

マイクロバイオーームがマウスの社交性に与える影響 (トランスクリプトミクスからのアプローチ)

本記事では、Stilling et al., 2018 で使用された RNA-seq データ (GSE114702) を、Omics Playground で再解析し、上記論文の結果を辿っていきます。

論文の概要

Stilling らは、マウス腸内のマイクロバイオーームと社交性との関連性を明らかにした (Stilling et al., 2018)。この論文では、無菌マウス (GF)、菌叢を再構築したマウス (exGF)、およびコントロール (CON) を使用し、さらに、それぞれのグループについて社会的環境下においたグループ (GF-SI, exGF-SI, CON-SI) および社会的環境を経験させないグループを用意し、実験を行った。実験の結果、GF および exGF の両グループでは、社会的相互作用に対する順応性が減少したのと同時に、扁桃体での転写産物のスプライシングに変化がみられた。本論文の結論として、マイクロバイオーームが神経系の発達に影響を及ぼし、自閉症などの疾患に対して強く関与している可能性が示唆されている。

クラスタリングと発現解析

まず、社会的環境を経験したグループと経験していないグループのトランスクリプトミクスデータについて、UMAP を用いて 2 次元平面上へプロットを行ったが、経験の有無および細菌叢の違いによってクラスターが分かれることはなかった (図1)。

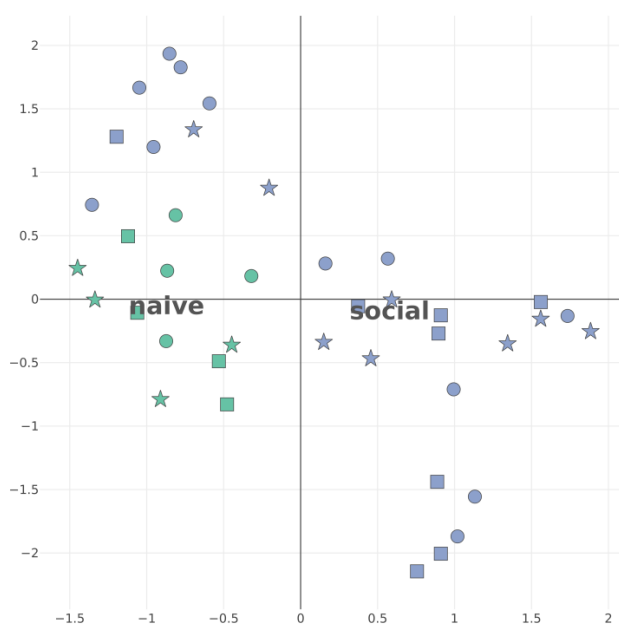


図1 社会的環境を経験したマウス (青) および経験していないマウス (緑) のデータについて UMAP によるプロットを実行したが、顕著なクラスター分けはみられなかった。★:コントロール (CON) ■:菌叢再構築マウス (exGF) ●:無菌マウス (GF)

次に、表1に示すグループ間における遺伝子発現変動解析を行った。元論文の手法とは異なるが、ここでは、顕著に発現が変化している遺伝子を同定するため、3つのアルゴリズム Deseq2, EdgeR, limma で共通して検出された発現変動遺伝子に着目した (FDR<0.1, logFC >|±0.5)。発現変動遺伝子が最も多く検出されたのは、GF-SI および GF 間で、次いで多く検出されたのは、CON-SI および CON 間となり、元論文の結果と一致した (図2)。

Sample Group	Reference Sample Group
GF	CON
exGF	CON
GF	exGF
CON-SI	CON
GF-SI	GF
exGF-SI	exGF
GF-SI	CON-SI
exGF-SI	CON-SI
GF-SI	exGF-SI

表1 比較を行ったグループ

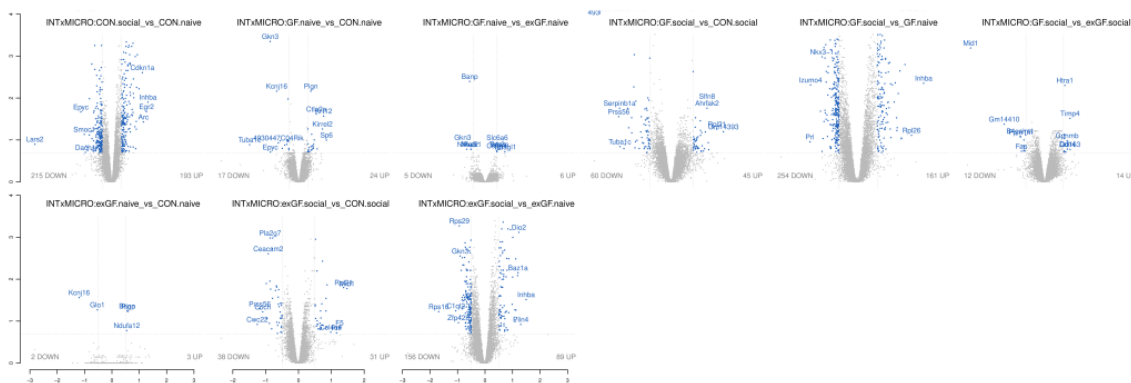


図2 3つの発現変動遺伝子検出アルゴリズム (Deseq2, edgeR, limma) に基づいて定義された q 値を基準として、各群間比較のボルケーノプロットを作成すると、GF-SI、GF 間、および CON-SI、CON 間で発現変動遺伝子が多くみられた。

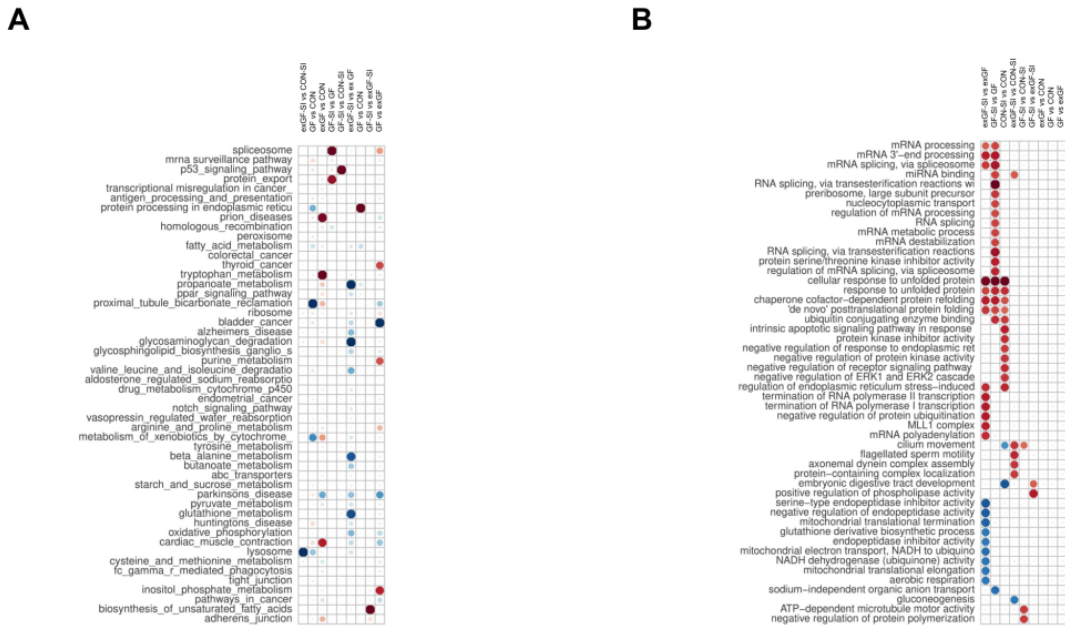


図4 KEGG パスウェイ解析および GO 解析の結果、GF グループでは、社会的環境の経験後、いくつかのパスウェイが活性化していることが分かった。A:KEGG パスウェイ解析 B:GO 解析

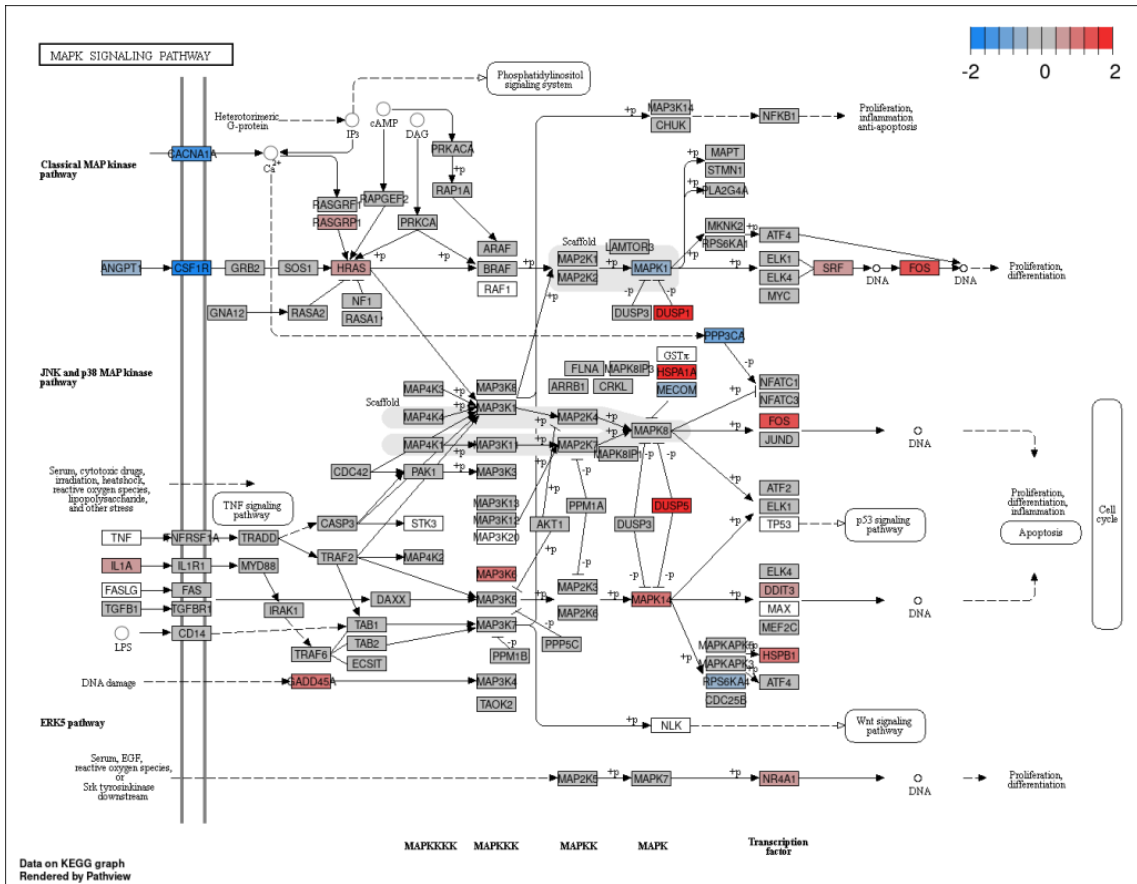


図5 CON-SI と CON を比較した場合の KEGG パスウェイ解析結果

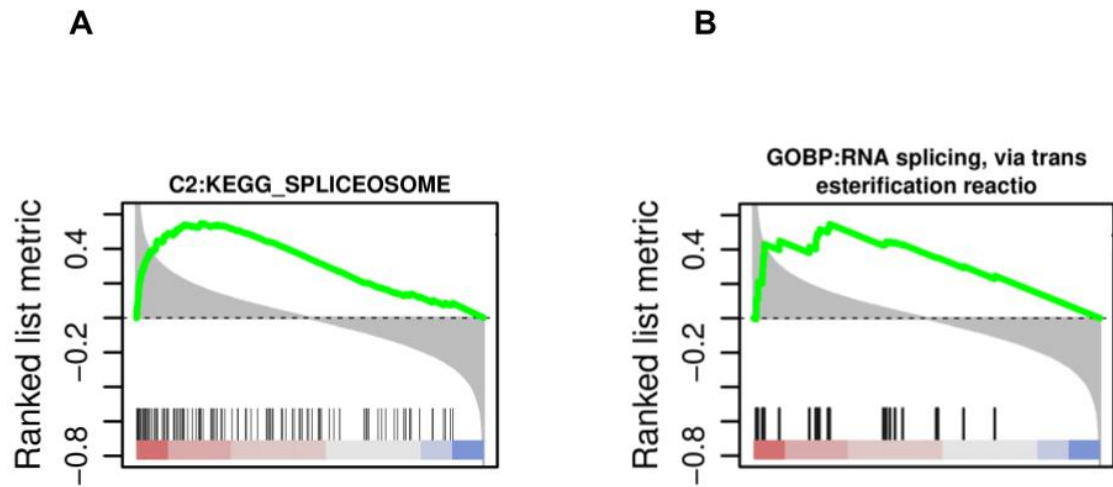


図6 GF-SI と GF を比較した場合の、スプライシング関連遺伝子に関する GSEA プロット
 A:spliceosome パスウェイ (KEGG) と関連する遺伝子 B: “RNA splicing” という GO タームを持つ遺
 伝子

遺伝子セットエンリッチメント解析(L1000)

つづいて、本プラットフォーム上で利用できる別のデータベースである L1000 データベースを用いたエンリッチメント解析を行った。このデータベースでは、1つの遺伝子発現を攪乱した場合の全体の遺伝子発現変動データが集められている。GF-SI と CON-SI 間の比較データについて、L1000 データベースに基づいた解析を行い、腸内細菌を除去した場合の社会性への影響を、何らかの単一遺伝子の変動と関連付けて理解できるかどうかを検証した。

その結果、転写因子 ETS2 (ERF) を抑制した場合の遺伝子発現変動が、GF-SI と CON-SI 間の遺伝子発現変動とよく似ていることが明らかになった (図7A)。ERF は正常な神経活動に必要であることが示唆されており (Maroulakou and Bowe, 2001)、さらに ERF の発現低下は自閉症患者でも確認されている (Burraco et al, 2016)。本プラットフォームでの解析結果はこれらの知見とも整合した。

一方で、EDN3 (endothelin 3) を抑制した場合に生じる遺伝子発現変動は、GF-SI と CON-SI 間で観測された遺伝子発現変動とは対極的であることも判明した (図7B)。endothelin は中枢神経系における神経伝達物質として機能し、ASD 患者では EDN3 が過剰発現していることが知られており (Burraco et al, 2016)、やはり本プラットフォームでの解析結果と整合している。

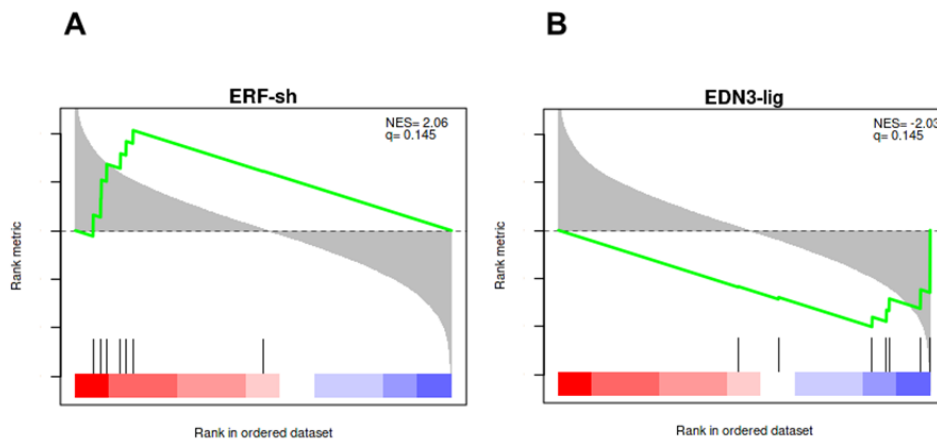


図7 GF-SI と CON-SI 間の発現変動遺伝子データと関連する L1000 データベース由来の発現変動遺伝子に基づく GESA プロット A:ERF 遺伝子サイレンシング B:EDN3 発現抑制

最後に、社会的環境においた GF グループおよび CON グループの間の遺伝子発現変動をキャンセルするような薬剤を探索した結果、mTOR パスウェイの阻害剤が多くを占めた(図8)。興味深いことに、AKT/mTOR パスウェイを阻害することで、遺伝子改変マウスにおいて社会性がレスキューされた例(Xing et al, 2019)や、逆に、mTOR パスウェイを活性化が自閉症と関連しているといった報告もある(Rosina et al, 2019)。また、図8のリストには、AKT/mTOR パスウェイと強く関連する PI3K パスウェイの阻害剤も含まれていた。mTOR パスウェイ阻害剤に次いで多く含まれていたのは、グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK)の阻害剤であった。先行研究においても、GSK3 の過剰発現が社会的選好に影響を与えたり、社会的環境での精神不安をもたらしたりするといった報告や(Mines et al, 2010)、GSK3 の阻害により精神疾患が治療可能といった報告がある(Finkelman and Martinez, 2011)。

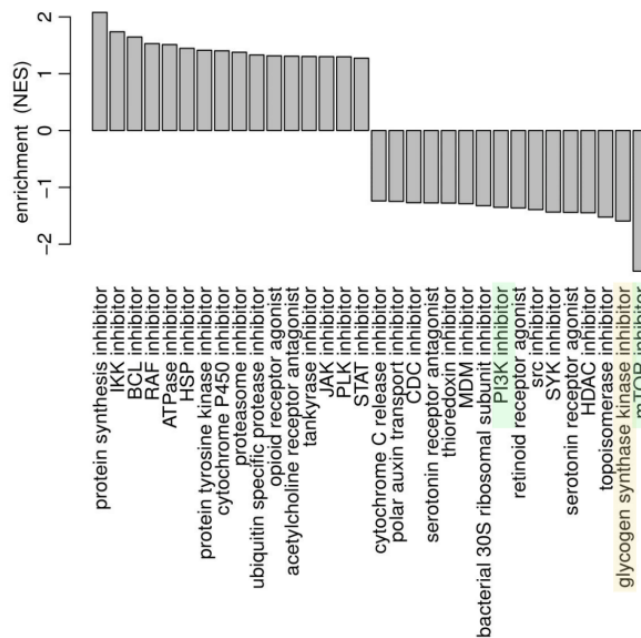


図8 着目する遺伝子変動パターンと同様の変動をもたらす薬剤および逆の変動をもたらす薬剤を、L1000 データベースより、関連性の高い順に抽出した結果 緑:mTOR パスウェイ阻害剤および PI3K 阻害剤 オレンジ:グリコーゲン合成酵素キナーゼ阻害剤

結論

Omics Playground プラットフォームを使用することで、元論文の図や知見を再現できたのに加え、L1000 データベースに基づく発現プロファイルの比較解析まで発展させることができた。この比較解析からは、ERF2 および EDN3 の発現変化による遺伝子全体の発現プロファイルの変動が、GF-SI および CON-SI 間の発現変動を模倣することが分かった。ERF2 と EDN3 は神経活動と関与しているのが知られていることに加え、自閉症患者においてこれらの遺伝子の発現が変化していることが知られている。さらに、本プラットフォームを使用することで、mTOR 阻害剤と GSK 阻害剤が、社会性のレスキューに向けた治療薬となりうるということが、トランスクリプトミクスの観点から示された。

参考文献

1. Benítez-Burraco, A., Lattanzi, W., & Murphy, E. (2016). Language impairments in ASD resulting from a failed domestication of the human brain. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 373.
2. Eldar-Finkelman, H., & Martinez, A. (2011). GSK-3 inhibitors: preclinical and clinical focus on CNS. *Frontiers in molecular neuroscience*, 4, 32.
3. Maroulakou, I. G., & Bowe, D. B. (2000). Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene*, 19(55), 6432-6442.
4. Mines, M. A., Yuskaitis, C. J., King, M. K., Beurel, E., & Jope, R. S. (2010). GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PloS one*, 5(3), e9706.
5. Rosina, E., Battan, B., Siracusano, M., Di Criscio, L., Hollis, F., Pacini, L., ... & Bagni, C. (2019). Disruption of mTOR and MAPK pathways correlates with severity in idiopathic autism. *Translational psychiatry*, 9(1), 50.
6. Stilling, R. M., Moloney, G. M., Ryan, F. J., Hoban, A. E., Bastiaanssen, T. F., Shanahan, F., ... & Cryan, J. F. (2018). Social interaction-induced activation of RNA splicing in the amygdala of microbiome-deficient mice. *Elife*, 7, e33070.
7. Xing, X., Zhang, J., Wu, K., Cao, B., Li, X., Jiang, F., ... & Li, J. D. (2019). Suppression of Akt-mTOR pathway rescued the social behavior in Cntnap2-deficient mice. *Scientific reports*, 9(1), 3041.

【お問い合わせ先】

フィルジェン株式会社 バイオインフォマティクス部

〒459 8011 愛知県名古屋市緑区定納山一丁目 1409 番地

TEL: 052 624 4388 (9 : 00 ~ 17 : 00) **FAX:** 052 624 4389 **Email:** biosupport@filgen.jp