

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15033

研究課題名(和文) iPS細胞からの神経誘導システムを用いた統合失調症の病態解析

研究課題名(英文) Pathogenesis of schizophrenia using neural induction system from iPS Cell

研究代表者

松下 正之 (MATSUSHITA, Masayuki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30273965

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：精神疾患は統合失調症だけでも人口の1%の発症率であり、根治的治療がなく社会的に大きな問題となっている。そのため、大規模なゲノム関連解析や病態解明に向けた研究が行われているが、未だ発症の分子病態の多くは不明である。我々は、精神疾患の家系調査を行い統合失調症を多発する家系を発見した。本研究では、ゲノム解析と疾患iPS細胞の樹立を行い病態解明に向けた研究を同一家系で行い疾患関連遺伝子群の同定などの成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Psychiatric disorders, even with schizophrenia alone, have an incidence of 1% of the population, and there is no curative treatment, which is a social problem. For that reason, large-scale of genome wide association studies and research to elucidate the molecular pathology of the disease have been conducted, but the molecular pathologies of onset are still unknown. We conducted a family survey of psychiatric disorders and found a with large schizophrenia family. In this study, genome analysis and establishment of disease specific iPS cells were carried out in the same family to study the pathology, and we have identified disease related genes.

研究分野：分子細胞生理学

キーワード：精神疾患 統合失調症 家系 ゲノム iPSC

1. 研究開始当初の背景

統合失調症、双極性障害、自閉症などの精神疾患は遺伝性が認められているが、その分子レベルでの発症機序の多くは不明である。脳は複雑な神経ネットワークより構築され、高度な機能を司る器官であるため、遺伝子異常に基づいて構築される構造や機能変化は、多彩な表現型を示すことや、多種の遺伝子の変異が同様な表現型を引き起こす可能性(遺伝的異質性)がある。そのために、精神疾患の症状のみからの疾患候補遺伝子の探索は困難であると認識されている。本研究では、統合失調症などの家族内集積を認める患者家系から血液サンプルを採取した後に疾患 iPS 細胞を樹立し、神経細胞への in vitro での分化誘導を行う。統合失調症患者より誘導した神経細胞を用いて、シナプス形成などの形態学的解析や薬剤刺激によるカルシウムイメージングなどの生理学的機能的評価を、健常人から誘導した神経細胞と比較検討を行う。統合失調症に関しては、疾患 iPS 細胞から誘導された神経細胞ではシナプス構築の異常があることが報告されており、同様の機能評価系を用いることもできる。

2. 研究の目的

統合失調症の発症機序の多くは不明であり、分子レベルでの診断方法、合理的な治療薬の選択など未だ確立されていない。本研究では、本土とは遺伝背景の異なる沖縄県の離島などの統合失調症家系より疾患 iPS 細胞を樹立する。さらに、統合失調症 iPS 細胞より神経細胞へ誘導し、ドーパミン刺激などによる生化学的、生理学的(細胞内カルシウム濃度)指標を健常人由来の神経細胞と比較することにより、細胞レベルで統合失調症に特異的な機能異常を見いだすことを目的としている。神経細胞レベルでの機能異常が明らかとなれば、将来的には分子病態の解明だけでなく、診断方法、治療薬の選択、創薬など臨床

的にも画期的な以下の成果が期待される。

(1) 統合失調症の血液から誘導した神経細胞に、様々なドーパミン受容体やトランスポーターの薬剤を添加し、細胞内カルシウムの上昇や、ドーパミンシグナルの下流のリン酸化レベルの生化学的な反応性を健常人と比較する事により、新たな病態分子メカニズムを提唱でき、論理的な診断方法が確立できる。

(2) 臨床で使われている治療薬剤を加え神経細胞レベルで機能的異常を修復することを検証することにより、論理的かつ合理的な治療薬剤の選択が可能となる。

(3) 化合物ライブラリーを本研究によって明らかとなった指標をもとに、統合失調症の化合物スクリーニングが可能となる。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の樹立

少なくとも9人の統合失調症患者から、それぞれ3クローンの iPS 細胞を樹立する。エピゾーマルベクターを用いた抹消血からの iPS 細胞樹立法(京都大学 iPS 細胞研究所の手法)を用いる。

(2) ニューロスフェアの誘導

樹立した iPS 細胞とコントロールからニューロスフェアを誘導し(慈恵医科大学岡野研究室の手法)ストックとして冷凍保存する。

(3) 神経細胞への誘導

ストックしていたコントロール、疾患 iPS 細胞由来のニューロスフェアからドーパミン神経細胞を誘導する。

(4) 誘導神経細胞での神経細胞の組織形態の比較観察

細胞の形態(MAP2 染色など)、シナプス形成

(シナプシン染色、PSD タンパク質など)などを免疫組織学的に比較検討する。

(5) 誘導ドーパミン神経細胞を用いた生化学的な解析誘導ドーパミン神経細胞に D1、D2 特異的なアゴニストなどで刺激し、ドーパミンシグナルの下流で Ca²⁺と cAMP の濃度依存性にリン酸化制御を受ける DAPP32 のリン酸化レベルをリン酸化特異的抗体でのイムノブロットにより比較検討する。

(6) 誘導ドーパミン神経細胞を用いた生理学的な解析
誘導ドーパミン神経細胞に D1、D2 特異的なアゴニストなどで刺激し、細胞内 Ca²⁺濃度の変動を Fura2 等指標に健常人由来の神経と比較検討する。

(7) 各種の統合失調症治療薬による細胞レベルでの効果検証
上記の研究により、神経細胞のレベルで統合失調症に特異的な異常が発見された場合、多数の統合失調症治療薬による表現系異常の修正 (In vitro 治療効果) を検証する。さらに、カルテ調査により、実際の臨床で効果のあった治療薬と照合する。本研究により、将来的には治療薬の合理的な選択方法への展開が期待できる。

4. 研究成果

私たちは精神科病院の協力を得て精神疾患の家系調査を行い大規模な双極性障害や統合失調症などの精神疾患家系を発見している。これらの家系から、臨床研究倫理委員会、ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会などの承認のもとに血液を採取し、ゲノム解析と疾患 iPS 細胞の樹立を進めた。これまでの成果として、エクソーム・リンケージ解析など結果、疾患特異的な連鎖領域を見出し、その領域の詳細なゲノム構造解析やシーケン

ス解析を行っている。さらに、疾患 iPS 細胞についても、家系内罹患者や健常人について樹立した。患者由来 iPS 細胞を神経に分化誘導し、神経形態の変化や細胞内カルシウムイオンの濃度変化を指標に患者群と健常人とで薬理学的手法と組み合わせて解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Takamatsu G, Katagiri C, Tsumuraya T, Shimizu-Okabe C, Nakamura W, Nakamura-Higa M, Hayakawa T, Wakabayashi S, Kondo T, Takayama C, Matsushita M. Testacalmin is a potential target of class I histone deacetylase inhibitors in neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. doi:10.1016/j.bbrc.2016.12.036. 2016. 08.03 (2017)査読あり

Stritt S, Nurden P, Favier R, Favier M, Ferioli S, Gotru SK, van Eeuwijk JM, Schulze H, Nurden AT, Lambert MP, Turro E, Burger-Stritt S, Matsushita M, Mittermeier L, Ballerini P, Zierler S, Laffan MA, Chubanov V, Gudermann T, Nieswandt B, Braun A. Defects in TRPM7 channel function deregulate thrombopoiesis through altered cellular Mg⁽²⁺⁾ homeostasis and cytoskeletal architecture. *Nature Commun*. doi: 10.1038/ncomms11097(2016) 査読あり

[学会発表](計3件)

Gakuya Takamatsu, Tadashi Kaname, Tomoko Hayakawa, Kumiko Yanagi, Yoko Manome, Chikako Hara-Miyauchi, Tsuyoshi Kondo, Hirotaka James Okano, Masayuki Matsushita. A survey to identify high-penetrant variants in psychiatric diseases for induced pluripotent stem cell study. 2017 INTERNATIONAL BIOMEDICAL INTERFACE SYMPOSIUM 台北(台湾) 2017/3/5

Gakuya Takamatsu, Chigusa Shimizu, Chiaki Katagiri, Tomoyuki Tsumuraya, Tomoko Hayakawa, Wakako Toguchi, Shigeo Wakabayashi, Chitoshi

Takayama, Masayuki Matsushita.
Identification of novel target genes
of HDAC inhibitor treatment in the
brain. 第39回日本分子生物学会年会.
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
2016/12/1

Gakuya Takamatsu, Tadashi Kaname,
Tomoko Hayakawa, Kumiko Yanagi, Yoko
Manome, Chikako Hara-Miyauchi,
Tsuyoshi Kondo, Hiroataka James Okano,
Masayuki Matsushita. 3 candidate
families to identify psychiatric rare
genetic variants in Japan: a survey
for genome sequencing and induced
pluripotent stem cell study.
7th International Conference on
Schizophrenia. チェンナイ(インド)
2016/9/8

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ryukyu-physiology.info/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下 正之(MATSUSHITA, Masayuki)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 30273965

(2) 研究分担者

早川 朋子(HAYAKAWA, Tomoko)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 30420821

(3) 連携研究者

岡野ジェイムス洋尚
(OKANO, James Hiroataka)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90338020