

自閉症には、ヒト胚発生期中期の皮質深層投射ニューロンで共発現している遺伝子ネットワークが関与している。

Coexpression Networks Implicate Human Midfetal Deep Cortical Projection Neurons in the Pathogenesis of Autism

A. Jeremy Willsey,^{1,2} Stephan J. Sanders,^{1,2} Mingfeng Li,^{3,4} Shan Dong,^{1,5} Andrew T. Tebbenkamp,^{3,4} Rebecca A. Muhle,^{1,4,6} Steven K. Reilly,¹ Leon Lin,⁷ Sofia Fertuzinhos,^{3,4} Jeremy A. Miller,⁸ Michael T. Murtha,⁹ Candace Bichsel,^{3,4} Wei Niu,^{1,4,6} Justin Cotney,¹ A. Gulhan Ercan-Sencicek,^{6,9} Jake Gockley,¹ Abha R. Gupta,^{6,10} Wenqi Han,^{3,4} Xin He,¹¹ Ellen J. Hoffman,^{6,9} Lambertus Klei,¹² Jing Lei,¹³ Wenzhong Liu,¹ Li Liu,¹³ Cong Lu,¹³ Xuming Xu,^{3,4} Ying Zhu,^{3,4} Shrikant M. Mane,¹⁴ Ed S. Lein,⁸ Liping Wei,^{5,15} James P. Noonan,^{1,4} Kathryn Roeder,^{11,13} Bernie Devlin,^{12,*} Nenad Sestan,^{3,4,*} and Matthew W. State^{1,2,6,9,16,*}

¹Department of Genetics, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

²Department of Psychiatry, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA

³Department of Neurobiology, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

⁴Kavli Institute for Neuroscience, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

⁵Center for Bioinformatics, State Key Laboratory of Protein and Plant Gene Research, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

⁶Child Study Center, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

⁷Department of Computational Biology and Bioinformatics, Yale University, New Haven, CT 06511, USA

⁸Allen Institute for Brain Science, Seattle, WA 98103, USA

⁹Program on Neurogenetics, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

¹⁰Department of Pediatrics, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

¹¹Ray and Stephanie Lane Center for Computational Biology, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA 15213, USA

¹²Department of Psychiatry, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA

¹³Department of Statistics, Carnegie Mellon University, Pittsburgh, PA 15213, USA

¹⁴Yale Center for Genomic Analysis, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06417, USA

¹⁵National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China

¹⁶Department of Psychiatry, Yale School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA

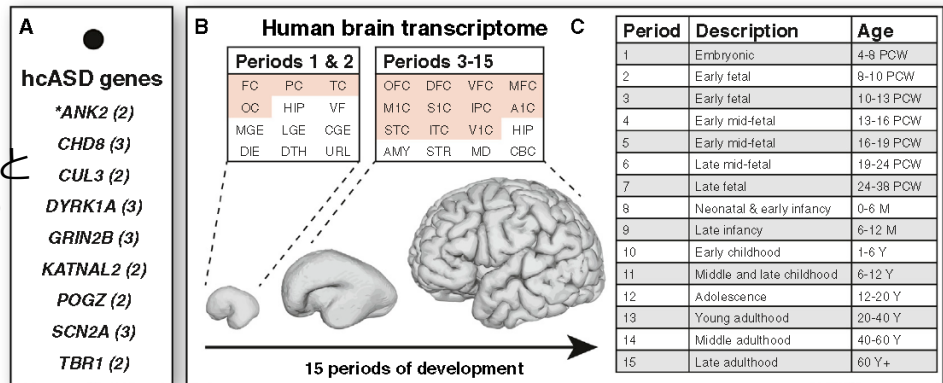
*Correspondence: devlinbj@upmc.edu (B.D.), nenad.sestan@yale.edu (N.S.), matthew.state@ucsf.edu (M.W.S.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.020>

Overview of Coexpression Analysis Workflow and Associated Data Set

Fig. 1

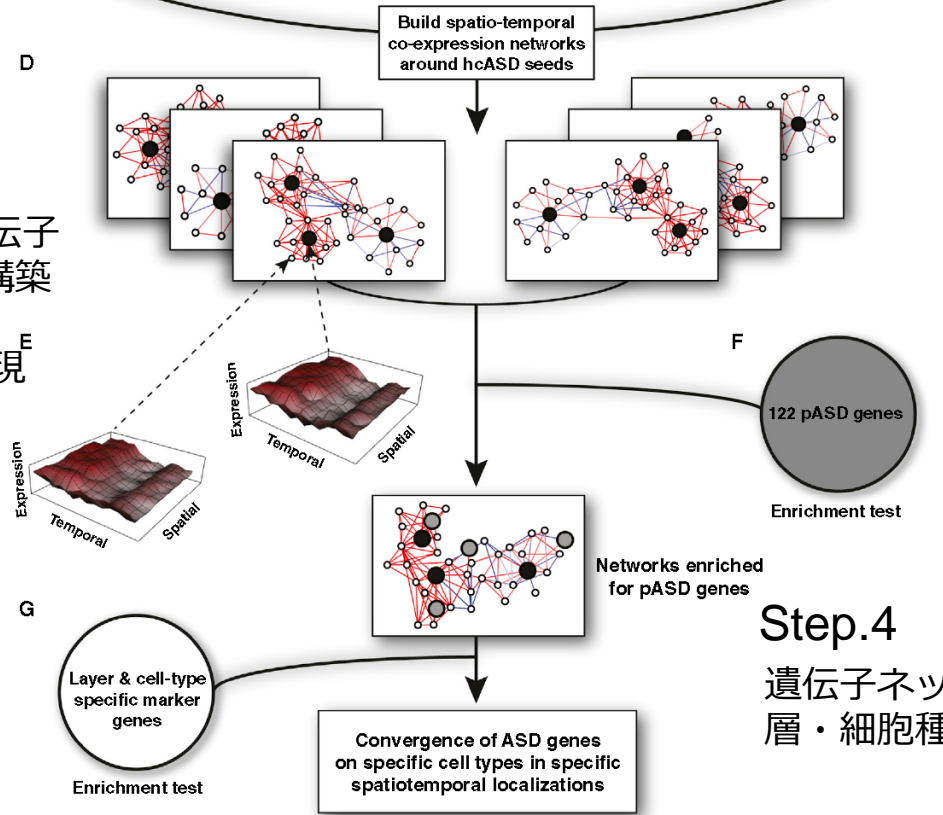
Step.1
 自閉症に強く関与している遺伝子(hcASD genes)と関与しそうな遺伝子(pASD gene)を見出す。



Step.2
 共発現解析のための網羅的遺伝子発現データセットの用意

Step.3

- ① 各脳領域・発達段階で hcASD geneを含む遺伝子共発現ネットワークを構築
- ② どの脳領域・発達段階に自閉症関連遺伝子の発現が高いのか調査。



Step.4
 遺伝子ネットワークがはたらいっている層・細胞種の同定

Identification of high confidence ASD (hcASD) Seed Genes

Fig. 1

高信頼度自閉症遺伝子の同定

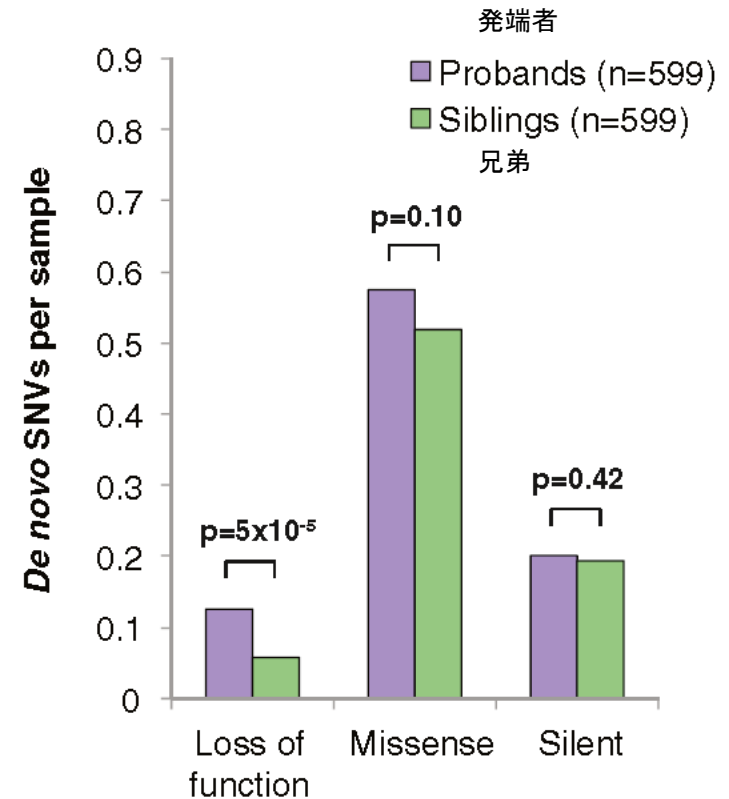
- ① 先行研究でわかっている自閉症患者がいる987家族を対象にエクソーム解析を行う。
- ② 新規にSimons Simplex Collectionに参加している56家族を対象にエクソーム解析を行う。

→ 合計144個の*de novo*機能欠損変異を同定。



1遺伝子につき、2個以上の機能欠損変異が入っているものをhc ASD遺伝子(有力な自閉症遺伝子候補)とする。

1個の機能欠損変異が入っているものをprobable ASD (pASD; 潜在的な自閉症遺伝子候補)とする。



Los of function

1. premature stop codon
2. splice-site disruption
3. frameshift insertion/deletion

Identification of high-confidence ASD (hcASD) Seed Genes

Fig. 1

高信頼度自閉症遺伝子の同定

A



hcASD genes

***ANK2 (2)**

CHD8 (3)

CUL3 (2)

DYRK1A (3)

GRIN2B (3)

KATNAL2 (2)

POGZ (2)

SCN2A (3)

TBR1 (2)

ANK2 (Ankyrin2, neuronal)

脳特異的アンキリン、神経線維の進展、ミエリン膜、シナプス形成
CHD8 (chromodomain helicase DNA binding protein)
ヒストンを呼び込み染色体構造を変化させる。

CUL3 (Cullin-3)

ユビキチンリガーゼ

DYRK1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-
regulated kinase 1A)

ダウン症候群の原因?

GRIN2B (N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B, NMDAR2B)

グルタミン酸レセプターサブユニット

KATNAL2 (katanin p60 subunit A-like 2)

機能不明

POGZ (ジンクフィンガードメインを備えた pogo 転位性エレメント由来
タンパク質)

動原体の形成・有糸分裂

SCN2A (sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1)

電位依存性ナトリウムチャンネルαサブユニット2型

TBR1 (T-box brain1)

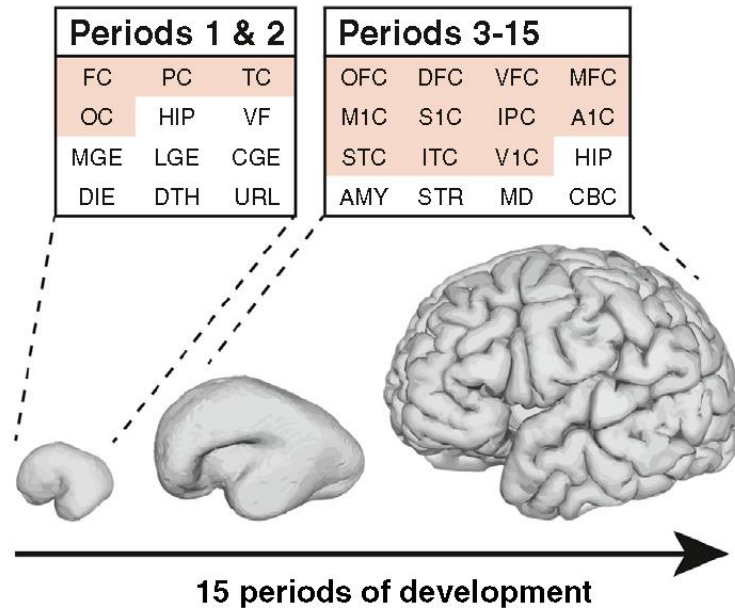
転写調節因子、大脳皮質6層に発現

括弧内は、変異の数

新規に見つかったものを含めて、9個の自閉症関連遺伝子(hcASD)と122個の自閉症候補遺伝子(pASD)を見出した。

Constructing Spatiotemporal Coexpression Networks

Fig. 2



Period	Description	Age
1	Embryonic	4-8 PCW
2	Early fetal	8-10 PCW
3	Early fetal	10-13 PCW
4	Early mid-fetal	13-16 PCW
5	Early mid-fetal	16-19 PCW
6	Late mid-fetal	19-24 PCW
7	Late fetal	24-38 PCW
8	Neonatal & early infancy	0-6 M
9	Late infancy	6-12 M
10	Early childhood	1-6 Y
11	Middle and late childhood	6-12 Y
12	Adolescence	12-20 Y
13	Young adulthood	20-40 Y
14	Middle adulthood	40-60 Y
15	Late adulthood	60 Y+

Table 2 | Ontology and nomenclature of analysed brain regions and NCX areas

Periods 1 and 2	Periods 3-15
FC, frontal cerebral wall	OFC, orbital prefrontal cortex DFC, dorsolateral prefrontal cortex VFC, ventrolateral prefrontal cortex MFC, medial prefrontal cortex M1C, primary motor (M1) cortex
PC, parietal cerebral wall	S1C, primary somatosensory (S1) cortex IPC, posterior inferior parietal cortex
TC, temporal cerebral wall	A1C, primary auditory (A1) cortex STC, superior temporal cortex ITC, inferior temporal cortex
OC, occipital cerebral wall	V1C, primary visual (V1) cortex
HIP, hippocampal anlage	HIP, hippocampus
—	AMY, amygdala
VF, ventral forebrain MGE, medial ganglionic eminence LGE, lateral ganglionic eminence CGE, caudal ganglionic eminence	STR, striatum
DIE, diencephalon DTH, dorsal thalamus	MD, mediodorsal nucleus of the thalamus —
URL, upper (rostral) rhombic lip	CBC, cerebellar cortex

ARTICLE

doi:10.1038/nature10523

Spatio-temporal transcriptome of the human brain

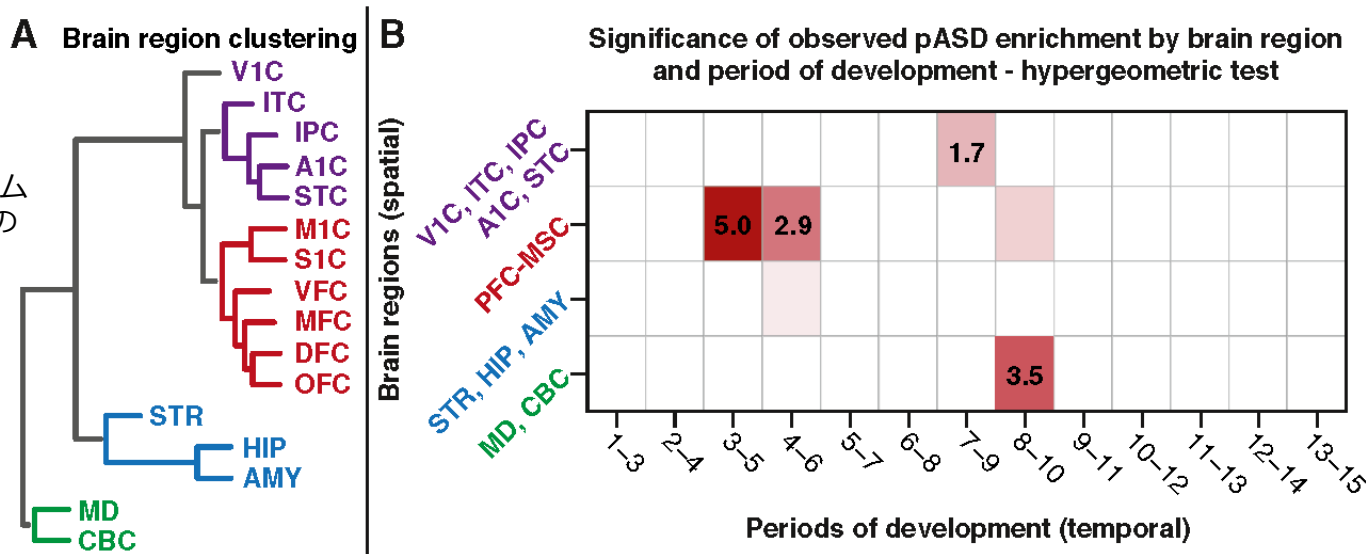
Hyo Jung Kang^{1*}, Yuka Imamura Kawasawa^{1*}, Feng Cheng^{1*}, Ying Zhu^{1*}, Xuming Xu^{1*}, Mingfeng Li^{1*}, André M. M. Sousa^{1,2}, Mihovil Pletikos^{1,3}, Kyle A. Meyer¹, Goran Sedmak^{1,4}, Tobias Guennel¹, Yurae Shin¹, Matthew B. Johnson¹, Željka Kršnik¹, Simone Mayer^{1,5}, Sofia Fertuzinhos¹, Sheila Umlauf⁶, Steven N. Ligo⁷, Alexander Vormtreyer⁸, Daniel R. Weinberger⁹, Shrikant Mane⁶, Thomas M. Hyde^{9,10}, Anita Huttner⁸, Mark Reimers⁴, Joel E. Kleinman⁹ & Nenad Sestan¹

15の発達段階、16領域の遺伝子発現データ(合計57人分)を解析に使用した。

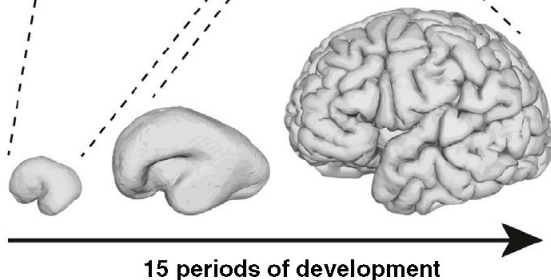
Constructing Spatiotemporal Coexpression Networks

Fig. 2

自閉症に関する脳領域と発達段階を特定するために、領域・発達段階のデータを整理する。



Periods 1 & 2			Periods 3-15			
FC	PC	TC	OFC	DFC	VFC	MFC
OC	HIP	VF	M1C	S1C	IPC	A1C
MGE	LGE	CGE	STC	ITC	V1C	HIP
DIE	DTH	URL	AMY	STR	MD	CBC



Period	Description	Age
1	Embryonic	4-8 PCW
2	Early fetal	8-10 PCW
3	Early fetal	10-13 PCW
4	Early mid-fetal	13-16 PCW
5	Early mid-fetal	16-19 PCW
6	Late mid-fetal	19-24 PCW
7	Late fetal	24-38 PCW
8	Neonatal & early infancy	0-6 M
9	Late infancy	6-12 M
10	Early childhood	1-6 Y
11	Middle and late childhood	6-12 Y
12	Adolescence	12-20 Y
13	Young adulthood	20-40 Y
14	Middle adulthood	40-60 Y
15	Late adulthood	60 Y+

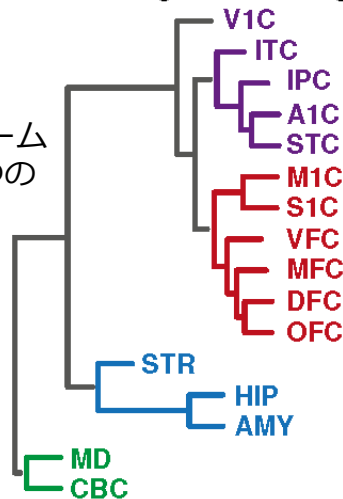
13の発達段階・4つの脳領域の合計52個のウィンドウを設けて解析を行う。

Constructing Spatiotemporal Coexpression Networks

Fig. 2

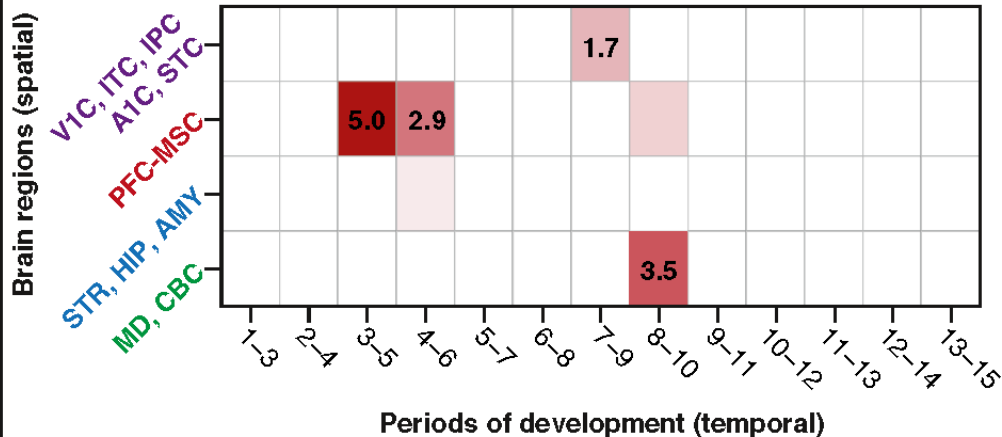
52の時空間windowを設定して、解析を行う。

A Brain region clustering



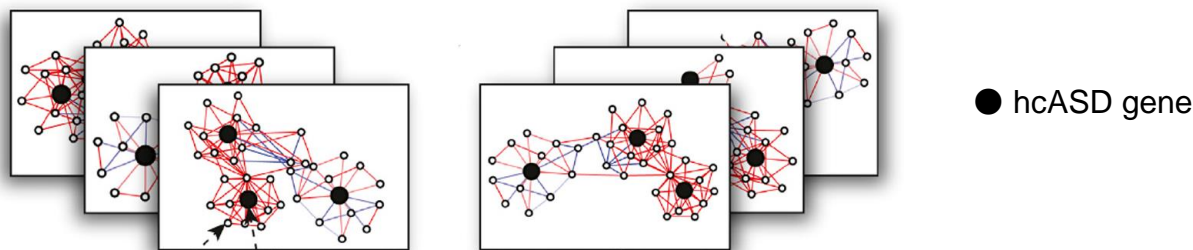
B

Significance of observed pASD enrichment by brain region and period of development - hypergeometric test

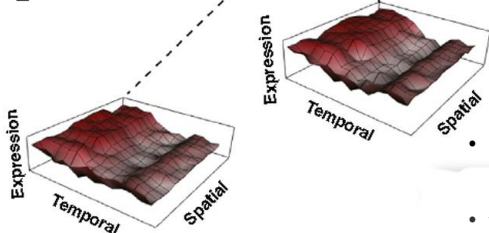


52window

D



E

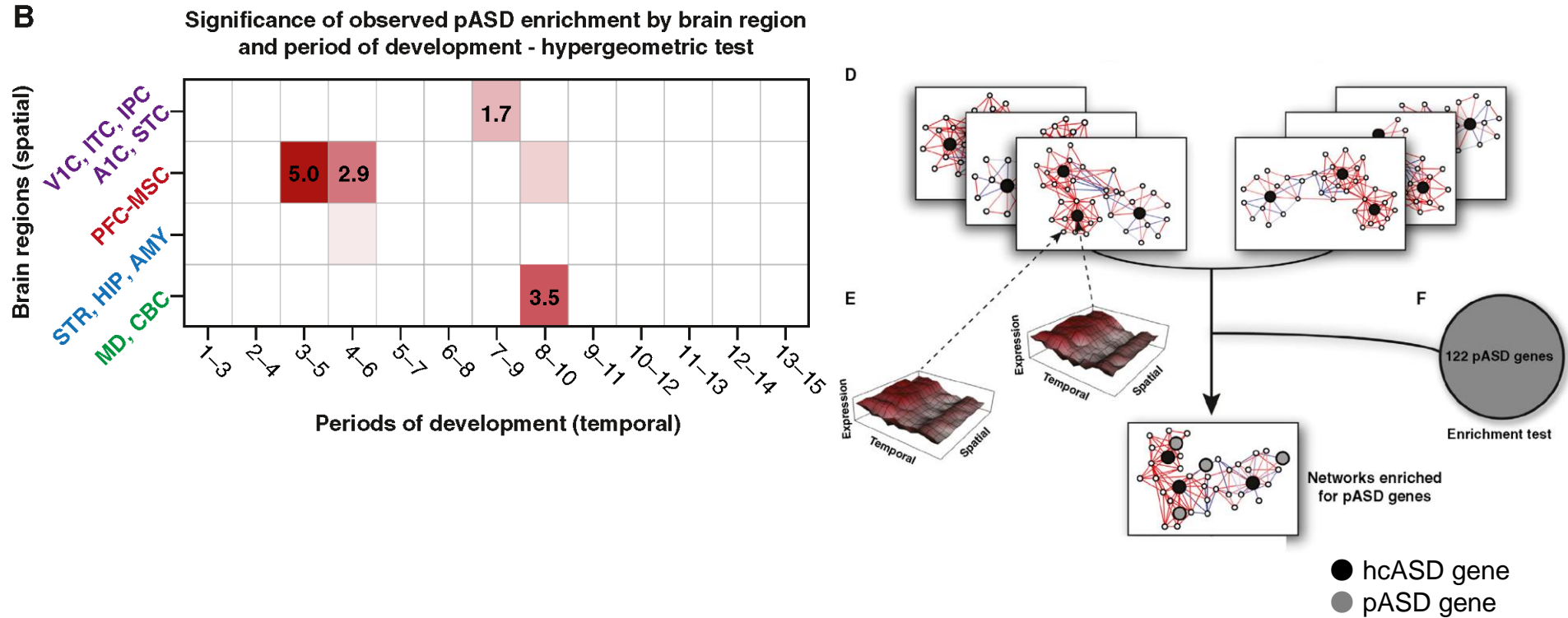


- 各window内で、9つのhcASDと16,947個(122個のpASD遺伝子も含む)の遺伝子発現を調べ、52個の遺伝子共発現ネットワークを構築する。
- 発現の相関係数が0.7以上のものを、hcASD遺伝子と共発現パートナーとして注目する。

pASD Gene Enrichment is Localized to Specific Spatiotemporal Networks

Fig. 2

52個の遺伝子共発現ネットワークの中に、自閉症関連遺伝子の発現が高いものは含まれているのか？
 →hcASD遺伝子をseedとして用い、pASD遺伝子が現れるwindowを調査する。



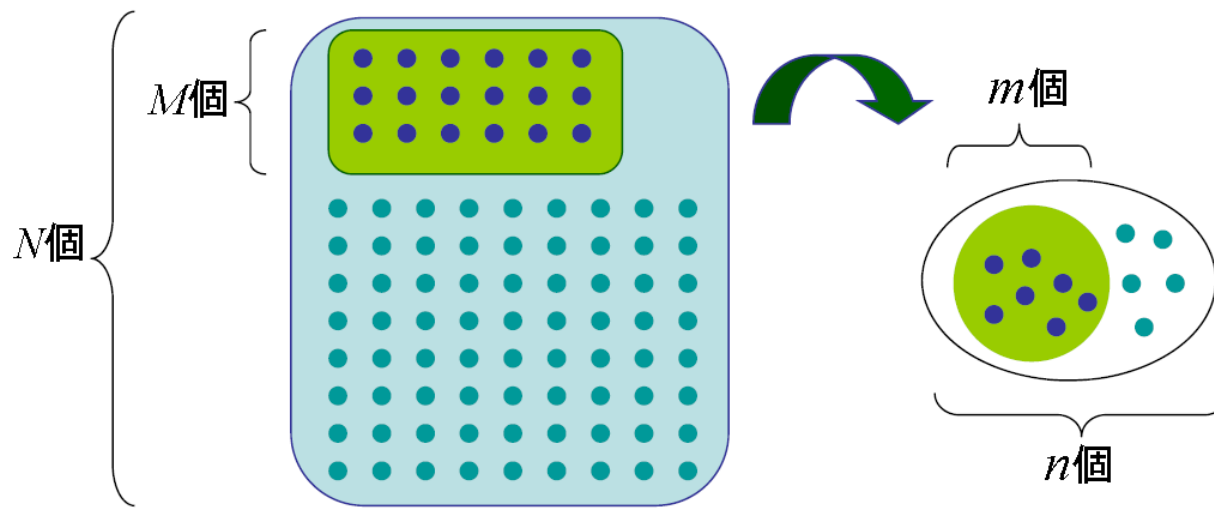
Hypergeometric testにより、4つのWindowでpASD遺伝子が共発現ネットワークに含まれている確率が高いことがわかった。

- 胚性10-19週のPFC-MSC(前頭葉-M1-S1)
- 胚性13-24週のPFC-MSC(前頭葉-M1-S1)
- 胚性24週-生後12ヶ月齢のV1C-STC(V1-IT-IP-A1-ST)
- 生後0日-6歳齢のMD-CBC(視床MD核-小脳)

超幾何分布を用いた検定

- N : 発現プロファイル(マイクロアレイ)中の全遺伝子数
- M : あるGO term Aとassociated gene関係にある遺伝子数
- n : あるクラスターに属する遺伝子数
- m : クラスター中でGO term Aにアノテーションされる遺伝子数
- この時, GO term Aの p -値は:

$$p(x \geq m) = \sum_{x=m}^n p(x) = \sum_{x=m}^n \frac{M C_x \times N-M C_{n-x}}{N C_n}$$

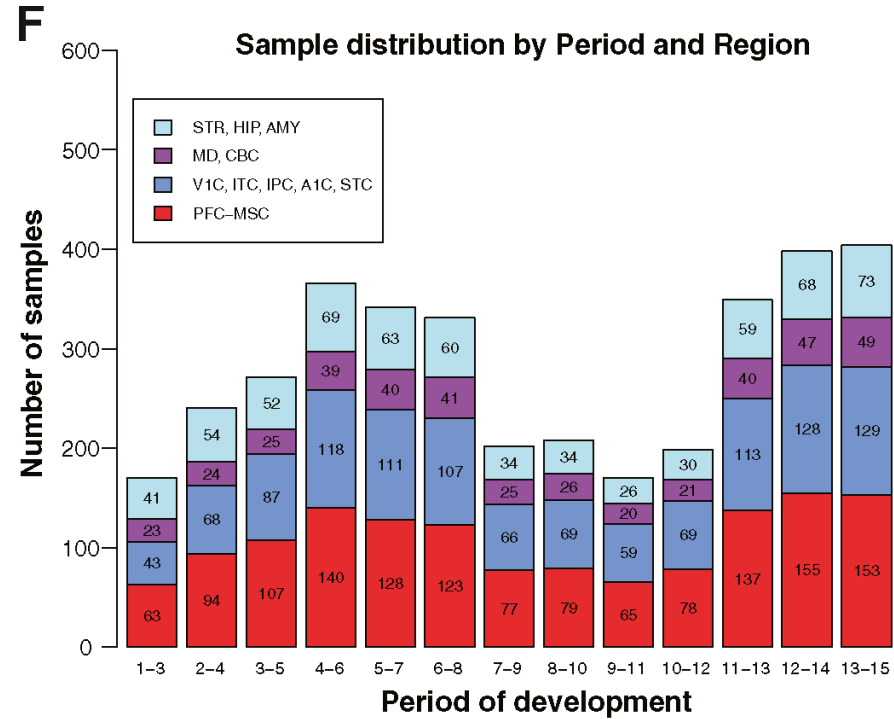
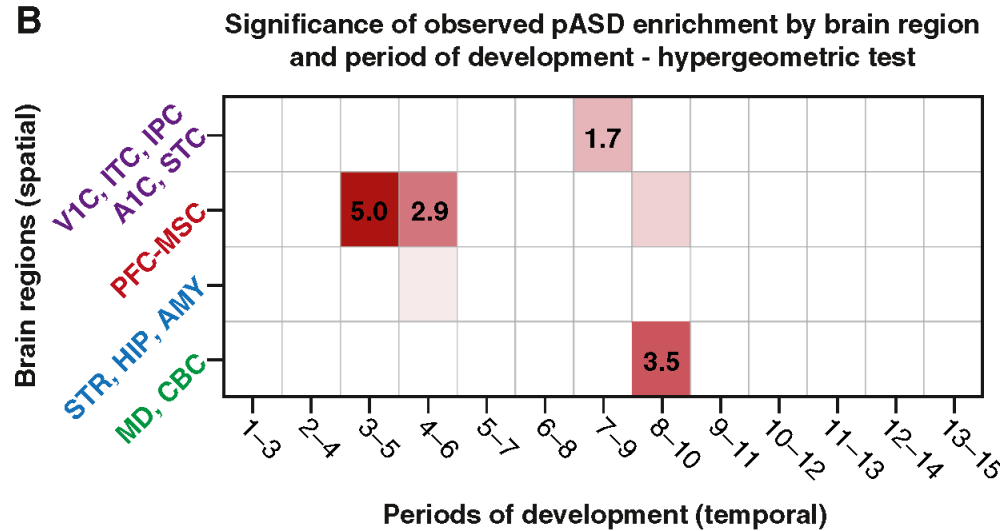


P値が0に近いほど、リストに存在する“GO term A”の出現頻度は不自然に高いといえる。

pASD Gene Enrichment is Localized to Specific Spatiotemporal Networks

Fig. 2

52個の遺伝子共発現ネットワークの中に、自閉症関連遺伝子の発現が高いものは含まれているのか？
 →hcASD遺伝子をseedとして用い、pASD遺伝子が現れるwindowを調査する。



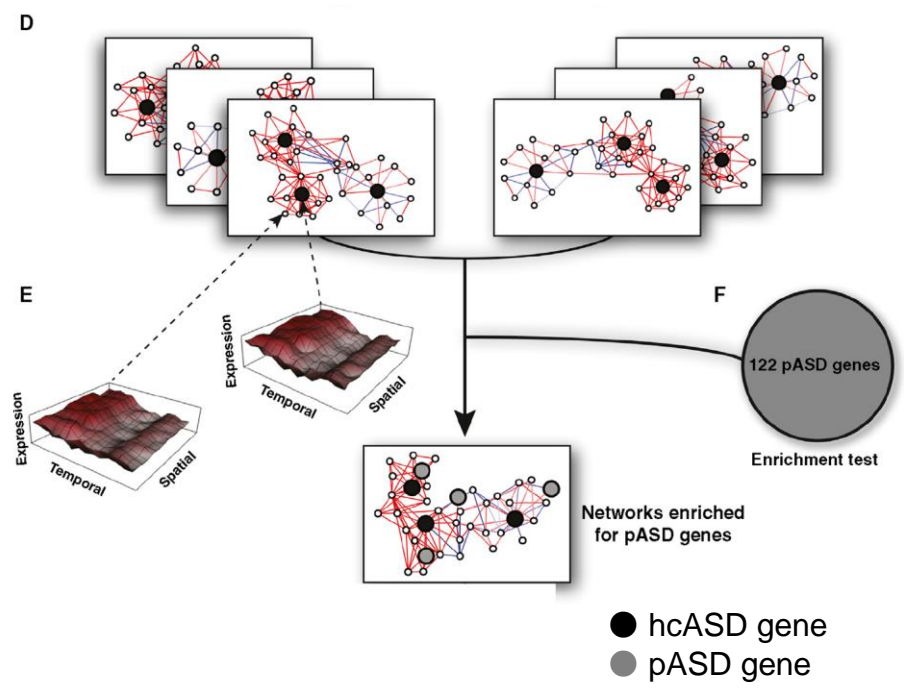
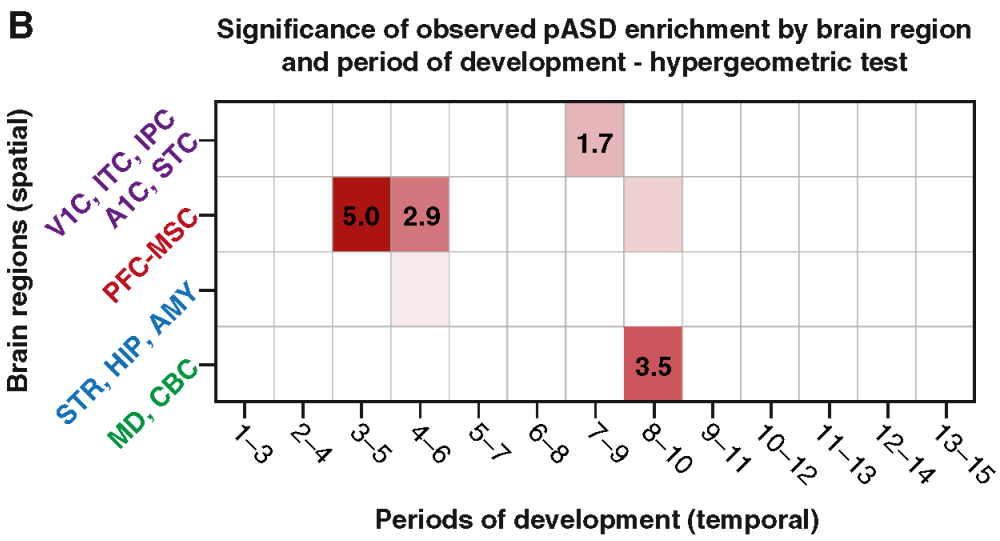
Hypergeometric testにより、4つのWindowでpASD遺伝子が共発現ネットワークに含まれている確率が高いことがわかった。

- ・胚性10-19週のPFC-MSC(前頭葉-M1-S1)
- ・胚性13-24週のPFC-MSC(前頭葉-M1-S1)
- ・胚性24週-生後12ヶ月齢のV1C-STC(V1-IT-IP-A1-ST)
- ・生後0日-6歳齢のMD-CBC(視床MD核-小脳)

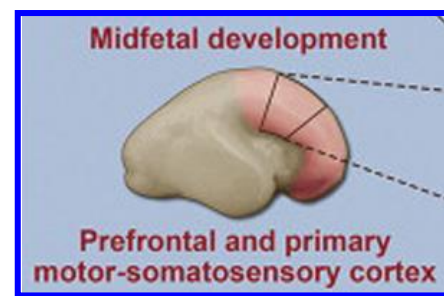
pASD Gene Enrichment is Localized to Specific Spatiotemporal Networks

Fig. 2

52個の遺伝子共発現ネットワークの中に、自閉症関連遺伝子の発現が高いものは含まれているのか？
 →hcASD遺伝子をseedとして用い、pASD遺伝子が現れるwindowを調査する。



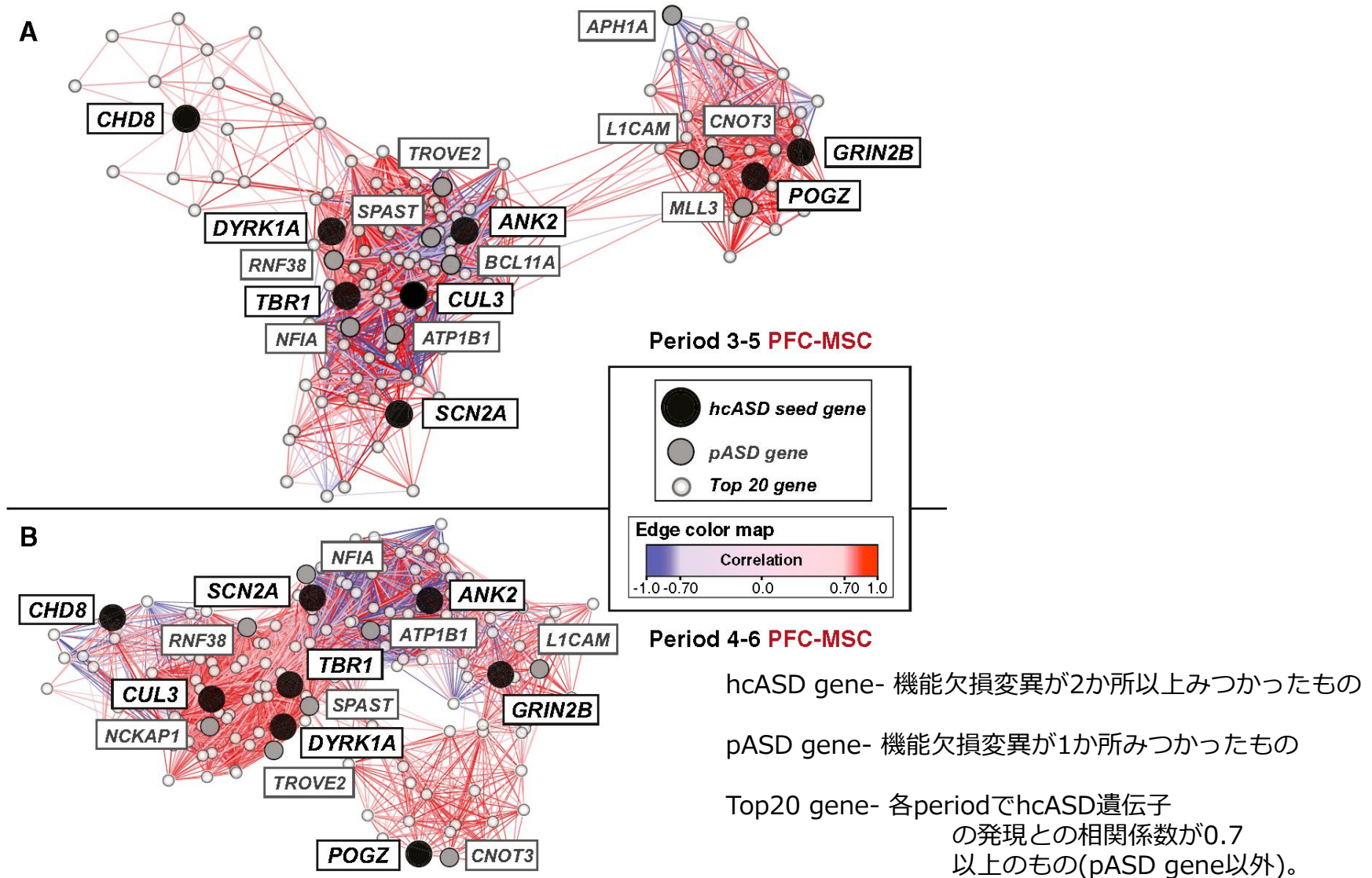
Period3-5, 4-6 (midfetal; 胚発生中期)の前頭葉-M1-S1領域で、pASD geneが遺伝子発現ネットワークに多くふくまれている確率が高いことがわかった。以後の解析は、この時空間windowに注目して解析を行う。



The Midfetal Networks Capture Biologically Meaningful Data

Fig. 3

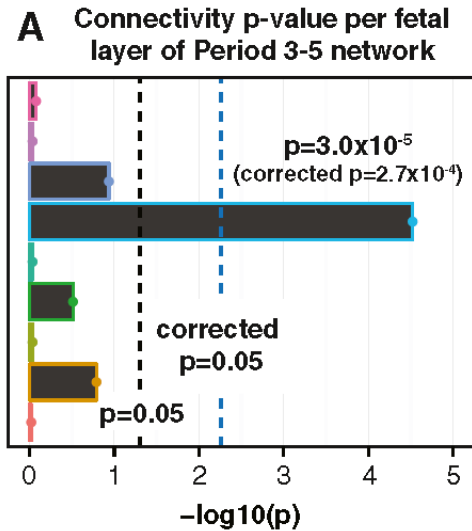
Period 3-5, 4-6におけるPFC-MSC遺伝子発現ネットワーク



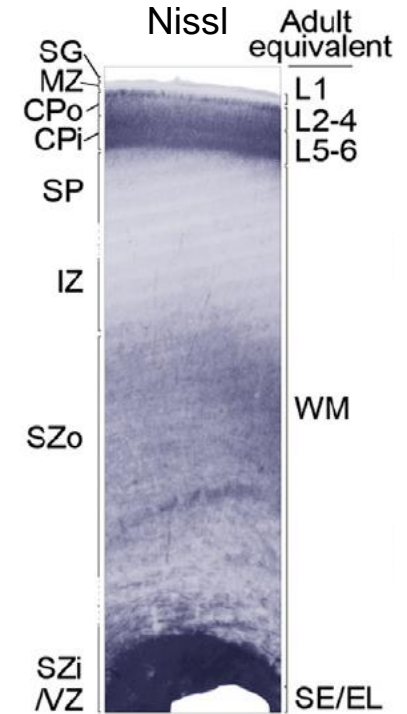
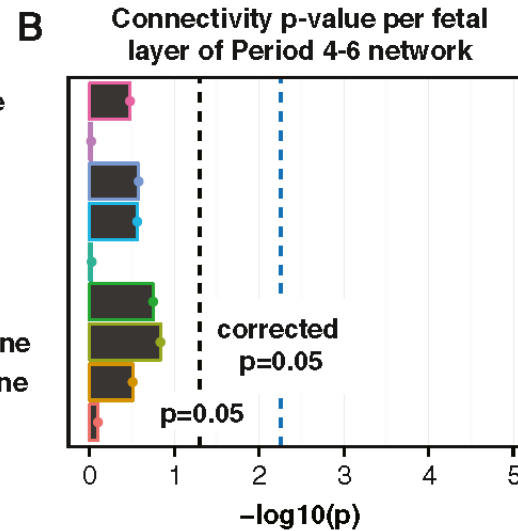
他の遺伝子と最も多く結合をもつhcASD gene TBR1(T-box brain1)は、ASDにおいて重要かも？

Human Midfetal Laminar-Specific Expression Data Implicate Inner Cortical Plate in ASD

Fig. 4 PFC-MSC遺伝子発現ネットワークを、ヒト胚発生期の層特異的なマイクロアレイデータと比較する。



Subpial granular zone
Marginal zone
Outer cortical plate
Inner cortical plate
Subplate
Intermediate zone
Outer subventricular zone
Inner subventricular zone
Ventricular zone



Period3-5では、皮質板内側部(新皮質の5-6層にあたる)の遺伝子共発現ネットワーク内の相関が上昇している。(Period4-6のネットワークでは、どの層でも観察されない。)

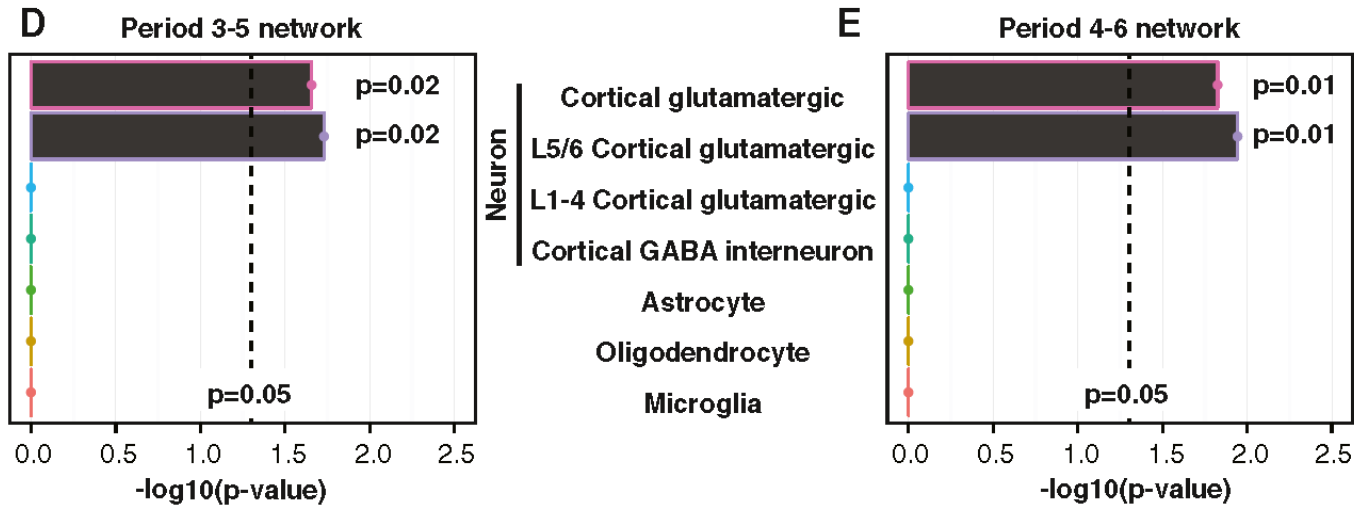
ヒト胚発生中期の皮質深層で発現している遺伝子群が自閉症に重要？

Gene-Marker-Based Analysis Implicates Layer 5/6 Glutamatergic Projection Neurons in ASD

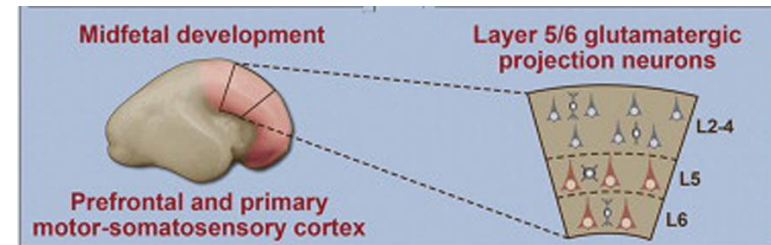
皮質深層のどのようなタイプの細胞がASDに関与しているのか？

↓
細胞種マーカー・層特異的マーカーが、PFC-MSC遺伝子発現ネットワークに含まれているのか調査する。

Fig. 4



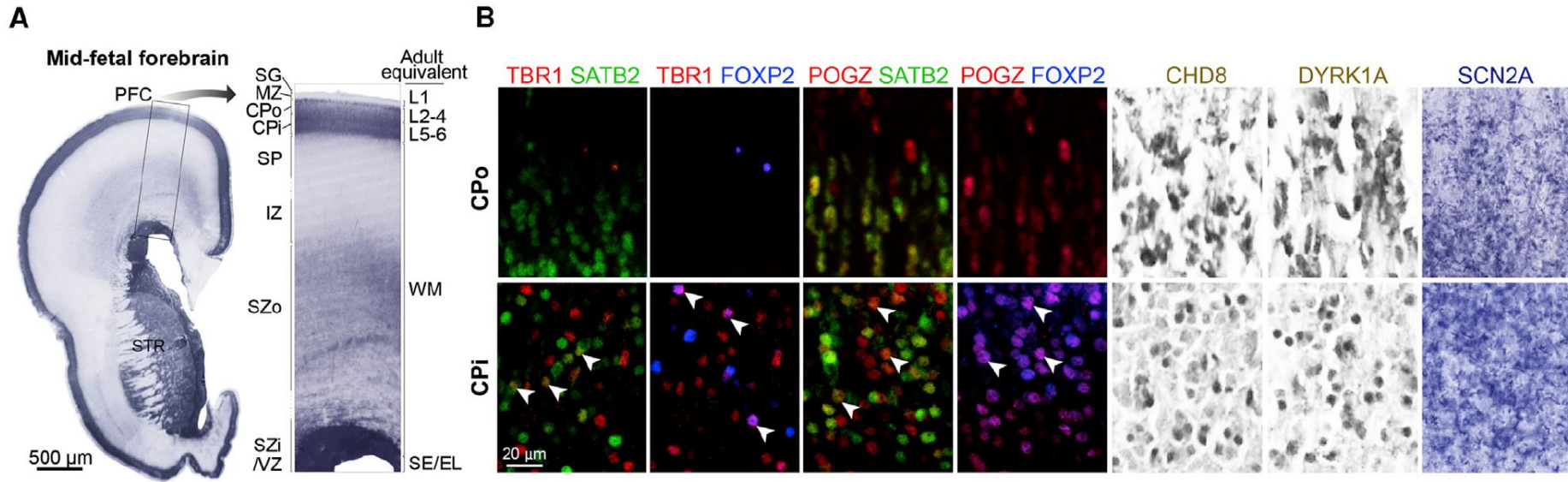
Cell type	Marker genes
Astrocyte	<i>GFAP, S100B, ALDOC</i>
Cortical GABA interneuron	<i>CALB2, CALB1, NOS1, PVALB, CCK, VIP, DLX1, DLX2, NKX2-1, ASCL1, GAD1, GAD2</i>
Cortical glutamatergic neuron	<i>RELN, CUX1, UNC5D, RORB, BCL11B, ETV1, FEZF2, OTX1, FOXP2, NTSR1, SOX5, SSTR2, TBR1, TLE4, ZFPM2, CTGF, UNC5C</i>
L5 & L6 Cortical glutamatergic neuron	<i>ZFPM2, NTSR1, TLE4, FOXP2, TBR1, SOX5, SSTR2, FEZF2, BCL11B, OTX1, ETV1</i>
L1-L4 Cortical glutamatergic neuron	<i>CUX1, UNC5D, RORB, CUX2, SATB2, WFS1, RELN</i>
Microglia	<i>CFH, FCER1G, TNIP2</i>
Oligodendrocyte	<i>CNP, CSPG4, OLIG1, OLIG2, PDGFRA</i>



ヒト胚発生中期の皮質深層の投射型ニューロンで発現している遺伝子群が自閉症に重要

Expression Profiling Confirms the Expression of hcASD Genes in Midfetal Cortical Projection Neurons

Fig. 5

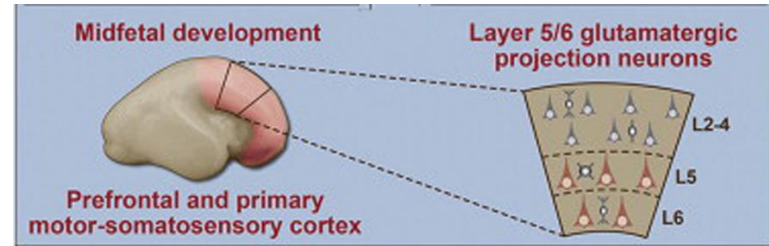


A

hcASD genes

- *ANK2 (2)
- CHD8 (3)
- CUL3 (2)
- DYRK1A (3)
- GRIN2B (3)
- KATNAL2 (2)
- POGZ (2)
- SCN2A (3)
- TBR1 (2)

SATB2-cortico-cortical projection neuron marker
 FOXP2-corticofugal projection neuron marker



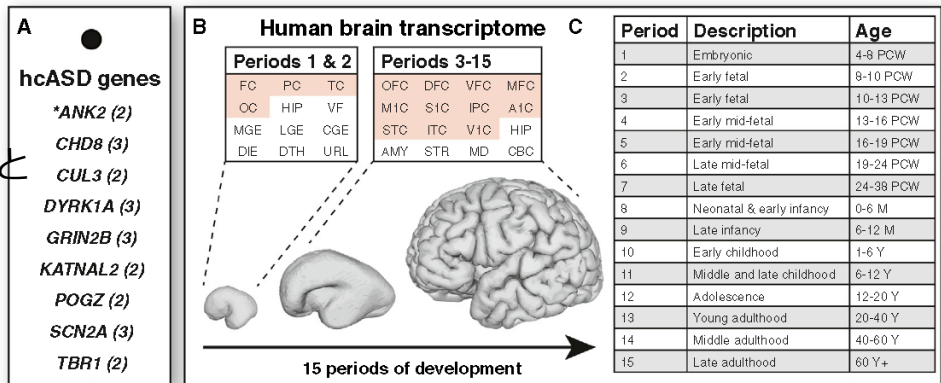
High confidence ASD (hcASD)遺伝子は、胚発生中期のcortical plate内側部の投射ニューロンに発現している。

自閉症には、ヒト胚発生期中期の前頭前皮質深層投射ニューロンで共発現している遺伝子ネットワークが関与している。

Summary

Step.1

自閉症に強く関与している遺伝子(hcASD genes)と関与しそうな遺伝子(pASD gene)を見出す。

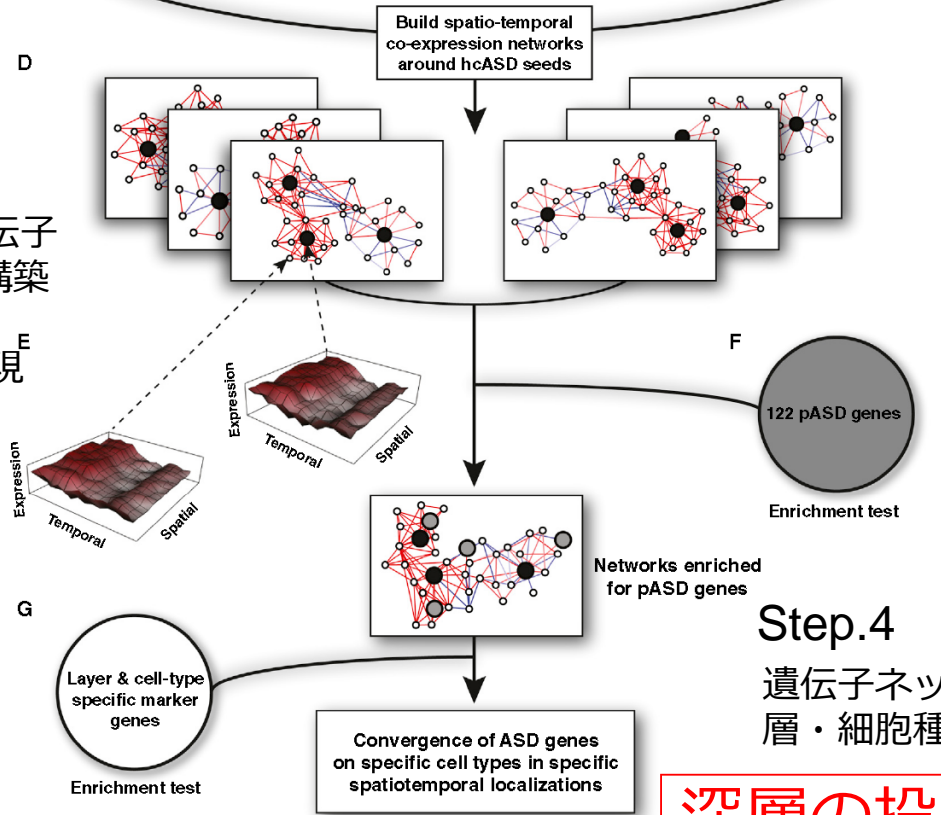


Step.2

共発現解析のための網羅的遺伝子発現データセットの用意

Step.3

- ① 各脳領域・発達段階で hcASD geneを含む遺伝子共発現ネットワークを構築
- ② どの脳領域・発達段階に自閉症関連遺伝子の発現が高いのか調査。



前頭葉-M1-S1
胚発生中期

Step.4

遺伝子ネットワークがはたらいっている層・細胞種の同定

深層の投射型ニューロン



Permutation test

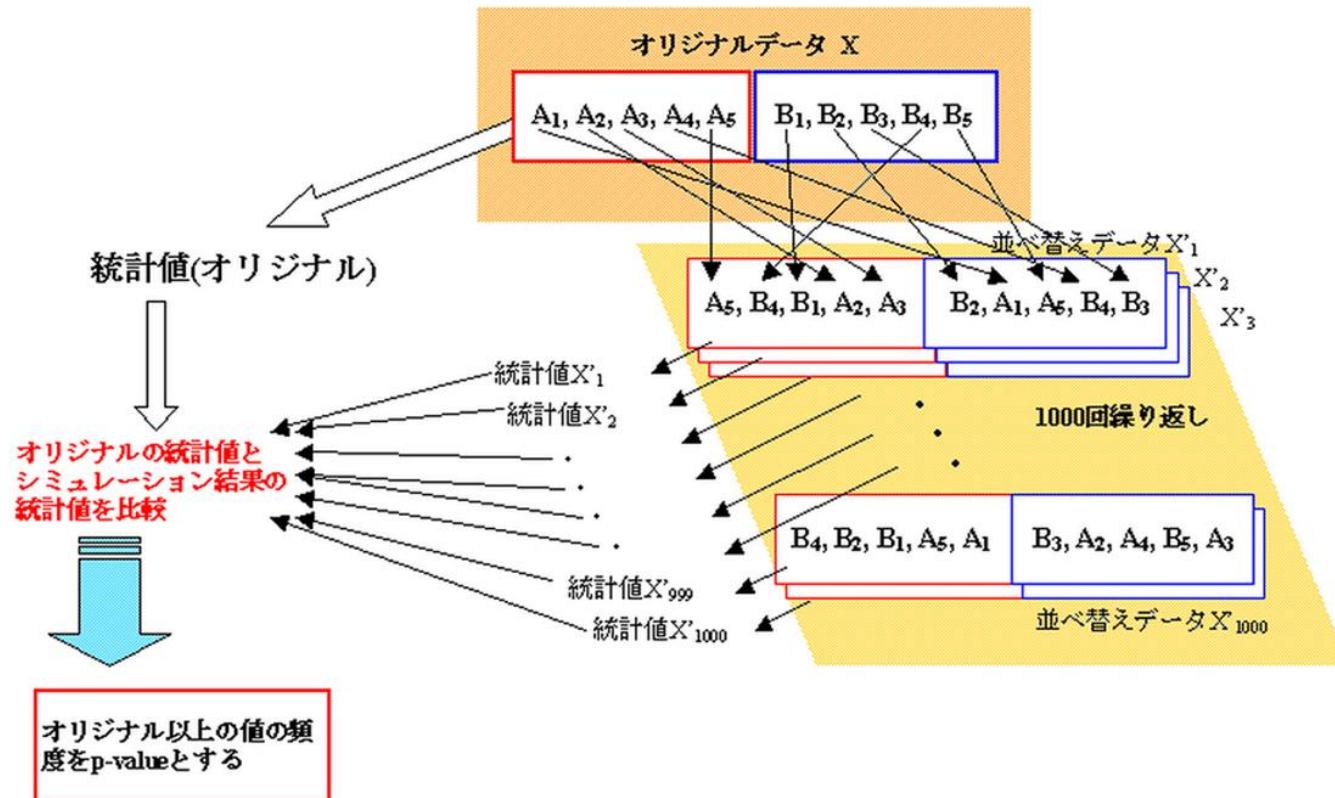
Permutation testは、2群の差を検定する際によく用いられる手法です。

2群それぞれのデータ数を固定したまま、データをランダムに入れ替えます。その結果から統計値を算出し、オリジナルの統計値と比較することで、2つの集団に差があるかどうかを検定します。

2群に差があるのならば、オリジナル統計値よりも高い値出る可能性が低いはずで

計測した分布がどの程度有意であるかの判断に用いることも出来ます。

ブートストラップ法との違いは、データを入れ替えるだけの『非復元抽出』を行う点と、2群間の差に適用する点です。下のようなイメージになります。

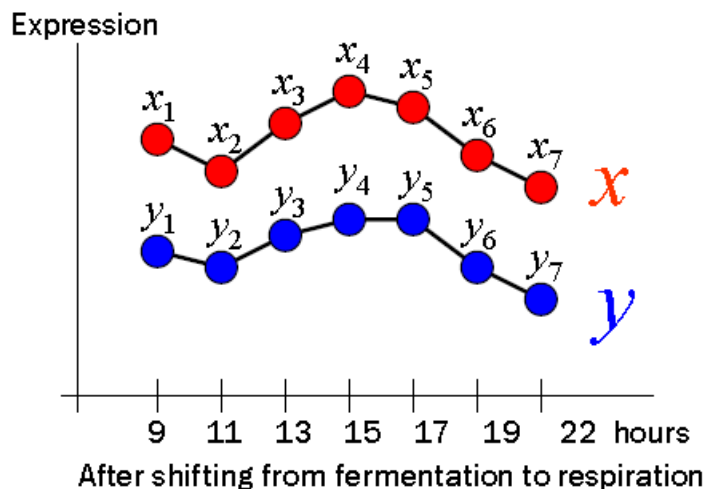


発現プロフィール

- ・ どう見るか？
 - 単独の遺伝子の発現のup/downを見る
 - 複数遺伝子間のup/downのパタンの類似関係(共発現関係)を見る

例えば、相関係数 ≥ 0.97 ならば2遺伝子は共発現とすると
→ 3,307遺伝子間に81,628共発現関係(DeRisi dataset)

遺伝子間の関係のデータ・・・ネットワーク構造



$$\text{Corr}(x, y) = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$\text{Corr}(x, y) \geq 0.97$$

