

特集 1 Omics 解析—神経精神疾患基盤解明に向けたマルチプルなアプローチ—**1. シングルセル解析により明らかとなった
神経発達・神経精神疾患の細胞種特異的分子病態**

野村 淳*

抄録：一細胞レベルでのゲノムワイドな遺伝子発現解析を可能としたシングルセル解析は、我々が想像する以上に多くの細胞のサブタイプが生体に存在する可能性を示唆するとともに、さまざまな疾患におけるセルタイプ特異的リスク遺伝子の同定に貢献してきた。神経系の疾患でもシングルセル解析の導入は顕著であるが、特に神経細胞の変異のみでは病理を説明できない「神経発達症」や「神経精神疾患」において、細胞種特異的病理の同定に有効なツールとなっている。2015年には、米国国立精神衛生研究所（NIMH）が PsychENCODE プロジェクトを立ち上げ、ヒト死後脳大規模データを用いた神経精神疾患の学際的精神医学分野のコンソーシアムとして、2018年にフェーズ1を、続いて2024年にフェーズ2を Science 誌上に発表した。特に PsychENCODE のフェーズ2（PsychENCODE2）はシングルセルとマルチオミックスに焦点を当てたプロジェクトであることから、本稿では最新の PsychENCODE2 で報告された新知見をいくつか紹介する。

日本生物学的精神医学会誌 36 (2) : 56-60, 2025

Key words : PsychENCODE, single-cell, neurodevelopmental disorders, neuropsychiatric disorders, OMICS

シングルセル解析は一細胞レベルでの遺伝子発現解析を実現したものであり、現在まで iPES/ES 細胞を用いた 2D/3D（オルガノイド）*in vitro* 分化系、疾患動物モデル、そして死後脳に代表されるヒト臨床サンプルに至るまでさまざまな研究で用いられている。すでに本手法は、特別な実験系ではなく、研究論文を構成する一実験としてデフォルトとなった感がある。ゲノムワイドなシングルセル解析は、本稿で対象とする single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) のほか、シングルセルレベルでのクロマチンのアクセシビリティの解析を可能とする single-cell assay for transposase-accessible chromatin sequencing (scATAC-seq)、そして空間情報を保持したままシングルセル解析が可能なシステムも存在し、すでに多くの論文で使用されている。また複数モダリティーによるシングルセルレゾリューションのマルチプルな解析による分子プロファイリングも増加している¹²⁾。本稿では、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患とは異なり、必ずしもニューロンの変容のみでは病

態を説明できない「神経発達症」と「神経精神疾患」に焦点を当てる。これらの疾患はグリア細胞を含む非神経系の変容による病態への関与も示唆され、実際に筆者らの研究結果からも中枢神経系に限らず末梢細胞をも含むさまざまな細胞種、要因が複雑に絡みあいながら、直接、もしくは間接的に病態に関与する可能性を示唆している^{4,7)}。したがってターゲット細胞種を定めず、ノンバイアスに複数細胞種の解析を実行し、セルタイプ特異的疾患表現型を同定するシングルセル解析の手法は「神経発達症」および「神経精神疾患」研究に適している。

2015年には、米国国立精神衛生研究所（NIMH）が中心となり、ヒト死後脳大規模データを用いた神経精神疾患の学際的精神医学分野のコンソーシアム「PsychENCODE プロジェクト (<https://www.psychencode.org/home>)」が立ち上がった¹⁾。本コンソーシアムは、ゲノムの制御領域（プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、インシュレーター）の解析、エピジェネティック修飾のカタログ化、さらに神経精神疾患に罹患したヒト死後脳から

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（〒650-0017 兵庫県神戸市中央区楠町7丁目5番1号）Jun Nomura : Department of Physiology and Cell Biology, Kobe University School of Medicine. 7-5-1 Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Hyogo 650-0017, Japan
【野村 淳 E-mail : jnomura@med.kobe-u.ac.jp】

[Phase I : 2018]

[Phase II : 2024]



PsychENCODE Consortium

図1 PsychENCODE (Phase I, Phase II) プロジェクトを載せた Science 誌 (表紙)

PsychENCODE Phase I (2018) には, “Illuminating the Brain” というタイトルが, PsychENCODE Phase II (2024) には “Decoding the Brain” というタイトルが付けられた。

セルタイプ特異的遺伝子発現の定量化を目的とし, 2018 年 12 月にはフェーズ 1 が, 続いて 2024 年 5 月にはフェーズ 2 がそれぞれ Science 誌で special issue として発表された (図 1, 2)。第 1 弾となったフェーズ 1 のイントロダクションでは, “Revealing the brain’s molecular architecture” というタイトルのもと (<https://www.science.org/doi/10.1126/science.362.6420.1262>), Science, Science Translational Medicine, Science Advance 各誌に載った論文のうち, 特にヒト脳の発達, 自閉症・統合失調症・双極性障害のトランスクリプトーム解析, 精神疾患予測の機械学習モデリングの論文が軸となり構成された。続いて, 2024 年に新たに発表されたフェーズ 2 (PsychENCODE2) では, “Decoding the brain” とのタイトルのもと (<https://www.science.org/collections/psychencode2>), 自閉症, 統合失調症, 心的外傷後ストレス障害 (PTSD), 大うつ病性障害 (MDD) さらにアルツハイマー病に至るまで, シングルセル解析とマルチオミックス解析が強化された。本フェーズに含まれる論文の内訳は, ①自閉症を含む神経精神疾患のシングルセルトランスクリプトーム解析^{8, 11, 13}), ②発達期の脳内における転写産物のアイソフォーム, スプライシング, クロマチンアクセシビリティを含む遺伝子制御ネットワークに関する解析 (Deng et al ; Wen et al ; Zeng et al ; Patowary et al ; Emani et al ; Dai et al ; Pratt et al),

そして③背外側前頭前野 (dorsolateral prefrontal cortex : DLPFC) に焦点を当てた空間トランスクリプトームマップ (Louise et al), ④ PTSD と MDD のマルチオミックス解析 (Daskalakis et al), ⑤アルツハイマー病と自閉症と統合失調症におけるメチローム解析¹⁴⁾ が挙げられる。

生後発達期における何らかの環境因子の影響 (たとえば母体の免疫活性化³⁾) が, 自閉症, 統合失調症の発症リスクに影響を与える可能性は, これまでもヒトおよび動物モデルから数多くの報告がある。厳密にプログラムされた脳の発達期での微細な変動は, 成体期に比べその影響は計り知れない。「生後発達期における何らかの異常」に起因すると考えられる精神疾患モデル動物の中には, 生後発達期早期における薬物の介入により, 成体期での精神疾患様行動がレスキューされるモデルも存在しており, 疾患リスクの早期発見, そして早期の医学的介入が疾患表現型においてより効果的であることが窺われる^{5, 6)}。今回の PsychENCODE2 のプロジェクトにおいても, 脳の発達に重要である「誕生前後の発達期」に焦点が当たっており, 7 本の論文が脳の発達に着目した論文内容となっている。特に Deng らが報告した lentivirus-based massively parallel reporter assays (lentiMPRAs) と名付けられたレンチウィルススペースのレポーターアッセイシステムでは, 初代培養ヒト妊娠中期の大脳皮質神経細胞と 10 週目の

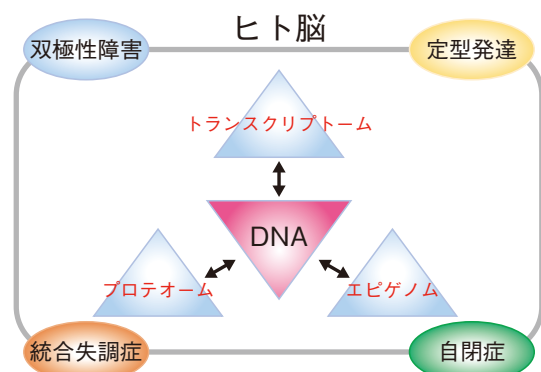


図2 PsychENCODE プロジェクトの概要

PsychENCODE プロジェクトは、特定の神経精神疾患（外側の円）を対象とし、個別の疾患の解析とともに疾患間分析も行っている。（Akbarian S, et al : Nat Neurosci, 18 : 1707-1712, 2015¹⁾ を改変して引用）

ヒト大脳皮質オルガノイドから、46,802 個の機能的エンハンサーと 164 個のバリエーションを見出している。その中には、すでに自閉症との相関が認められる TBR1 や MAPK2, 統合失調症との相関が認められる NFKB2 も含まれていることから、感度や信頼性も高いシステムと思われる。これまでも、精神疾患と相関するバリエーションは同定されてきたが、それらの多くは遺伝子発現制御領域を含むノンコーディング領域であった²⁾。タンパク質をコードする領域に比べ、ノンコーディング領域のバリエーションの解釈は依然困難であるが、本研究から今後大脳皮質における発達期特異的な遺伝子調節機構と疾患表現型の関係性が明らかになると期待される。

ペンシルバニア大学の Gandal のグループによるシングルセルメチローム（メチロミクス）解析の論文は、アルツハイマー病（n = 300）、統合失調症（n = 186）、自閉症（n = 31）を含む 1,270 の死後脳前頭前野バルク DNA メチル化プロファイリング（15,030 個の細胞）を使用し、7つの主要な細胞タイプ（興奮性神経細胞、抑制性神経細胞、アストロサイト、内皮細胞、ミクログリア、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞〔OPC〕）を解析した¹⁴⁾。現在、遺伝子発現パターンの解析手法は RNA-sequence が代表であり、実際これまでの PsychENCODE2 の論文もトランスクリプトーム解析の論文が多数を占めてきた。しかし、RNA-sequence に代表されるトランスクリプトーム解析はダイナミックレンジが広く、サンプル間のばらつきが大きくなることは予想に難くない。一方、DNA メチル化解析はスケールが「0」「1」であるだけでなく、ゲノム DNA 量も一定であるため実験解析結果は RNA-sequence に比べ、よりクリアとい

える。

Yap ら¹⁴⁾ は、神経変性疾患および神経精神疾患における細胞種特異的病理として、アルツハイマー病における内皮細胞の減少、興奮性神経細胞および抑制性神経細胞の増加を同定した。（注：アルツハイマー病は顕著な神経細胞死を特徴としており、Yap ら¹⁴⁾ の結果とは一致しない。Yap ら¹⁴⁾ は、注意事項として「本結果は、神経細胞自体の増加ではなく、グリア細胞との比較による増加」との記載がある。すなわち、グリア細胞でも顕著な変動が起きていることを意味する）。一方、自閉症では、ミクログリア細胞の増加、そして統合失調症ではオリゴデンドロサイトの減少を報告している。アルツハイマー病における血管・内皮系細胞の異常は、2022 年にスタンフォード大学の Tony Wyss-Coray のグループが Nature 誌に認知症・アルツハイマー病の脳血管系のシングルセル解析結果から示唆している。Yap ら¹⁴⁾ の論文では、アルツハイマー病患者は脳血管系全体にわたり、さまざまな脆弱性を有していることを報告しており、今回の研究結果は Wyss-Coray の論文結果を支持する結果となった。自閉症では、特にミクログリアの影響が顕著であったが、この事実は既存の研究結果、そしてこれまで筆者らが報告した研究結果とも一致している^{7, 10)}。なお Yap ら¹⁴⁾ の論文では、自閉症患者のミクログリアのセルタイプ比率（cell-type proportion : CTP）増加を認める一方、多因子スコア（polygenic score）とミクログリアの遺伝的相関は認めていないことから、今後、リスクバリエーションを有する動物モデルや患者由来 iPS 細胞での検証が求められる。統合失調症に関しては、オリゴデンドロサイトの減少を報告している。これまでも統合失調症における白質オリゴデンドロサイトの異常は報告されており、これらの結果を支持するものである⁹⁾。また、統計的に有意ではないものの、統合失調症でアストロサイトの CTP 増加傾向も認められた。アストロサイトと統合失調症の病理は必ずしも明らかではないが、アストロサイトが多機能細胞であること、またこの変化が「周囲の細胞種の変容に伴う代償」の可能性も否定できず、これらを明らかにする今後の研究の進展が待たれる。

細胞数の変化、そして細胞数の割合の変化は、脳内変化のもっともわかりやすいパラメータといえる。一方、数値的変化を伴わない、遺伝子発現変化による細胞機能の変遷・変異も細胞病理としては重要であり、特にシングルセル解析は両面を明らかにするうえで強力なツールといえる。今後、より高いシン

ゲルセルレゾリューションおよびそれに付随する技術の進展, そしてそれらを統合したマルチモダリティ解析がさらに進むことで, 神経精神疾患の理解は大きく進歩することが期待される。本稿では誌面の都合上触れることができなかったが, PsychENCODE のホームページには, 研究結果に基づく有用なアトラス, データベースが多数存在し, 神経精神疾患のメタ解析に貴重なリソースとなっている。本総説に記載し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。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Akbarian S, Liu C, Knowles JA, et al (2015) The PsychENCODE project. *Nat Neurosci*, 18 : 1707-1712.
- 2) Delaneau O, Zazhytska M, Borel C, et al (2019) Chromatin three-dimensional interactions mediate genetic effects on gene expression. *Science*, 364 : eaat8266.
- 3) Estes ML and McAllister AK (2016) Maternal immune activation : implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, 353 : 772-777.
- 4) Furukawa S, Nomura J, Hanafusa H, et al (2023) Germ-cell-specific transcriptome analysis illuminates the chromatin and ubiquitin pathway in autism spectrum disorders. *Autism Res*, 16 : 1101-1110.
- 5) Nomura J, Jaaro-Peled H, Lewis E, et al (2016) Role for neonatal D-serine signaling : prevention of physiological and behavioral deficits in adult *Pick1* knockout mice. *Mol Psychiatry*, 21 : 386-393.
- 6) Nomura J, Kannan G and Takumi T (2017) Rodent models of genetic and chromosomal variations in psychiatric disorders. *Psychiatry Clin Neurosci*, 71 : 508-517.
- 7) Nomura J, Mardo M and Takumi T (2021) Molecular signatures from multi-omics of autism spectrum disorders and schizophrenia. *J Neurochem*, 159 : 647-659.
- 8) Ruzicka WB, Mohammadi S, Fullard JF, et al (2024) Single-cell multi-cohort dissection of the schizophrenia transcriptome. *Science*, 384 : eadg5136.
- 9) Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, et al (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet*, 362 : 798-805.
- 10) Velmeshev D, Schirmer L, Jung D, et al (2019) Single-cell genomics identifies cell type-specific molecular changes in autism. *Science*, 364 : 685-689.
- 11) Wamsley B, Bicks L, Cheng Y, et al (2024) Molecular cascades and cell type-specific signatures in ASD revealed by single-cell genomics. *Science*, 384 : eadh2602.
- 12) Wang X, Wu X, Hong N, et al (2023) Progress in single-cell multimodal sequencing and multi-omics data integration. *Biophys Rev*, 16 : 13-28.
- 13) Xia Y, Xia C, Jiang Y, et al (2024) Transcriptomic sex differences in postmortem brain samples from patients with psychiatric disorders. *Sci Transl Med*, 16 : eadh9974.
- 14) Yap CX, Vo DD, Heffel MG, et al (2024) Brain cell-type shifts in Alzheimer's disease, autism, and schizophrenia interrogated using methylomics and genetics. *Sci Adv*, 10 : eadn7655.

■ ABSTRACT

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

Jun Nomura

Department of Physiology and Cell Biology, Kobe University School of Medicine

Single-cell analysis, which enables genome-wide gene expression analysis at the single-cell resolution, identified more cell subtypes than we previously imagined. It has also contributed to identifying cell-type-specific risk genes in various disorders. In particular, it has proven to be an effective tool in identifying cell-type-specific pathologies in conditions such as “neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders,” that cannot be fully explained by the deficit of neuropathologies. In 2015, the National Institute of Mental Health (NIMH) launched the PsychENCODE consortium, an interdisciplinary psychiatry consortium focused on neuropsychiatric disorders using large-scale postmortem human brain data. The first phase of this initiative was published in *Science* in 2018, followed by phase 2 in 2024. Since PsychENCODE Phase 2 (PsychENCODE2) is a project focused on single-cell and multi-omics approaches, I will introduce new findings reported in the latest PsychENCODE2.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 36 (2) : 56–60, 2025)
