

ジャーナルクラブ

2024/01/28

中村賢佑

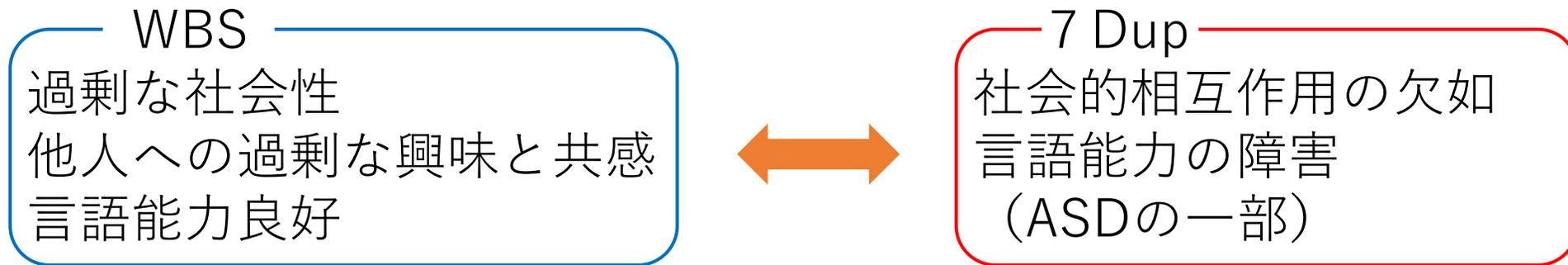
➤ [Sci Adv. 2023 Dec;9\(48\):eadh2726. doi: 10.1126/sciadv.adh2726. Epub 2023 Nov 29.](#)

***GTF2I* dosage regulates neuronal differentiation and social behavior in 7q11.23 neurodevelopmental disorders**

*GTF2I*量は7q11.23神経発達障害における神経分化と社会的行動を調節する

Introduction

- 7q11.23のコピー数変異 (CNV)
 - 欠失 (1コピー) → Williams症候群 (WBS)
 - 重複 (3コピー) → 7q11.23微小重複症候群 (7 Dup)



先行研究では、
一般転写因子 I (*GTF2I*) は認知行動表現型のメディエーターである。
また、*GTF2I*は*LSD1*と結合して転写を抑制するとわかっている。

Introduction

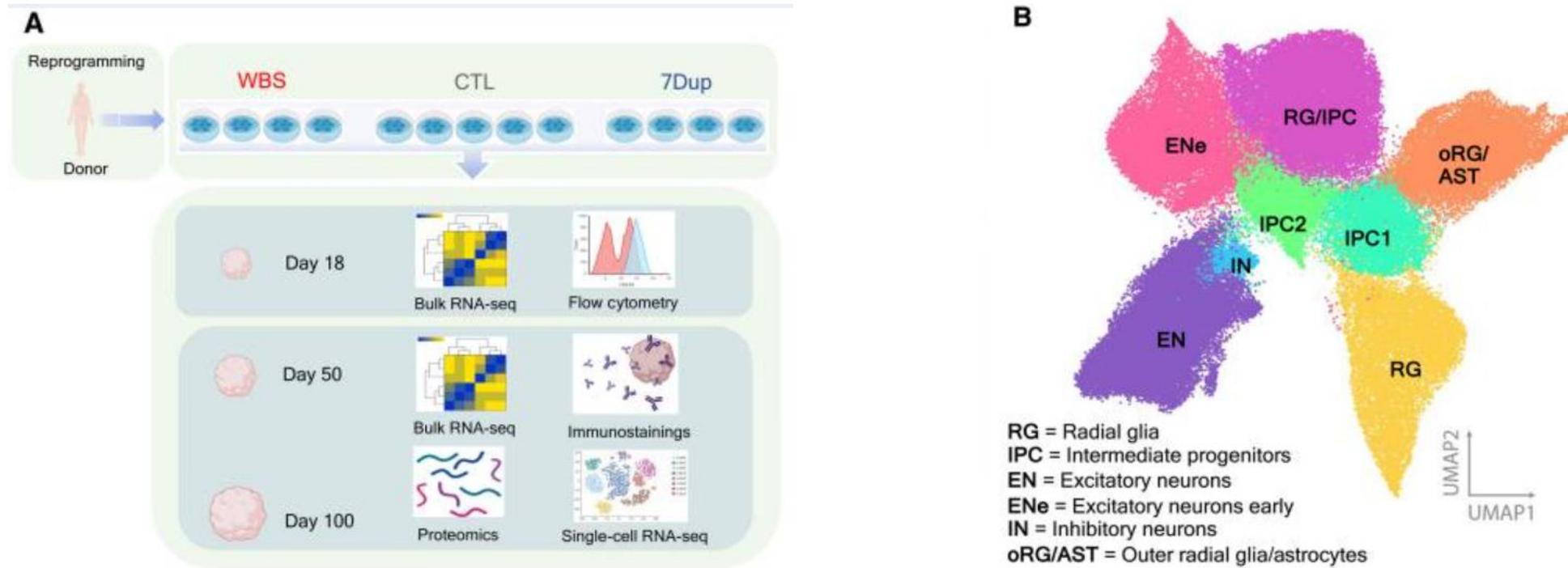
この研究では…

- WBSと7 Dupの皮質発達における7q11.23CNVの影響を系統的に分析



- CNVにより前駆細胞の増加とニューロンの成熟動態が変化する
- GTF2I量の変化だけでも神経分化変化を再現できる
- GTF2I量の増加によりLSD1阻害で回復するASD様行動を引き起こす

Fig1. 7q11.23CNVのCOにおける細胞集団組成

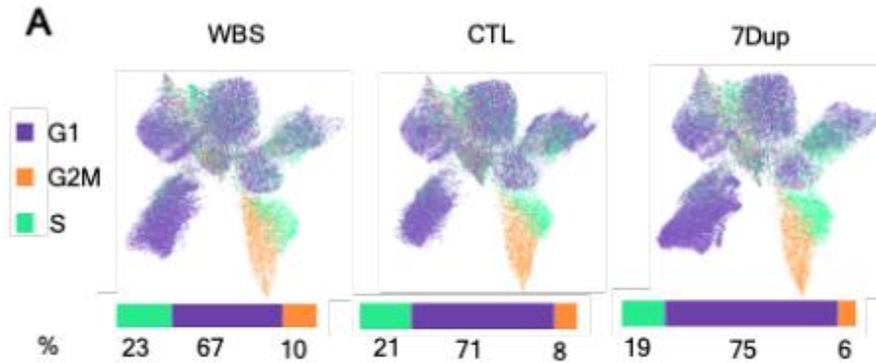


WBS, 7 Dup患者,健常者からiPS細胞を培養し、皮質オルガノイド (CO) を作製。

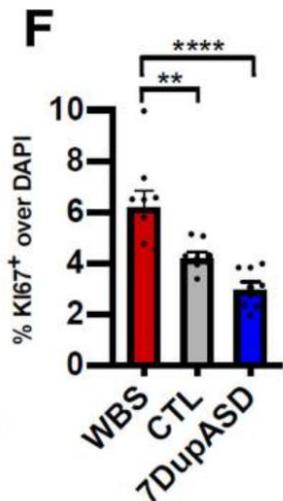
50,100日目のCOで転写プロファイリングを行い、8つの細胞集団を特定。

Fig1. 7q11.23CNVのCOにおける細胞集団組成

細胞周期関連遺伝子を調べると…

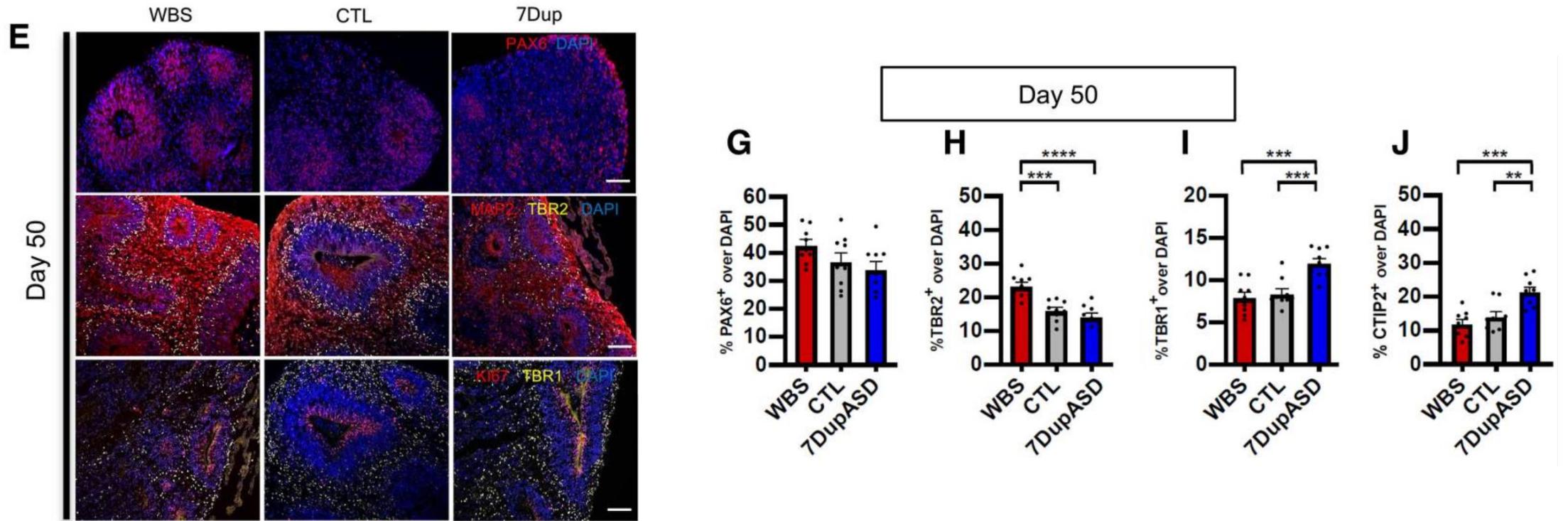


S + G2M期の割合がWBSと 7 Dupで対照的。
(50日目)



50日目COをKi67（細胞増殖マーカー）で免疫染色
→WBSで増殖が亢進しているのに対し、7Dupでは低下している。

Fig1. 7q11.23CNVのCOにおける細胞集団組成



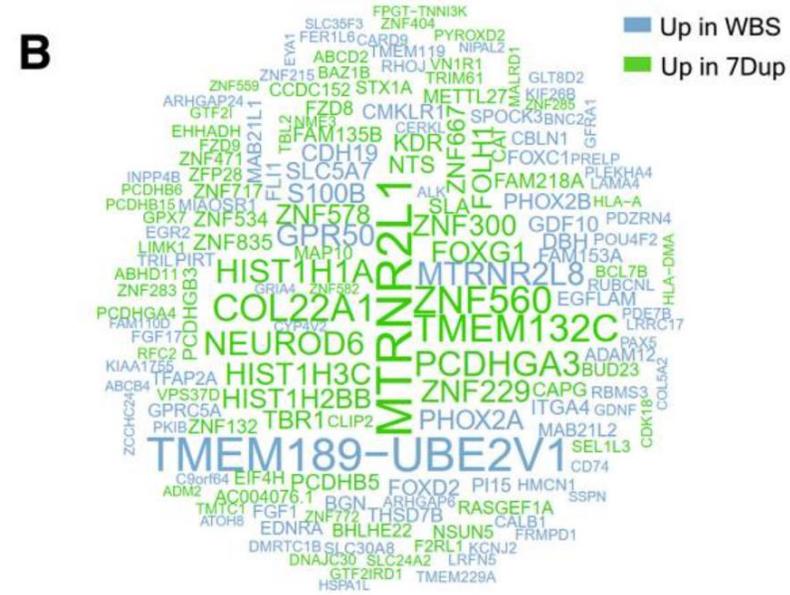
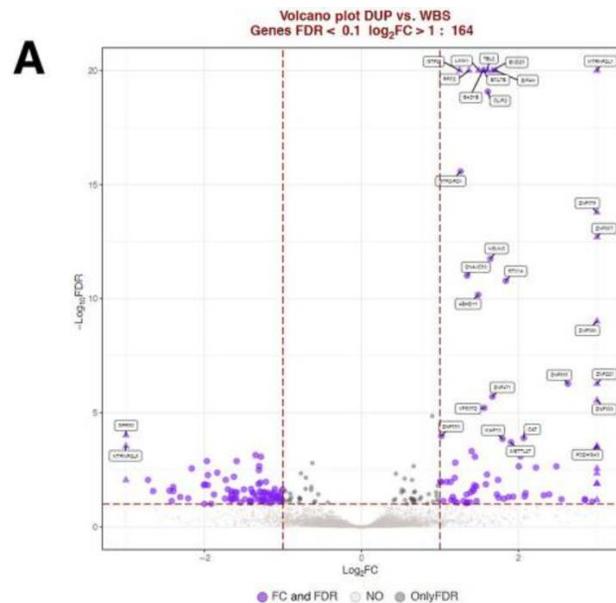
前駆細胞と成熟ニューロンの存在量を定量的に検証するために50日目COで免疫染色
 →PAX6⁺前駆細胞、TBR2⁺中間前駆細胞はWBSで多い。
 TBR1⁺、CTIP2⁺（V、VI層マーカー）の有糸分裂後ニューロンは7Dupで多い。

Fig2. 7q11.23CNVによる神経発生の不均衡

Fig1: 7q11.23遺伝子座内の遺伝子量の不均衡が、前駆細胞の増加とニューロン集団の出力の動態を変化させ、皮質形成に影響を与える。



Fig2: 7q11.23CNVにより起こる転写調節異常を特定したい

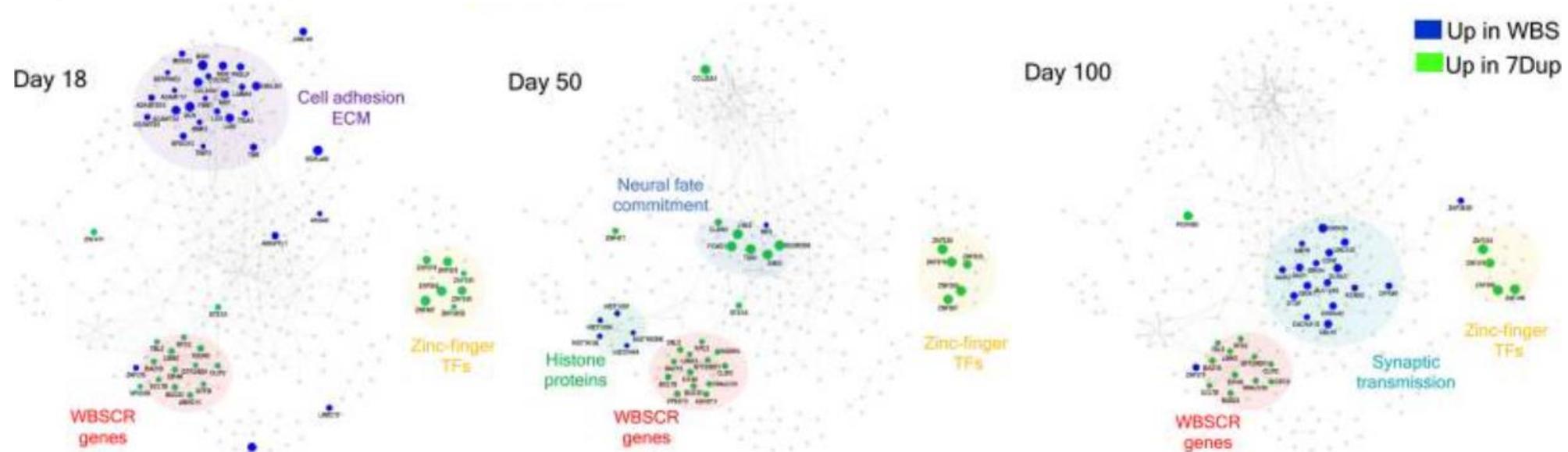


18,50,100日目COでバルク
トランスクリプトーム解析

→164の差次的発現遺伝子
が同定された

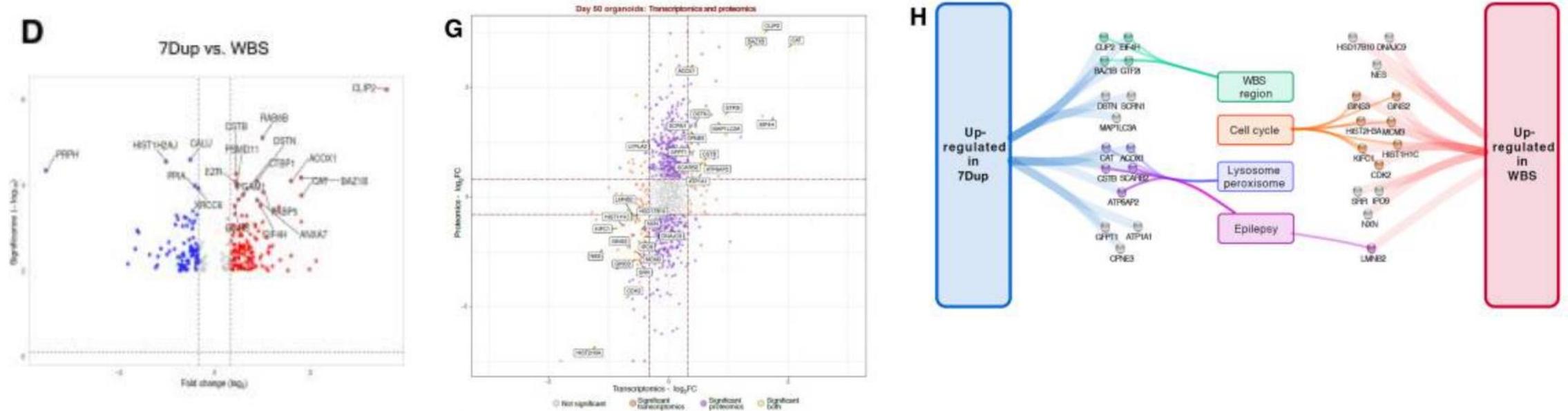
Fig2. 7q11.23CNVによる神経発生の不均衡

時間ごとに解析すると…



神経発達症候群の公開遺伝子データベースとの重複を分析。
→ 7q11.23CNVによって転写調節される遺伝子とASDやその他の疾患原因遺伝子に顕著な重複が見られた。

Fig2. 7q11.23CNVによる神経発生の不均衡



- ニューロン不均衡の原因となるCNV依存性タンパク質発現変化を明らかにするために、プロテオーム解析を行った。
- トランスクリプトームとプロテオームの重複は30個
- 7Dupでは7q11.23のサブセット、WBSでは細胞周期制御に関するセットが増加していた

Fig3. 遺伝子発現量の不均衡は神経分化を促進する

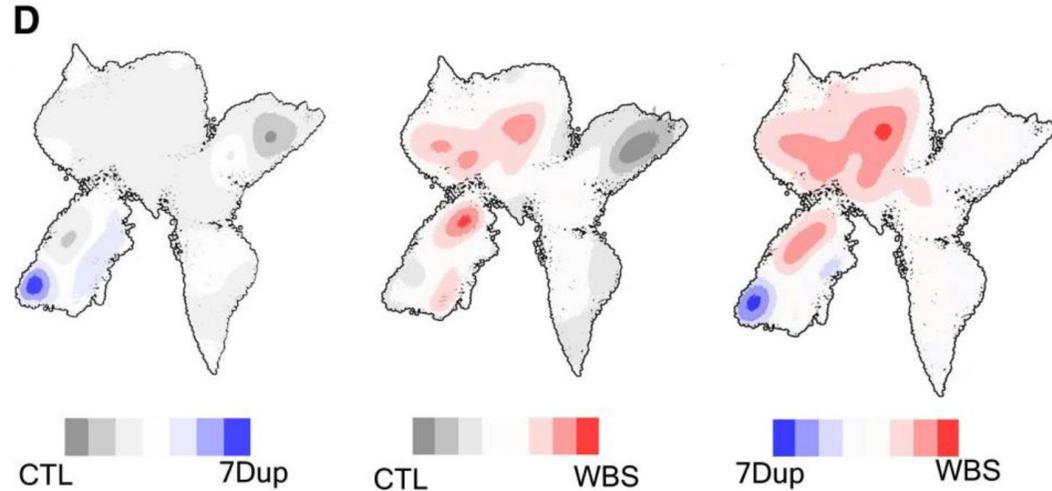
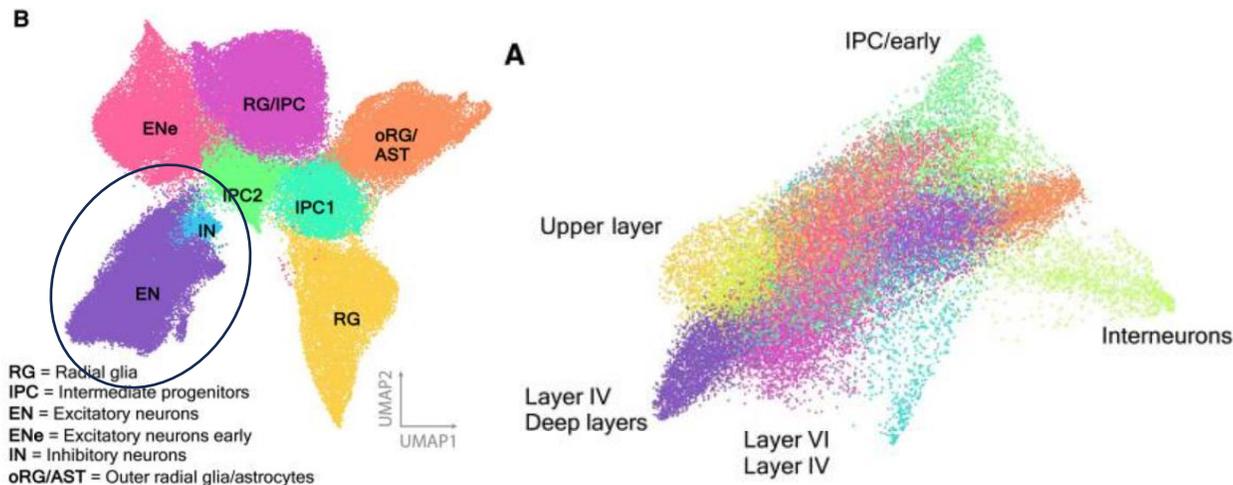
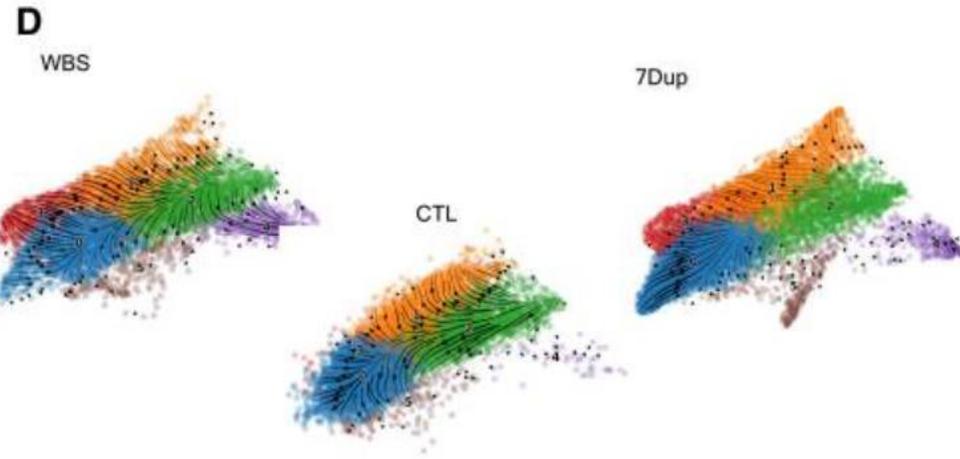
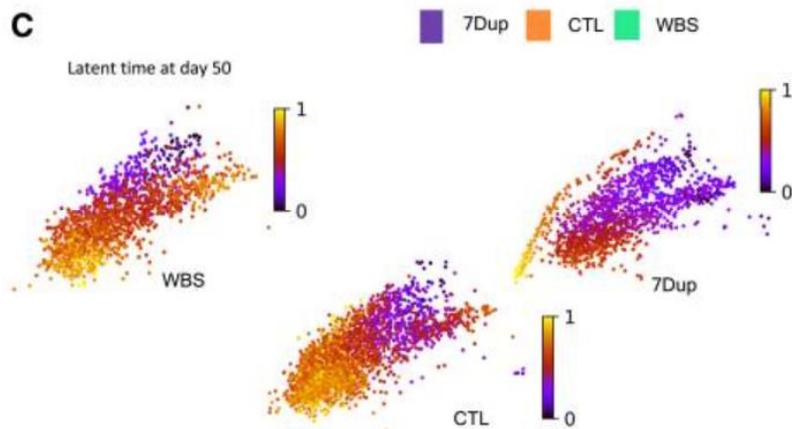
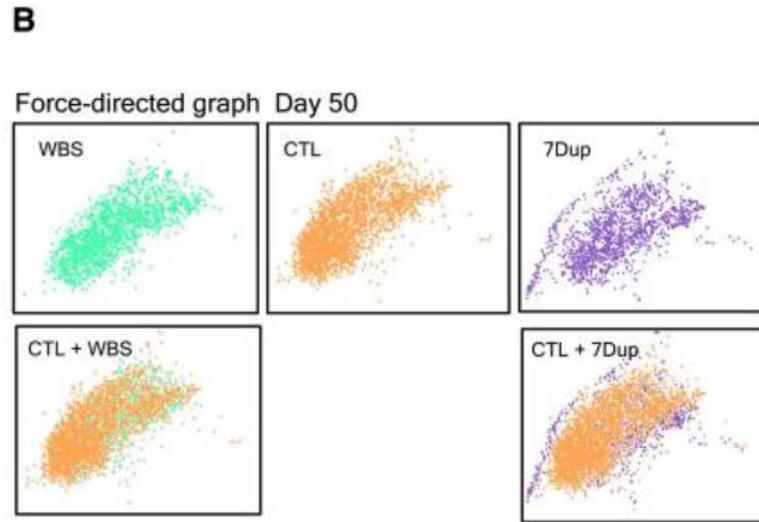


Fig1D:WBSと7DupではEN全体の割合に差はないが、特定の亜集団で7Dupが多い



ENとINを抜き出してさらに部分集団に分けた

Fig3. 遺伝子発現量の不均衡は神経分化を促進する



7Dupでは神経分化が促進されているか？

→50日目で比較

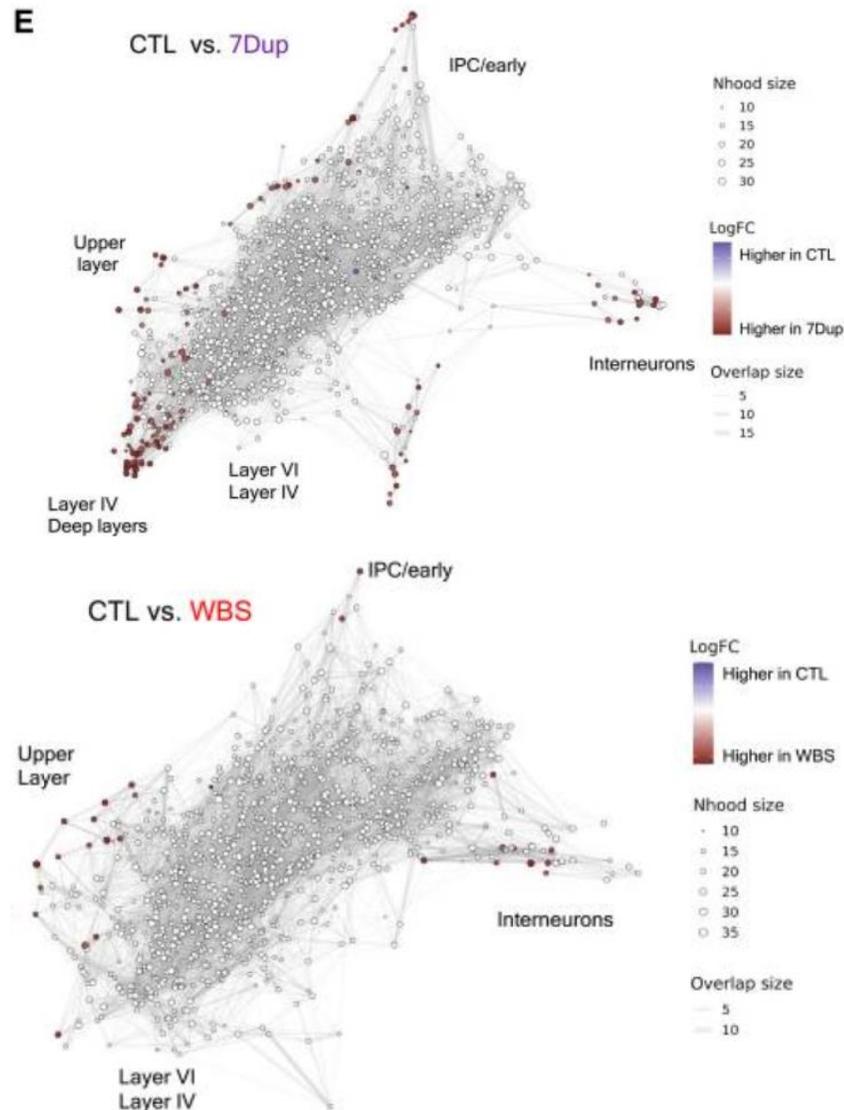
B:7Dupではアイデンティティが確立した細胞が多い

→CellRankアルゴリズムを適用し、神経発生軌跡の確率を計算

C:7Dupは偏りが強い

D:7Dupは分化した細胞が定常状態にある

Fig3. 遺伝子発現量の不均衡は神経分化を促進する

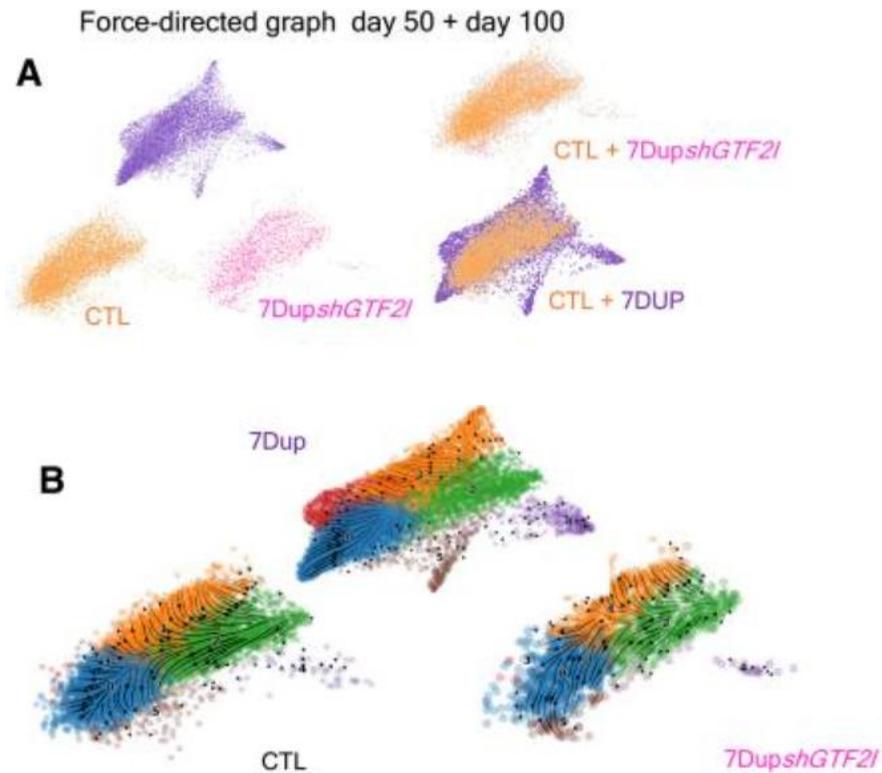


→力学モデルグラフにおける細胞の存在量と比較
E:7Dupは成熟したニューロン集団を表すノードに多い



- WBS、7Dupの両方でより分化したニューロンを含むクラスターに富んでいる
- 7Dupは50日目のより成熟したニューロンが占める領域に多く細胞が存在するので、神経分化が促進されているといえる。

Fig4. *GTF2*重複が早期の神経分化を促す



7DupCOにおいて*GTF2I*を下方制御するために、shRNAを7Dup iPS細胞株に導入し分化させた。

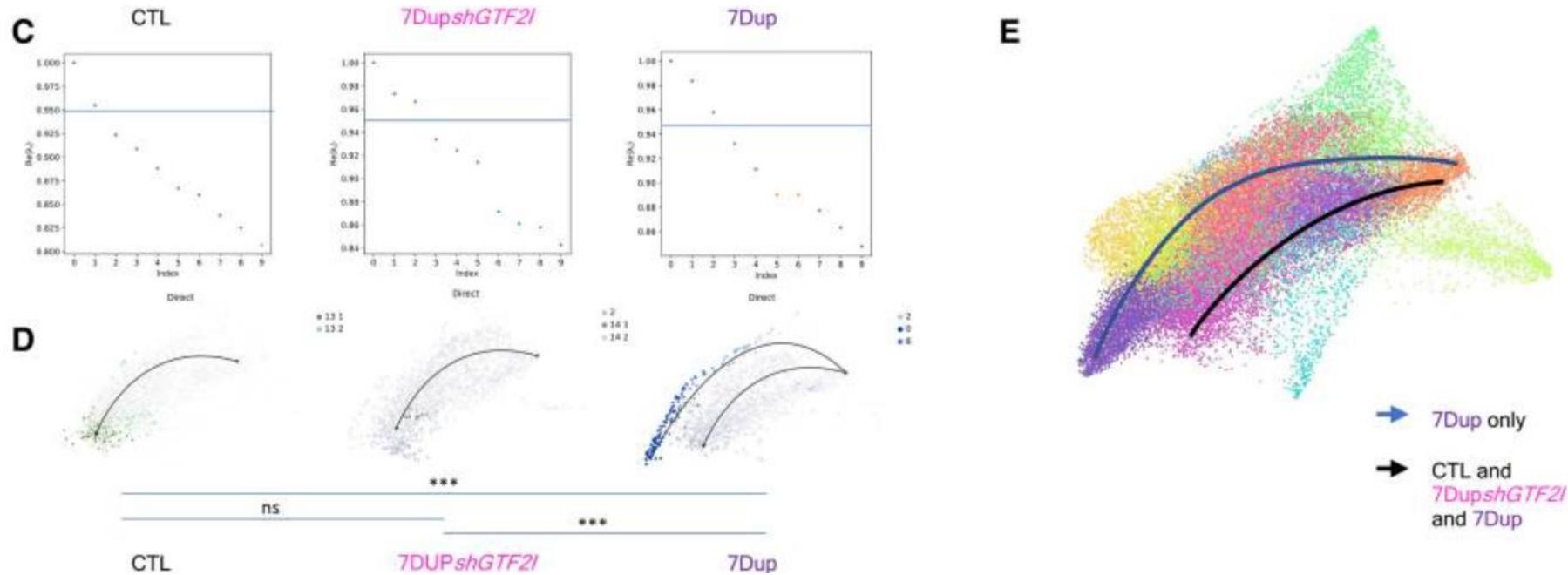
A:shRNA導入COでは成熟ニューロンが減少。コントロールと似た形になった。

B:RNA速度を重ね合わせると、shRNA導入COでは分化奇跡がコントロールと一致した。



*GTF2I*の量が7Dupにおける神経分化の加速に重要である

Fig4. *GTF2*重複が早期の神経分化を促す



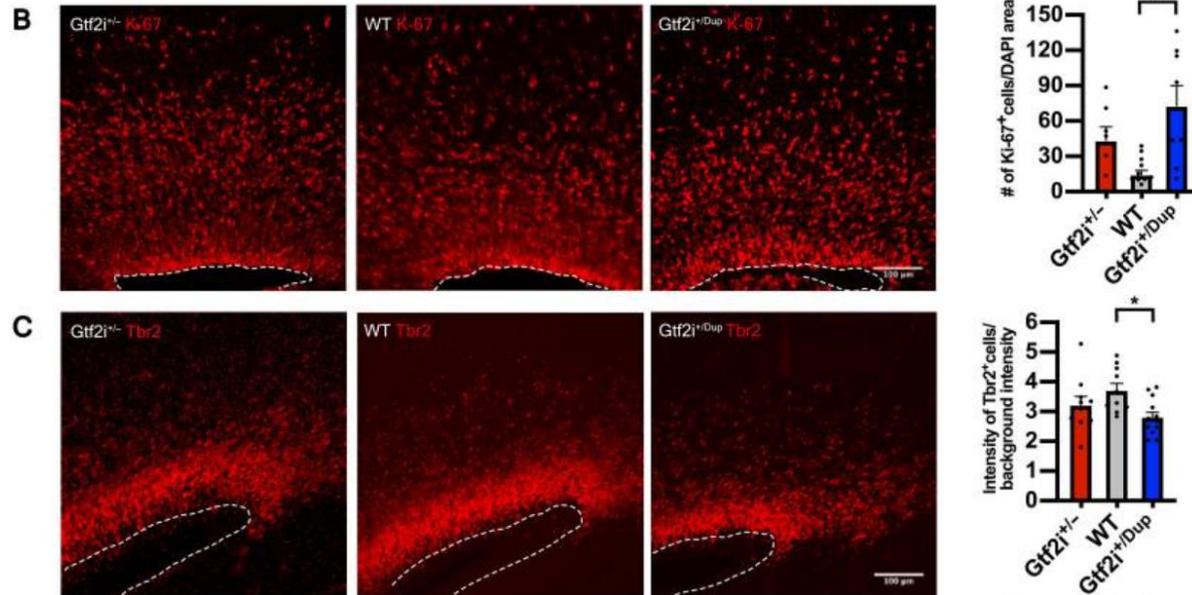
それぞれのCOでCellRank分析により神経発生軌跡の確率を計算
→7Dupでは50日目にIV～深層マーカーが豊富なニューロンに偏りを持つが、
shRNA導入COではこの偏りが見られない。



*GTF2*が重複しているために7DupCOは早熟な神経分化となる。

Fig5. *Gtf2i*の増加がマウスの神経分化を促進する

*GTF2I*量が神経発達過程の変化の重要なエフェクターであることが分かったので、これを利用して7Dupにおける認知行動症状を改善できるか検討する。



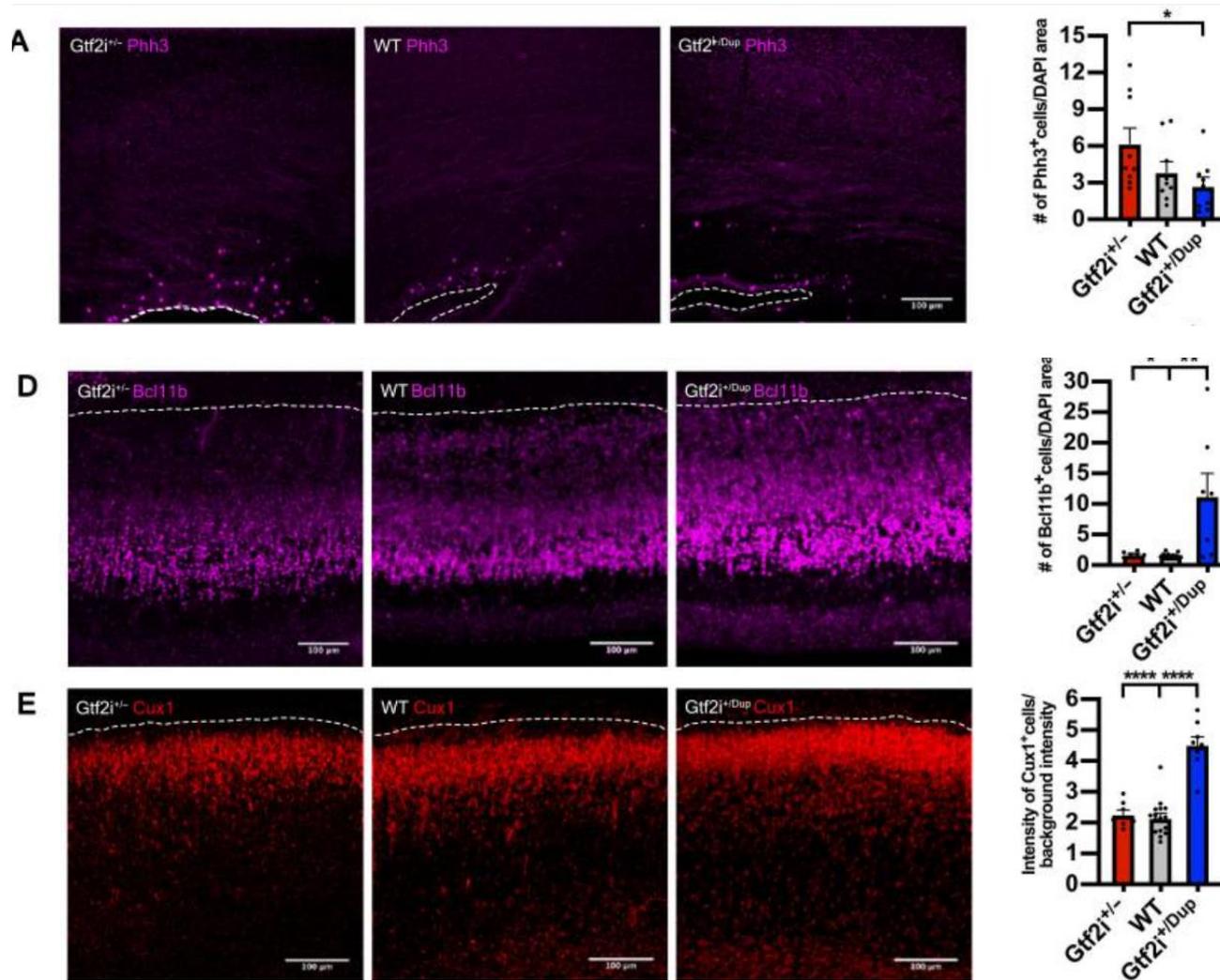
WT、+/-、+ /Dupのマウスを作製。
モデルマウス (E17.5) とヒトCOが同等な変化を示すか調べる

→Ki67⁺は+ /Dup、Tbr2はWTが多い

不一致の原因

- 種特異的な違い
- マウスではGTF2I遺伝子量のみが異なるが、ヒトCOではCNV全体が異なるため
- 胚発生の時期が合っていない

Fig5. *Gtf2i*の増加がマウスの神経分化を促進する



Phh3⁺が+/-で増加
= 有糸分裂中の神経前駆細胞が多い

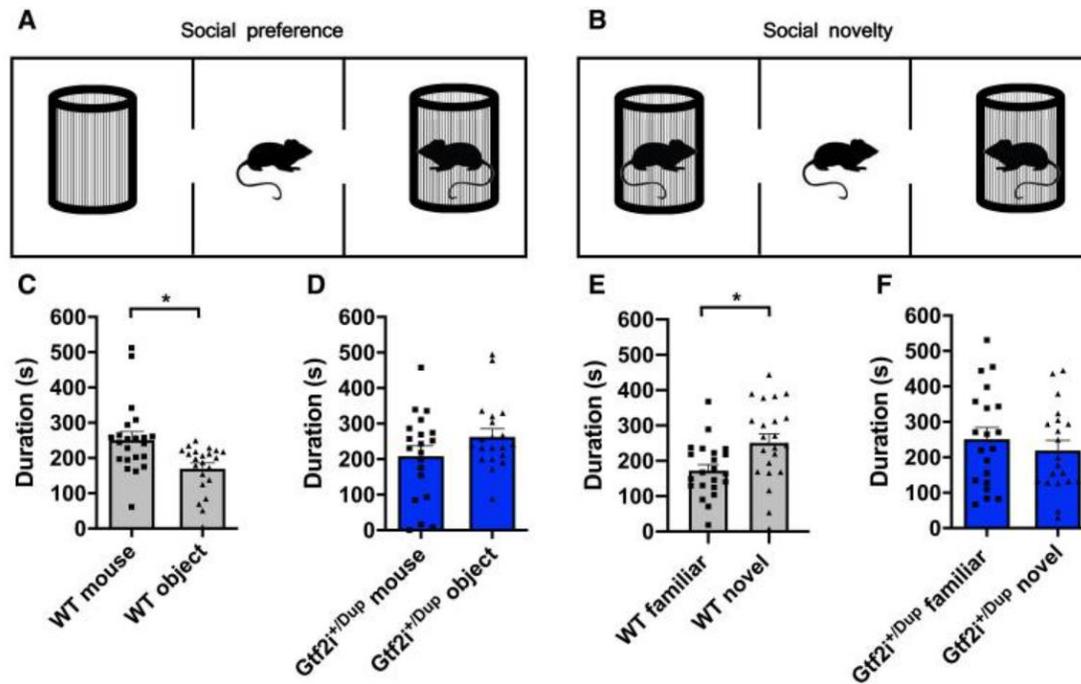
Bcl11b⁺ (V層)、Cux1⁺ (II, III層) が+1/Dupで増加
= 有糸分裂後のニューロンが多い



*Gtf2i*量増加が大脳皮質形成期における神経細胞の増殖・分化の動態に及ぼす強固な影響をin vivoで検証した

Fig6. *Gtf2i*の増加がASD様行動を引き起こす

これまで、ヒトの皮質形成における *GTF2I* の影響を解明し、マウスモデルで部分的に同等の表現型を検証した。



ASD様行動に対する *GTF2I* の影響を明らかにしたい

→3チャンバーテストで検証

WTマウスは同胞/新規マウスとより長時間過ごしたが、

+/*Dup*マウスはその傾向を示さなかった。

Fig6. LSD1阻害はASD様行動を改善する

先行研究より、GTF2IはLSD1と結合し遺伝子抑制することでASD様行動をもたらす。

- LSD1阻害剤を2週間経口投与したのちテスト
→社会的嗜好と社会的新規性の欠損が回復
- 2週間の休薬後テスト
→LSD1阻害の有益な効果が持続している



LSD1阻害は7Dupの治療介入の実行可能な経路として示された。

