

## 特集 1 発達障害研究最前線—細胞から臨床まで—

## 2. シングルセル, オルガノイド研究による細胞種特異的自閉症リスク因子の同定

野村 淳\*, 内匠 透\*

**抄録:** 生物学における一細胞レゾリューションの解析は「single-cell RNA-sequence (scRNA-seq)」によるゲノムワイドな転写産物解析に始まり, 「ATAC-seq」によるクロマチン構造 (アクセシビリティ) 解析, 「CITE-seq」による細胞膜 (表面) タンパク質の解析, 組織切片を対象とした空間情報を保持した遺伝子発現解析, さらにこれらを応用した技術にまで拡がりをみせている。現在, 3D 脳オルガノイド等を組み合わせることにより多面的な解析が可能となり, 導出された出力データの統合により生物学的理解は急速に進んでいる。実際, 神経精神疾患分野においても複雑な疾患表現型を説明する細胞種特異的メカニズムが次々と提案されている。本稿では, 神経精神系疾患におけるシングルセル解析の見地から, 社会性の喪失をコアドメインとする自閉スペクトラム症 (自閉症), そして呼吸器系疾患でありながら一部患者に神経精神疾患表現型が認められる新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) について, 最新の知見を紹介する。

日本生物学的精神医学会誌 33 (2) : 48-52, 2022

**Key words :** single-cell, brain organoid, copy number variation, autism, neurodevelopmental disorders, neuropsychiatric disorders, COVID-19

神経精神疾患に関するシングルセル解析は, 臨床検体の一部組織を用いたもの, さらにモデル動物・細胞を用いたものも含め急速に進んでいる。筆者らは昨年度, 本誌において single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) の技術, そして scRNA-seq を用いた最新の自閉スペクトラム症 (自閉症) の研究, さらに今後のシングルセル解析の展望を行ったが<sup>7)</sup>, この一年でさらに重要な新知見が報告されており, その一部を以下概説する。

自閉症は, 社会性の喪失, コミュニケーションの障害, さらに常同行動をコア症状とする神経発達症の一つであるが, “スペクトラム”の名を冠するとおり, 聴覚過敏や統合運動障害 (運動協調性障害), 注意欠如・多動症 (attention-deficit/hyper activity : ADHD), 限局性学習症 (specific learning disability) 等を併発するケースが多々あり疾患表現型は多様である。実際, 大規模ゲノム解析をもとにした筆者らのメタ解析でも, 統合失調症との間に分子パスウェ

イ等において複数のオーバーラップを認めている<sup>5)</sup> (図 1)。一方, 自閉症の遺伝学はこれまで家族, 双生児ゲノム DNA を用いた遺伝学研究から, 発症には遺伝要因が関与することが認知されてきた。現在, 米国 Simons 財団が運営する世界最大の自閉症データベース SFARI では 1,000 を超える遺伝子, 17 の染色体領域が疾患リスクとして登録されている。このうち *CNTNAP2* は, 同じく自閉症リスク遺伝子である *NRXN* のスーパーファミリーとして知られ, 神経細胞-グリア細胞間接着に関与する。米国コロニア大学の Marcx と Xu の両グループ<sup>1)</sup> は *CNTNAP2* の c.3709DelG 変異を有する自閉症患者から iPS 細胞を樹立, その後, 大脳皮質オルガノイドを作製し, 胎生期における大脳皮質形成を *in vitro* で解析した<sup>1)</sup>。本研究では *CNTNAP2* が主に胎生期大脳皮質の興奮性神経細胞に存在すること, また患者由来オルガノイドの表現型として表面積の顕著な増加を報告している。興味深いことに, 筆者

Identification of cell type-specific autism risk factors by single-cell, organoid studies

\* 神戸大学医学部生理学・細胞生物学講座生理学分野 (〒 650-0017 神戸市中央区楠町 7 丁目 5 番 1 号) Jun Nomura, Toru Takumi : Department of Physiology and Cell biology, Kobe University School of Medicine, 7-5-1, Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan

【野村 淳 E-mail : jnomura@med.kobe-u.ac.jp】

【内匠 透 E-mail : takumit@med.kobe-u.ac.jp】

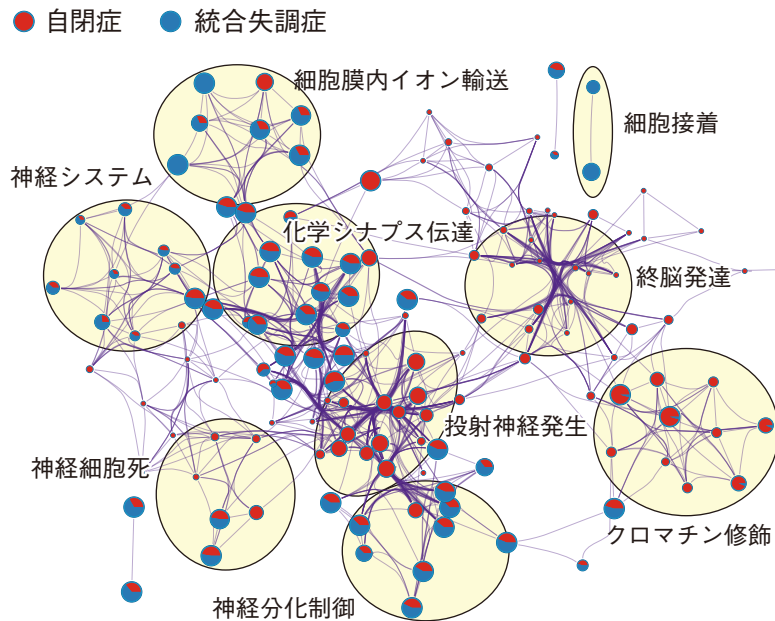


図1 自閉症および統合失調症に関与する生物学的プロセスのネットワーク  
大規模データにより得られた自閉症および統合失調症リスク遺伝子をもとにしたネットワーク解析。(文献5を一部改変)

らがゲノム編集技術を用いて新規に作製した（自閉症と相関する）1q21.1 重複ヒト ES 細胞由来大脳皮質オルガノイドもコントロール細胞に比べ有意なサイズの増加を認めている<sup>6)</sup>。さらに、Muotri, Iakoucheva の研究グループ<sup>12)</sup>は、自閉症ともっとも高い相関を示す染色体領域の一つである 16p11.2 の欠失をもつ患者から iPS 細胞を樹立し、大脳皮質オルガノイドを作製した結果、やはりオルガノイドのサイズ増加を認めている<sup>12)</sup>。これまでの臨床研究の結果から、自閉症の信頼しうる表現型の一つとして「生後発達期における頭囲の上昇」が報告されているが<sup>8)</sup>、今年度新たに発表された筆者らを含む3つの異なるグループによる研究結果はこれを支持する結果といえる。自閉症における大脳皮質サイズの増加に関する分子メカニズムは、Muotri ら<sup>12)</sup>が胎児期に皮質形成にかかわる「神経細胞移動」の異常、すなわち低分子 G タンパク質の一つである「RhoA」分子の過剰な活性化であることを突き止めている<sup>12)</sup>。現段階での脳オルガノイドはヒト脳を十分に再現したものとはいえないため、より *in vivo* 脳に近いプロトコルの開発が期待されるが、少なくとも自閉症に共通する表現型の同定、そして表現型に関与する分子メカニズムの同定においてシングルセル解析とオルガノイド実験系は有用かつ重要な系であることに変わりはない。

一方、シングルセル解析は、近年世界中をパンデミックに陥れた coronavirus disease 2019 (COVID-

19) でも積極的に取り入れられ、現在、COVID-19 が及ぼす影響はさまざまな臓器・組織レベルでシステムティックに解析が進んでいる<sup>9)</sup>。現在 (2021 年 12 月時点)、「COVID-19」をキーワードに PubMed 検索を行うと、20 万件超という驚異的な論文数がヒットするが、さらに「single-cell」というキーワードを加えた場合でも 500 件超がヒットする。実際、「single-cell」というキーワードにヒットする論文すべてが（厳密な意味で）シングルセル解析を行っているわけではないが、COVID-19 の影響は呼吸器系にとどまらず、脳を含む非呼吸器系まで及ぶことから、各組織の細胞群をセルタイプ別に解析し、シングルセルレベルで COVID-19 の病態生理を考察することは理に適っている。

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) の感染メカニズムは、すでに分子レベルで明らかとなっている。始めに SARS-CoV-2 は自身もつスパイクタンパク質である S1 を介し、ホストの angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) 受容体に結合する。その後、カルシウム依存性セリンエンドプロテアーゼである FURIN と II 型膜貫通型セリンプロテアーゼである transmembrane protease, serine 2 (TMPRSS2) のスパイクタンパク質切断による過程を経てウイルスキャプシドと宿主細胞が融合し、SARS-CoV-2 が宿主細胞へと侵入する<sup>3)</sup>。ACE2 および FURIN, TMPRSS2 の組織での発現は、(脳では比較的低いものの) ユビキタスであること



果は、患者で認められる精神神経疾患表現型はウイルスの直接的影響（侵入）ではない可能性を示唆している。しかし、SARS-CoV-2 の脳内侵入を示唆する論文もあり<sup>10)</sup>、今後さらなる検証が必要といえる。実際、この結果に関し論文の筆者らは、感染初期に SARS-CoV-2 が脳内へ侵入し、時間経過とともに消失した可能性も示唆している<sup>13)</sup>。

神経精神疾患様表現型に影響を及ぼす脳内分子メカニズムとしては、脈絡叢でのケモカインシグナルが末梢の炎症シグナルを中枢に媒介し、T細胞が脳内に侵入する可能性を示している。健常者の大脳皮質ではT細胞は検出されないことから、脳内T細胞の増加は疾患病理と関与する可能性がある。なお、発達期における脳内T細胞と神経精神疾患の相関は今後さらに発展していくと考えられるが、最近では、加齢により脳内T細胞が増加すること、脳内T細胞は末梢T細胞とは性質が異なること（特にTCRレパトリーおよびインターフェロン $\gamma$ の発現レベル）、さらに脳内T細胞はインターフェロン $\gamma$ シグナルにより神経幹細胞の増殖を抑制し、神経新生を負に制御することが明らかとなっている<sup>2)</sup>。本論文の興味深い点として、患者脳内での遺伝子発現と大脳皮質表層（2/3層）の興奮性神経細胞およびVIP抑制性神経細胞の間に相関が認められたことが挙げられる。自閉症患者死後脳を用いたシングルセル解析<sup>14)</sup>、さらに筆者らの自閉症モデル細胞を用いたシングルセル解析（論文投稿準備中）でも大脳皮質表層（2/3層）興奮性神経細胞と自閉症の間に高い相関を認めていることから、大脳皮質層特異的興奮性神経細胞の機能不全と認知機能、精神機能との関係は注目すべき点といえる。なお、神経精神疾患のGWASリスクバリエーションとの相関研究では、不安、認知機能障害に加え、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）といった神経変性疾患、うつ、ADHD、双極性障害、統合失調症といった精神疾患まで幅広い相関が認められ、SARS-CoV-2の脳、精神機能への影響は想像以上に複雑であることが伺われる。さらに今回のシングルセル解析からは、興奮性・抑制性神経細胞のみならず、各種グリア細胞、幹細胞、内皮系細胞、間葉系細胞まで神経精神疾患様病態に関与することが明らかとなった。細胞間の比較からは、特にアストロサイトの関与が高いことも明らかとなった。なお、今回はページ数の関係上、COVID-19をターゲットとした肺オルガノイドに触れられないが、薬剤のスクリーニングおよび薬効評価においてオルガノイドが有効なモデルであることが実証されている<sup>4)</sup>。

現在シングルセル解析は、一生物学解析手法として確立、認知された感がある。2015年にスティーブ・マッキヤロル、デビット・ワイツ、マーク・カーシュナーがDrop-seqを報告して以降、実に短期間で膨大なデータを研究ソサイエティーに提供してきた。精神疾患研究においても、昨今のシングルセル解析により疾患表現型に影響を及ぼす細胞種が（興奮性および抑制性）神経細胞に限らず、グリア細胞、各種幹細胞、血管内皮系細胞、末梢免疫細胞等、末梢細胞にまで多岐に渡ることが示唆されている。今後、時系列変化に応じた（中枢および末梢を含む）全細胞の機能（変化、疾患による変性）をシステムティックに解析したデータが整備される可能性がある。特にこれらは、他のオミックス解析と組み合わせることにより信頼しうるデータベースとして創薬、疾患研究に貢献することが期待される。

本総説に開示すべき利益相反は存在しない。また、記載された筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。

## 文 献

- 1) de Jong JO, Llapashtica C, Genestine M, et al (2021) Cortical overgrowth in a preclinical forebrain organoid model of CNTNAP2-associated autism spectrum disorder. *Nat Commun*, 12 : 4087.
- 2) Dulken BW, Buckley MT, Negrodo PN, et al (2019) Single-cell analysis reveals T cell infiltration in old neurogenic niches. *Nature*, 571 : 205-210.
- 3) Jackson CB, Farzan M, Chen B, et al (2021) Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Epub ahead of print. doi : <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.
- 4) Mallapaty S (2021) The mini lungs and other organoids helping to beat COVID. *Nature*, 593 : 492-494.
- 5) Nomura J, Mardo M and Takumi T (2021) Molecular signatures from multi-omics of autism spectrum disorders and schizophrenia. *J Neurochem*, 159 : 647-659.
- 6) Nomura Y, Nomura J, Nishikawa T, et al (2021) Reciprocal differentiation via GABAergic components and ASD-related phenotypes in hES with 1q21.1 CNV. *BioRxiv*. Epub ahead of print. doi : <https://doi.org/10.1101/2021.09.13.460033>.
- 7) 野村淳, 内匠透 (2020) 自閉症基礎研究を加速させる新技術とその展望. *日本生物学的精神医学会誌*, 31 : 71-75.
- 8) Sacco R, Militerni R, Froli A, et al (2007) Clinical,

- morphological, and biochemical correlates of head circumference in autism. *Biol Psychiatry*, 62 : 1038–1047.
- 9) Schultze JL and Aschenbrenner AC (2021) COVID-19 and the human innate immune system. *Cell*, 184 : 1671–1692.
- 10) Song E, Zhang C, Israelow B, et al (2021) Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J Exp Med*, 218 : e20202135.
- 11) Taquet M, Geddes JR, Husain M, et al (2021) 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19 : a retrospective cohort study using electronic health records. *Lancet Psychiatry*, 8 : 416–427.
- 12) Urrusti J, Zhang P, Moran-Losada P, et al (2021) Collection : Cortical organoids model early brain development disrupted by 16p11.2 copy number variants in autism. *Mol Psychiatry*. Epub ahead of print. doi : <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01289-6>.
- 13) Yang AC, Kern F, Losada PM, et al (2021) Dysregulation of brain and choroid plexus cell types in severe COVID-19. *Nature*, 595 : 565–571.
- 14) Velmeshev D, Schirmer L and Jung D (2019) Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science*, 364 : 685–689.

---

---

■ ABSTRACT

**Identification of cell type-specific autism risk factors by single-cell, organoid studies**

Jun Nomura, Toru Takumi

*Department of Physiology and Cell biology, Kobe University School of Medicine*

Current advances of single-cell resolution analyses such as “single-cell RNA sequencing (scRNA-seq)”, followed by chromatin structure (chromatin accessibility) analysis by “ATAC-seq”, cell membrane (surface) protein analysis by “CITE-seq”, and “gene expression analysis with spatial gene expression information on the tissue sections” enable us to realize multimodal omics analysis for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. Combined with other methods such as 3D brain organoids, these techniques have discovered a better understanding of in vivo gene functions and pathophysiology of human brain diseases. These techniques have been explained the previously unknown molecular and cellular-specific mechanism of neuropsychiatric and neurodevelopmental disorders. In this review, we introduce the latest findings of autism spectrum disorder (autism) and novel coronavirus infection (COVID-19) from the single-cell analysis.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 33 (2) : 48–52, 2022)

---

---