

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09849

研究課題名(和文)統合失調症の神経発達障害に関わるmiRNAの分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular basis of miRNAs related to neurodevelopmental disorders of schizophrenia

研究代表者

豊島 学 (toyoshima, manabu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：90582750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は統合失調症の発症脆弱性基盤として支持されている神経発達障害仮説に注目し、22q11.2の微細欠失を持つ統合失調症患者由来iPS細胞を用いて、神経分化・発達の異常に関わるmiRNAの分子病態について解析した。患者由来の神経幹細胞では、神経細胞への分化効率の異常など神経発達障害を示唆する表現型が見られ、これらの異常は特定のmiRNAやp38の発現変化が関わっていることが明らかになった。更に、統合失調症患者死後脳においても、神経細胞とアストロサイトのマーカー量比に異常があることが判明し、脳発達期における神経幹細胞の分化効率の微細な変化が、統合失調症の病因の可能性の一つであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established hiPSCs from two schizophrenia patients with the 22q11.2 deletion, and examined the molecular pathology of microRNA (miRNA) related to abnormality of neuronal differentiation/development. Neurosphere size, neural differentiation efficiency, neurite outgrowth, cellular migration and the neurogenic-to-gliogenic competence ratio were significantly reduced in patient-derived cells. miRNA profiling detected reduced expression levels of miRNAs belonging to miR-17/92 cluster and miR-106a/b in the patient-derived neurospheres. Those miRNAs are reported to target p38, and conformingly the levels of p38 were up-regulated in the patient-derived cells. Furthermore, we confirmed an elevated expression of gliogenic (astrocyte) marker in postmortem brains from schizophrenia patients. These results suggest that a dysregulated balance of neurogenic and gliogenic competences may underlie schizophrenia.

研究分野：分子精神医学

キーワード：統合失調症 miRNA 神経発達

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の有力な病因仮説として、「神経発達障害仮説」が知られている。この仮説は、「胎生期～生後脳発達期にかけての神経発達障害が統合失調症の脆弱性を形成する」という説であるが、倫理的な問題からヒト由来サンプルを用いて直接的、かつ具体的にこの仮説を検証することはこれまででは不可能であった。しかし、近年のiPS細胞技術の進歩により、iPS細胞から神経幹細胞や神経細胞が作製可能となり、患者由来サンプルを用いてどのような神経分化・発達の障害が起きているか、実際に検証することが出来るようになった。既に統合失調症患者由来iPS細胞を用いた解析が報告されており (Brennand et al., 2011 等) 統合失調症研究におけるiPS細胞の有用性が証明されつつある。

miRNAは、蛋白質をコードしていない21～25塩基程度の一本鎖RNAで、標的となるmRNAの3'非翻訳領域に結合して翻訳を阻害する。同様の翻訳抑制をおこなうsiRNAとは異なり、標的の結合部位の配列と完全に一致する必要はないため、ひとつのmiRNAは平均200個のmRNAを標的としている。また、標的となるmRNAの配列依存的に翻訳抑制効果の強弱が決定されたため、遺伝子発現の微調整を担っていると考えられている。神経系においてmiRNAは、神経分化や神経発達、シナプス機能に重要な役目を果たしていることから、統合失調症や自閉症などの病態に関与すると考えられている。これまで、統合失調症特異的に発現変化するmiRNAの探索が行われ、miR-30 family, miR-132, miR-137, miR-195, miR-198, miR-208などが報告されているが、末梢血単核細胞や死後脳を用いた解析であるため、実際の神経発達段階でどのようなmiRNAが発現変動するか明らかになっていない。

22q11.2の微小欠失(22q11.2欠失症候群)は、2,000-4,000出生に1人の割合で起こる染色体異常症の一つである。この欠失領域は、遺伝学的解析において連鎖や関連が繰り返し報告されてきた領域であり、実際に22q11.2の微小欠失(1.5～3Mb)が統合失調症の発症リスクを約20～40倍に増大させることから、統合失調症の責任領域の一つとして重要視されている。この22q11.2欠失領域には、*DGCR6, PRODH, DGCR2, UFD1L, CDC45L, CLDN5, GNB1L, TXNDR2, COMT, ARVFC, DGCR8, RTN4R*などの統合失調症関連遺伝子が含まれるが、個々の遺伝子の詳細な貢献メカニズムには不明な点も多い。この欠失領域に存在する*DGCR8*遺伝子は、miRNAの生合成のプロセスの中で、核内で行われる一段階目のプロセッシングに関わる*DGCR8*をコードしている。*Dgcr8*^{+/-}マウスでは、miRNAの生成異常の他に、プレパルス抑制や空間的ワーキングメモリの低下といった行動異常や、海馬の神経新生の低下、海馬CA1錐体細胞や前頭前皮質第

層錐体細胞の樹状突起スパインの減少などが報告されている。これらのことから、*Dgcr8*の発現低下によるmiRNAの発現低下は、前頭前皮質や海馬のシナプス機能および神経発達を障害し、認知行動異常を引き起こすと考えられる。

2. 研究の目的

上記背景から申請者は、「**miRNAの生成経路の異常による特定のmiRNAの発現低下が、神経系細胞の分化・発達に影響を及ぼし、統合失調症の発症リスクを増大させる一因**」と考え、本研究では、この仮説を検証するためmiRNAの発現低下を起こすiPS細胞(22q11.2DS欠損患者由来iPS細胞)を作製し、神経幹細胞や各種神経細胞への分化誘導について解析を行うことで、miRNAの発現低下がヒトの神経系細胞の分化・発達にどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) iPS細胞の培養と神経分化

本研究では、22q11.2領域の欠失をもった統合失調症患者由来のiPS細胞(2例)と健常者由来iPS細胞(2例)を用いた。患者由来iPS細胞と健常者由来iPS細胞は、iPS細胞用培地で培養した。iPS細胞からの神経分化誘導は、シングルセル化したiPS細胞をLIF、FGF2を加えた神経幹細胞用培地で浮遊培養することで、神経分化を誘導し、Neurosphere(神経幹細胞/神経前駆細胞の凝集塊)を作製した。神経細胞への最終分化は、NeurosphereをTrypLE™ Selectでシングルセル化し、ポリ-L-オルニチン/フィブロネクチンでコートした24wellプレートに蒔き、神経細胞用培地で培養した。

2) 神経細胞の分化解析

患者、健常者由来のNeurosphereを神経細胞に分化誘導し、誘導後2週間目に、抗TUJ1抗体(神経細胞のマーカー)、抗GFAP抗体(アストロサイトのマーカー)で免疫染色を行った。染色画像から全細胞中の神経細胞、アストロサイトの割合を求め、分化効率を解析した。

3) miRNAの発現解析

患者、健常者由来のNeurosphereからtotal RNAを抽出し、Human miRNA Microarray (8x60K array)を用いて網羅的に発現量を解析した。その後、特定のmiRNAに対しては、Taqman probeを用いたqRT-PCRで定量した。

4) 死後脳の発現解析

死後脳はVictorian Brain Bank Networkから入手した。total RNAを抽出した後、Taqman probeを用いたqRT-PCRで定量した。

本研究は、理化学研究所及び研究参加施設の倫理委員会の承認を得て被験者には十分な説明と文書による同意を得て実施した。

4. 研究成果

本研究では、22q11.2 欠失を持つ統合失調症患者2名から iPS 細胞を樹立し、分化誘導により神経幹細胞および神経系の細胞を作製して、欠失領域にある遺伝子がどのように神経発達や神経分化に影響を及ぼすかの解析を行った。その結果、患者由来の neurosphere (神経幹細胞の細胞塊)では、細胞塊の縮小化や、遊走能の低下、神経細胞への分化効率の低下とそれに伴うアストロサイトへの分化促進などの神経分化異常が見られた(図1)。

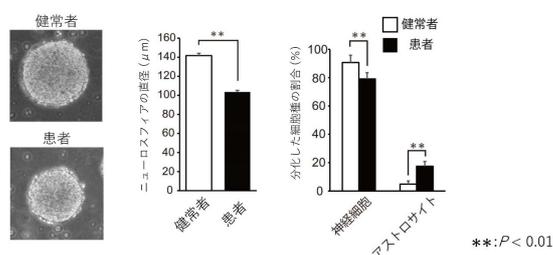


図1. 22q11.2 欠失を持つ統合失調症患者由来の神経前駆細胞における分化異常

同様の神経分化異常は、Dgcr8^{+/-}マウスで報告されていたため、神経分化異常には miRNA が関わっていると考え、患者由来の neurosphere における miRNA の発現解析を行った。その結果、miR-17 family (miR-17、miR-106a/b) や miRNA-185 の発現が低下していた(図2)。これらの miRNA は、神経幹細胞の増殖や分化制御に関わる遺伝子(E2F1, PTEN, BIM)や神経幹細胞の「神経細胞：グリア分化比率」に関わっている MAPK14 (p38α をコードしている)を標的としていることから、患者由来の神経幹細胞に見られた分化異常には、特定の miRNA の発現減少が関わっていることが示唆された。

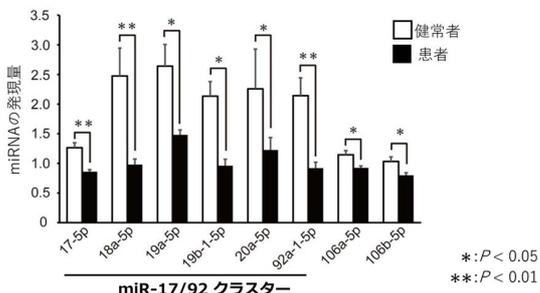


図2. 22q11.2 欠失を持つ統合失調症患者由来の神経前駆細胞における miRNA の発現低下

22q11.2 欠失を持った統合失調症患者由来の神経幹細胞で見られた分化異常が、“一般の”統合失調症にも見られるのかを確かめるため、統合失調症患者の死後脳を用いて解析を行った。その結果、発現変化量は小さいが、患者死後脳では神経細胞のマーカーである MAP2 の発現量の低下と、アストロサイトのマーカーである GFAP の発現量の増加が年齢縦断的に認められた(図3)。GFAP の発現量の増加は、炎症によっても引き起こされるが、患者死後脳において炎症マーカーの発現増加は認められなかった。患者死後脳においても神経細胞とアストロサイトの異常が見られたことから、神経幹細胞から神経細胞・グリア細胞への分化効率が、統合失調症の病因に関わっていることが示唆された。

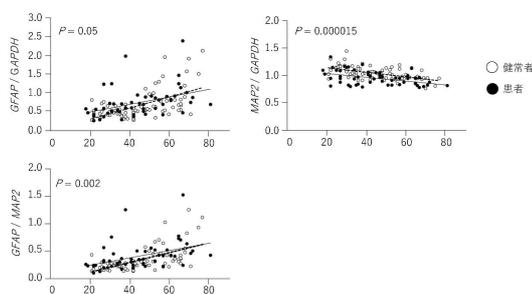


図3. 統合失調症患者死後脳における GFAP, MAP2 の発現変化

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計6件)

Balan S, Toyoshima M, Yoshikawa T: Contribution of induced pluripotent stem cell technologies to the understanding of cellular phenotypes in schizophrenia. *Neurobiology of Disease* (in press)
doi: 10.1016/j.nbd.2018.04.021. 査読あり

Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, Ohnishi T, Balan S, Hisano Y, Iwayama Y, Toyota T, Matsumoto T, Itasaka N, Sugiyama S, Tanaka M, Yano M, Dean B, Okano H, Yoshikawa T: Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. *Translational Psychiatry* 6: e934, 2016.
doi: 10.1038/tp.2016.206. 査読あり

Matsumoto T, Fujimori K, Andoh-Noda T, Ando T, Kuzumaki N, Toyoshima M, Tada H, Imaizumi K, Ishikawa M, Yamaguchi R, Isoda M, Zhou Z, Sato S, Kobayashi T, Ohtaka M, Nishimura K, Kurosawa H, Yoshikawa T, Takahashi T, Nakanishi M, Ohyama M, Hattori N, Akamatsu W, Okano H: Functional neurons generated from T cell-derived iPSCs for neurological disease modeling. *Stem Cell Reports* 6: 422-435, 2016.
doi: 10.1016/j.stemcr.2016.01.010. 査読あり

Maekawa M, Iwayama Y, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Hisano Y, Toyota T, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Takagai S, Yamada K, Ota M, Fukuchi S, Okada Y, Akamatsu W, Tsujii M, Kojima, Owada Y, Okano H, Mori N, Yoshikawa T: Investigation of the fatty acid transporter-encoding genes SLC27A3 and SLC27A4 in autism. Scientific Reports 5:16239, 2015.
doi: 10.1038/srep16239. 査読あり

Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T: Utility of scalp hair follicles as a novel source of biomarker genes for psychiatric illnesses. Biol Psychiatry 78: 116-125, 2015. Cover Photo.
doi: 10.1016/j.biopsych.2014.07.025. 査読あり

Balan S, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Ohnishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Ide M, Iwata Y, Suzuki K, Kikuchi M, Hashimoto T, Kanahara N, Yoshikawa T, Maekawa M: Sequencing and expression analyses of the synaptic lipid raft adapter gene PAG1 in schizophrenia. J Neural Transmission 122: 477-485, 2015.
doi: 10.1007/s00702-014-1269-0. 査読あり

〔学会発表〕(計7件)

豊島学, 大西哲生, 新井誠, 糸川昌成, 岡野栄之, 吉川武男, カルボニルストレスによる神経分化異常の分子病態, 第13回日本統合失調症学会, 2018年3月23日, あわぎんホール(徳島)

豊島学, 大西哲生, 新井誠, 糸川昌成, 岡野栄之, 吉川武男, *GLO1* 遺伝子変異によるカルボニルストレスと神経分化異常の解析, 第44回日本脳科学学会, 2017年10月14日, 弘前大学医学部コミュニケーションセンター(青森)

豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, 新井誠, 糸川昌成, 岡野栄之, 吉川武男, iPS細胞から見える統合失調症の病理と今後の発展, 第39回日本生物学的精神医学会, 2017年9月28日, 札幌コンベンションセンター(北海道)

豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, 岡野栄之, 吉川武男, 患者由来のiPS細胞を

用いた神経発達障害に関わるmiRNAの分子病態の解明, 第12回日本統合失調症学会, 2017年3月23日, 米子コンベンションセンター-BIG SHIP(鳥取)

Manabu Toyoshima, Wado Akamatsu, Yohei Okada, Hideyuki Okano and Takeo Yoshikawa, Schizophrenia patient-derived hiPSCs exhibit changes in Neurogenic and Gliogenic Competence s, CINP 2016, 2016/7/4, COEX (Seoul)

豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, 田中元雅, 岡野栄之, 吉川武男, 統合失調症患者由来神経幹細胞における分化異常の分子病態, 口頭, 第46回日本神経精神薬理学会年会, 2016年7月2日, COEX(韓国, ソウル)

豊島学, 赤松和土, 岡田洋平, 大西哲生, Shabeesh Balan, 田中元雅, 岡野栄之, 吉川武男, 「22q11.2欠失を伴った統合失調症患者由来神経幹細胞における分子病態解析」, 第11回日本統合失調症学会, 2016年3月25-26日, ペイシア文化ホール(群馬)

〔図書〕(計2件)

前川素子, 豊島学, 吉川武男, 最新医学社, うつ病の臨床: 現代の病理と最新の治療, 遺伝子発現からみたうつ病の神経科学, 2016

豊島学, 吉川武男, 先端医学社, 分精神医学, 統合失調症の神経発達障害にかかわるmiRNAの分子基盤, 2016

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0件)
- 取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊島学(TOYOSHIMA, Manabu)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号: 90582750

(2)研究分担者

吉川武男(YOSHIKAWA, Takeo)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号: 30249958

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし