理化学研究所脳神経科学研究センター (〒 351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1) Jun Nomura, Toru Takumi : RIKEN Center for Brain Science. 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

2) 神戸大学大学院医学研究科 (〒 650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町 7-5-1) Toru Takumi : Kobe University Graduate School of Medicine. 7-5-1 Kusunokicho, Tyuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan)

【内匠 透 E-mail : toru.takumi@riken.jp】

イプラインも重要である。現在、ニューヨーク大の Rahul Satija による Seurat (R)<sup>20)</sup>、ドイツヘルムホルツ研究センター Fabian J. Theis による Scanpy (Python)<sup>26)</sup> が主要解析プラットフォームと考えられるが、10xGenomics 社が開発した Loupe Cell Browser も一細胞データ解析に有効なツールである。特に一細胞レベルでの分析でコピー数多型およびクロマチン状態を同一プラットフォームで解析可能である点は魅力的である。

## 2. 中枢神経系における 一細胞トランスクリプトーム解析

脳神経科学分野においても scRNA-seq シークエンスによる解析が年々増えており、細胞種特異的な疾患への寄与が次々に明らかとなってきている。特にアルツハイマー病<sup>7, 15)</sup>、ALS (筋萎縮性側索硬化症)<sup>17, 21)</sup>、パーキンソン病<sup>13, 22)</sup>、ハンチントン病<sup>2)</sup>、多発性硬化症<sup>19)</sup> といった主要神経変性疾患では、神経細胞に限定しない細胞種特異的な細胞内分子病態・メカニズムが明らかとなりつつある。これら一細胞レベルの解析結果は、既存の臓器レベルでのトランスクリプトーム解析ではわからなかったものも含まれる。一方、自閉症を含む精神疾患研究分野ではどうであろうか。神経変性疾患に比較し、必ずしも多くの論文が発表されたわけではないが、興味深い知見が得られつつある。

アルバートアインシュタイン大の Deyou Zheng らのグループは、既存のヒト scRNA-seq を実施した複数のデータセット (ヒト胎生 12 ~ 13 週胎児の脳新皮質、ヒト ES 細胞を用いた脳オルガノイド培養<sup>3)</sup>、ヒト成人の側頭葉<sup>4)</sup> の細胞種特異的トランスクリプトームデータ) を用い、自閉症、統合失調症、アルツハイマー病、ハンチントン病といった疾患のリスク遺伝子とさまざまな細胞種とのエンリッチメント解析を行った<sup>25)</sup>。この結果、成人ヒト脳サンプルからは、自閉症リスク遺伝子と神経細胞、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞への顕著なエンリッチメントが認められた。神経細胞では特に抑制性神経細胞への顕著なエンリッチメントが認められた一方、アストロサイト、マイクログリアでは認められなかった。胎児脳データセットでも成熟神経細胞とのエンリッチメントが認められた。自閉症患者脳では興奮性・抑制性神経細胞のバランス異常が既にさまざまな方面から指摘されており<sup>18)</sup>、本研究では改めて自閉症における抑制性神経細胞の脆弱性が示される結果となった。

カリフォルニア大学サンフランシスコ校の Arnold R. Kriegstein のグループは、自閉症で細胞種特異的に変動する遺伝子を同定するため、死後脳 41 サンプル (内訳: ASD 患者 15 名、コントロール 16 名の前頭前皮質、前帯状皮質) を用いて scRNA-seq を実施した<sup>24)</sup>。神経細胞を含む全細胞を俯瞰したジーンオントロジー (GO) 解析からは、既存の遺伝子発現解析で得られた知見同様、『シナプスのプロセッシング・トランスミッション』や『軸索誘導』、『神経細胞移動』といった神経発達に関与する遺伝子群の変動が認められた。一細胞レベルの解析では、興奮性神経細胞、抑制性神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、マイクログリアを中心に 17 種類の細胞クラスターを形成した。本論文の特筆すべき点としては、大脳皮質の表層 2/3 層、4 層の興奮性神経細胞、および 5/6 層の神経細胞といった大脳皮質の層を遺伝子発現パターンに応じて細かく分離、それぞれの細胞種と疾患の相関を解析したことにある。実際、本論文では、大脳皮質の表層 (2/3 層) およびマイクログリアが自閉症と高い相関を示すことを明らかにしている。

また、新技術として紹介した Perturb-seq を用いた自閉症の研究が早くも BioRxiv に掲載されている<sup>10)</sup>。本論文では、エンドヌクレアーゼである Cas9 を発現する妊娠トランスジェニックマウスの胎生 12.5 日の胎児側脳室にレンチウィルスでプール型 gRNA を導入 (35 種類の ASD と関連する遺伝子に対応)、出生 7 日目のマウス脳 (大脳皮質、線条体) で細胞種毎の遺伝子発現解析を実施している。本研究の目的は自閉症と関連する 35 遺伝子のバリエーションが脳の発達にどのような影響を及ぼすかを一細胞レベルで解析すること、そして本技術の検証を行うことにある。特に本論文では、オリゴデンドロサイトに関して興味深い知見が得られた。ASD のリスク遺伝子である CHD8 は主に神経幹細胞の増殖と神経細胞への分化を制御する遺伝子であることが知られているが、今回オリゴデンドロサイトへの分化、成熟に関与する可能性も示唆された。つまり CHD8 は神経細胞のみならず、オリゴデンドロサイトおよびその前駆細胞まで負の影響を与えていることになる。このことは、自閉症の創薬ターゲットが神経伝達因子というシンプルな構造になりえないことを示唆している。

## おわりに

本稿では、近年発展が目覚ましい scRNA-seq の

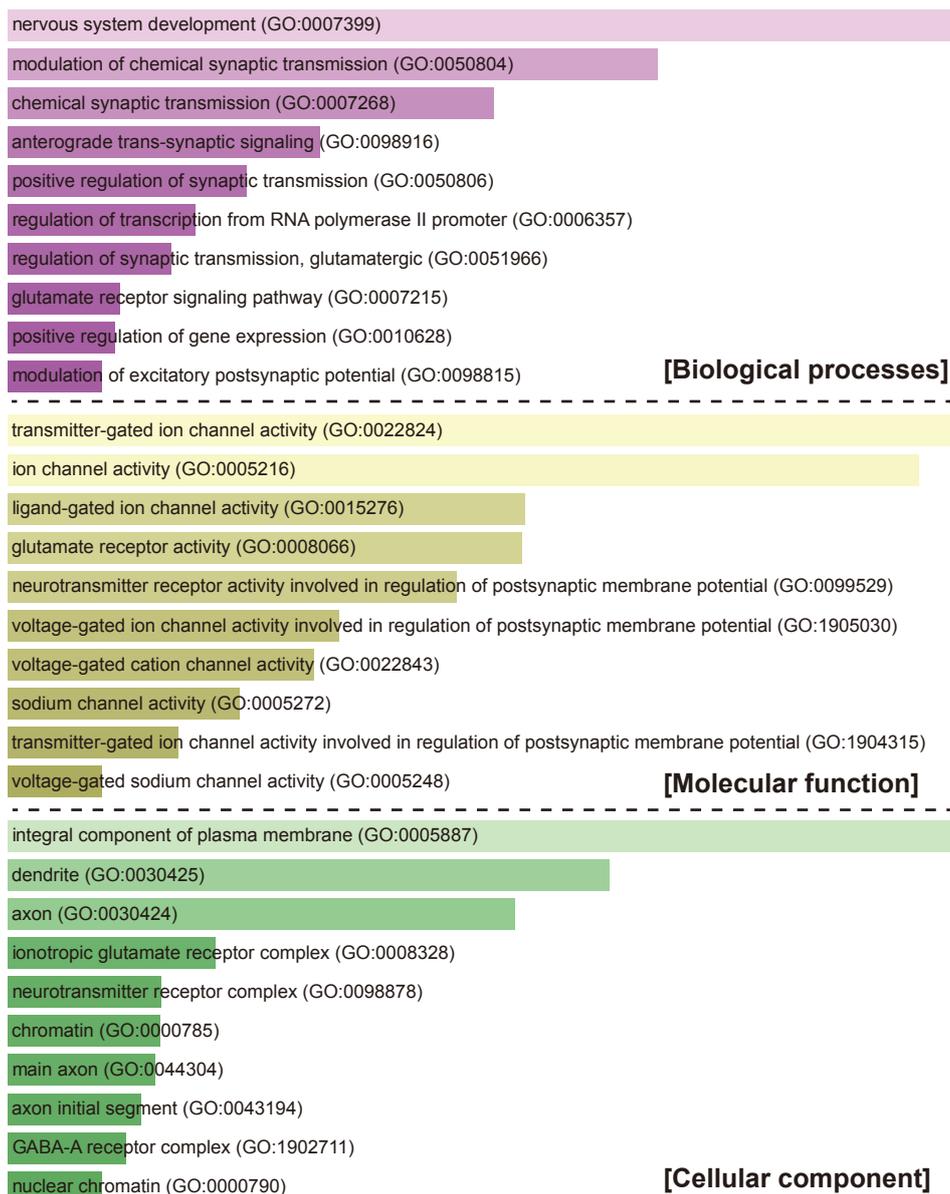


図1 自閉症と相関する Gene Ontology (GO) term トップ10

技術，そして一細胞解析から得られた自閉症に関する最新の知見を紹介した。現在，自閉症に相関すると考えられる遺伝子は次々に同定され，その数はヒト遺伝学に基づき十分に信頼しうるものから，可能性が低いと考えられるものまで1,000を超えている（自閉症データベース SFARI より）。その全遺伝子を用いジーンオントロジー (GO) 解析を行った結果，神経系の機能にそのほとんどがエンリッチしていることがわかる（図1）。KEGG パスウェイ解析でも同様である（図2）。しかし，自閉症症状は全身の細胞が複雑に絡み合いその総和が表現型に寄与している可能性があることから，今後は中枢神経系のみならず中枢非神経系，幹細胞，さらに末梢組織でも scRNA-seq を行う必要がある。またこのような未

解析の細胞・組織で scRNA-seq を行った場合，細胞種毎に GO の結果大きく変動し，想定外の結果が得られるかもしれない。

最後に，中枢神経系にとどまらない最新の単細胞解析研究を紹介する。自閉症の発症リスクの一つに，父親の年齢が示唆されているが，その原因は精子にあると考えられている<sup>8, 16)</sup>。今回ラトガース大学の Jeffrey A Rosenfeld とコーネル大学の Christopher E Mason の共同研究グループが6名のドナー（このうち2名が自閉症の子を持つ）の精子を用い，scRNA-seq を実施した<sup>23)</sup>。サンプルサイズが小さいためサンプル間で生じた遺伝子発現変化を直接自閉症リスクとして考察することは難しい。しかし，遺伝子発現レベルではなく，ゲノムレベルすなわち

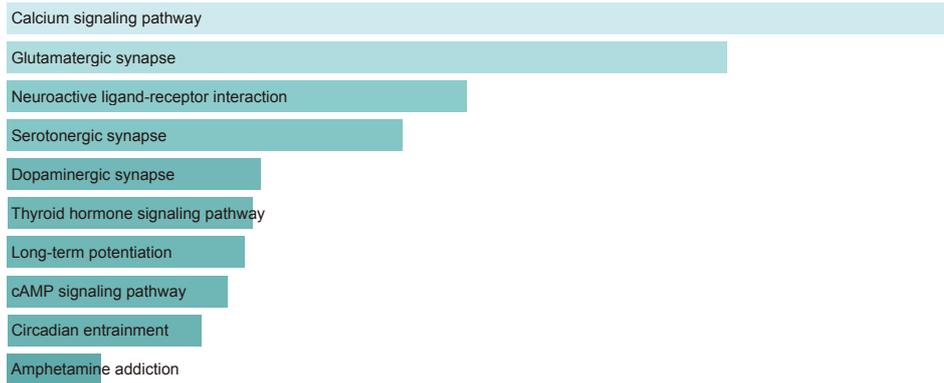


図2 自閉症と相関するパスウェイ (KEGG) top10

一塩基バリエント (アレル頻度 < 0.001) の出現頻度をサンプル間で比較したところ、自閉症の子を持つ父親の精子ではバリエントの出現頻度が有意に上昇することを見いだした。出現頻度は常染色体、性染色体に関係なく、またエキソン、イントロン、遺伝子間領域に関係なく自閉症の子を持つ父親の精子では上昇傾向にあった。先に述べたように本論文はサンプル数が極めて少ないため、自閉症との因果関係を考察することは難しいが、本論文の筆者が述べるように本手法は今後自閉症リスクを推定するうえで一つの手法・参考になりうるかもしれない。現在、一細胞レベルの研究は解析手法を含め、さらなる広がりを見せており、複雑な自閉症の病態生理をよりシンプルに説明する日が来るかもしれない。

本論文に開示すべき利益相反は存在しない。

## 文 献

- 1) Adamson B, Norman TM, Jost M, et al (2016) A multiplexed single-cell CRISPR screening platform enables systematic dissection of the unfolded protein response. *Cell*, 167 : 1867-1882.
- 2) Al-Dalahmah O, Sosunov AA, Shaik A, et al (2020) Single-nucleus RNA-seq identifies Huntington disease astrocyte states. *Acta Neuropathol Commun*, 8 : 19.
- 3) Camp JG, Badsha F, Florio M, et al (2015) Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 : 15672-15677.
- 4) Darmanis S, Sloan SA, Zhanget Y, et al (2015) A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 : 7285-7290.
- 5) Datlinger P, Rendeiro AF, Schmidl C, et al (2017) Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat Methods*, 14 : 297-301.
- 6) Dixit A, Parnas O, Li B, et al (2016) Perturb-seq : dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens. *Cell*, 167 : 1853-1866.
- 7) Grubman A, Chew G, Ouyang JF, et al (2019) A single cell brain atlas in human Alzheimer's disease. *BioRxiv*. [Epub ahead of print]. doi : <https://doi.org/10.1101/628347>.
- 8) Hultman CM, Sandin S, Levine SZ, et al (2011) Advancing paternal age and risk of autism : new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies. *Molecular Psychiatry*, 16 : 1203-1212.
- 9) Jaitin DA, Weiner A, Yofe I, et al (2016) Dissecting immune circuits by linking CRISPR-pooled screens with single-cell RNA-seq. *Cell*, 167 : 1883-1896.
- 10) Jin X, Simmons SK, Guo AX, et al (2019) In vivo perturb-seq reveals neuronal and glial abnormalities associated with autism risk genes, *BioRxiv*. [Epub ahead of print]. doi : <https://doi.org/10.1101/791525>.
- 11) Klein AM, Mazutis L, Akartuna I, et al (2015) Drop-let barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell*, 161 : 1187-1201.
- 12) Knott GJ and Doudna JA (2018) CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 361 : 866-869.
- 13) Lang C, Campbell KR, Ryan BJ, et al (2019) Single-cell sequencing of iPSC-dopamine neurons reconstructs disease progression and identifies HDAC4 as a regulator of Parkinson cell phenotypes. *Cell Stem Cell*, 24 : 93-106.

- 14) Macosko EZ, Basu A, Satija R, et al (2015) Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 161 : 1202-1214.
- 15) Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z, et al (2019) Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*, 570 : 332-337.
- 16) Milekic MH, Xin Y, O'Donnell A, et al (2015) Age-related sperm DNA methylation changes are transmitted to offspring and associated with abnormal behavior and dysregulated gene expression. *Molecular Psychiatry*, 20 : 995-1001.
- 17) Namboori SC, Thomas P, Ames R, et al (2019) Single cell transcriptomics identifies master regulators of dysfunctional pathways in SOD1 ALS motor neurons. *BioRxiv*. [Epub ahead of print]. doi : <https://doi.org/10.1101/593129>.
- 18) Nelson SB and Valakh V (2015) Excitatory/inhibitory balance and circuit homeostasis in autism spectrum disorders. *Cell*, 87 : 684-698.
- 19) Schirmer L, Velmeshev D, Holmqvist S, et al (2019) Neuronal vulnerability and multilineage diversity in multiple sclerosis. *Nature*, 573 : 75-82.
- 20) Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al (2019) Comprehensive integration of single-cell data. *Cell*, 177 : 1888-1902.
- 21) Tam OH, Rozhkov NV, Shaw R, et al (2019) Post-mortem cortex samples identify distinct molecular subtypes of ALS : Retrotransposon activation, oxidative stress, and activated glia. *Cell Rep*, 29 : 1164-1177.
- 22) Tiklová K, Nolbrant S, Fiorenzano A, et al (2019) Single cell gene expression analysis reveals human stem cell-derived graft composition in a cell therapy model of Parkinson's disease. *BioRxiv*. [Epub ahead of print]. doi : <https://doi.org/10.1101/720870>.
- 23) Tomoiaga D, Aguiar-Pulido V, Shrestha S, et al (2019) Single-Cell, Human Sperm Transcriptomes and Variants from Fathers of Autistic and Healthy Children. *BioRxiv*. [Epub ahead of print]. doi : <https://doi.org/10.1101/640607>.
- 24) Velmeshev D, Schirmer L, Jung D, et al (2019) Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science*, 364 : 685-689.
- 25) Wang P, Zhao D, Lachman HM, et al (2018) Enriched expression of genes associated with autism spectrum disorders in human inhibitory neurons. *Transl Psychiatry*, 8 : 13.
- 26) Wolf FA, Angerer P and Theis FJ (2018) SCANPY : large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome Biol*, 19 : 15.

---

**■ ABSTRACT**

---

**Emerging technologies for autism spectrum disorders**Jun Nomura<sup>1)</sup>, Toru Takumi<sup>1,2)</sup>1) *RIKEN Center for Brain Science*2) *Kobe University Graduate School of Medicine*

Autism spectrum disorder (ASD) is recognized as one of the major neuropsychiatric disorders defined as social deficits, repetitive behavior and lack of communication skills. Since the word "spectrum" means "a condition that is not restricted to a specific set of values but can vary, without steps, across a continuum", patients with ASD showed broad and various phenotypes. Although the past bulk RNAseq studies have succeeded to identify converged pathways, genes, and networks in ASD, these outcomes may reflect the results of major cell-type alternation but not in minor cell-type one. Here we introduce a recent technique, single cell RNA-sequence (scRNA-seq), which enables to analyze at a single-cell resolution. The scRNA-seq sheds light on minor cell-types that may be an important factor for ASD pathogenesis. The single cell analysis with bioinformatics, combined with genome editing tools, will become a key player to understand heterogeneous psychiatric disorders, such as ASD.