

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19728

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた統合失調症グルタミン酸仮説の検討

研究課題名(英文) Investigation of the glutamate hypothesis for schizophrenia using iPS cells

研究代表者

毛利 健太郎 (Mouri, Kentaro)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：00642125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：NMDA受容体の輸送に重要な役割を担っているKIF17と統合失調症との関連について、KIF17遺伝子上のアミノ酸置換を伴うSNPについて統合失調症群で有意に高いことを見出した。また死後脳研究では統合失調症群においてKIF17蛋白の有意な減少を認めた。マウスの神経前駆細胞においてKIF17遺伝子をノックダウンし増殖能を評価したが、有意な変化は認めなかった。またアストロサイトにクロザピンを投与し解析したところ、アストロサイトのKIF17 mRNA発現の有意な変化を認めた。ヒト由来iPS細胞については、神経細胞への分化誘導の系を確立できたため、分化に及ぶ影響を解析する予定である。

研究成果の概要(英文)：The KIF17 gene plays an important role in transport of NMDA receptors. We found that a missense SNP of KIF17 was significantly higher in schizophrenia group on the relationship between KIF 17. The protein expression of KIF17 in schizophrenic postmortem brains was significantly less than that in controls. We knocked down KIF17 gene in mouse neural progenitor cells (mNPCs) and the proliferation ability of the mNPCs was evaluated but no significant change was observed. In astrocytes treated with clozapine, KIF 17 mRNA expression were significantly decreased. For iPS cells derived from human, since it was possible to establish a system of induction of differentiation from human iPS cells to neurons, we will continue to analyze the influence on differentiation after continuing operations such as suppressing the expression of KIF17 gene.

研究分野：医学研究科

キーワード：臨床精神分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は生涯有病率が 0.6 ~ 1.9% の common disease であり、十分な治療法が確立されていない深刻な精神疾患である。統合失調症の有力な病態機序の一つとして、NMDA 受容体を介したグルタミン酸系神経伝達機能低下 = グルタミン酸仮説が広く知られている。この NMDA 受容体の輸送には KIF17 (キネシンスーパーファミリータンパク質) が関与することが明らかとなっている。そこで申請者は、KIF17 と統合失調症との関連について、SNP 関連解析、蛋白発現解析を行った。KIF17 遺伝子上のアミノ酸置換を伴う SNP(rs2296225)について、慢性期統合失調症患者群と健常対照群による関連解析を行ったところ、同 SNP のマイナーアレル頻度が統合失調症群で有意に高いことを見出した。また当研究室が保有する統合失調症患者及び対照群の死後脳前頭前野組織を用いて KIF17 蛋白の定量を行ったところ、統合失調症群において KIF17 蛋白の有意な減少を認めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、NMDA 受容体に重要な役割を担っている KIF17 が神経系細胞に与える影響を、ヒト iPS 細胞、マウス由来の神経前駆細胞 (NPC)、ニューロンおよびアストロサイトをj用いて解析し、統合失調症の病態機序を解明するための研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

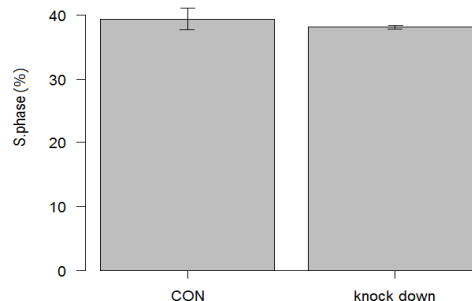
KIF17 が NPC の表現型に及ぼす影響の解析。C57BL/6 マウスの新生仔脳より NPC を分離し初代培養系を立ち上げる。RNAi 法により KIF17 遺伝子をノックダウンし、増殖、分化、生存 (抗アポトーシス) といった NPC の表現型に対する KIF17 遺伝子の影響を評価する。増殖については FACS を用いた BrdU アッセイにより、分化については Tuj1 など各種分化マーカーにより、生存については FACS を用いた TUNEL 法により評価する。

抗精神病薬が、KIF17 遺伝子発現、および GRIN2b (NMDA 受容体のサブユニット、KIF17 が特異的に輸送) 遺伝子発現に与える影響の解析。C57BL/6 マウスの新生仔脳より、アストロサイトおよびニューロンを分離し、初代培養系を立ち上げる。それらに対し、各種の抗精神病薬を処置し、KIF17 と GRIN2b の mRNA 発現の変化について、Q-RT-PCR 法により評価する。

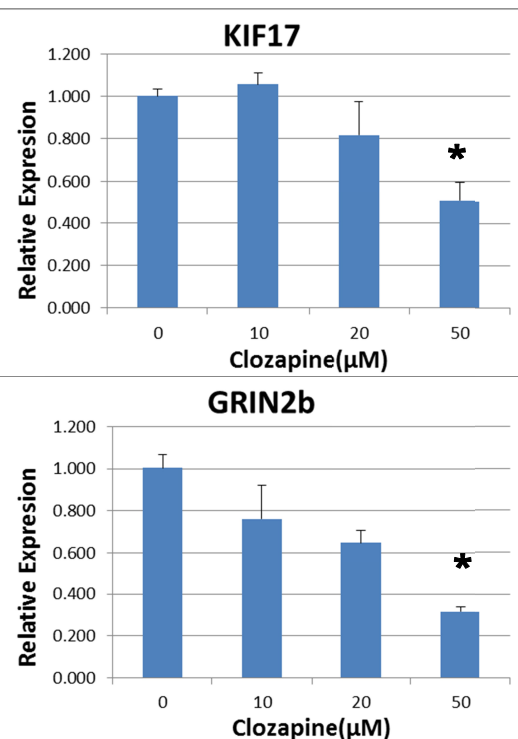
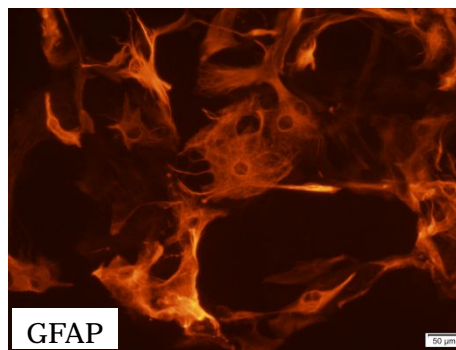
ヒト由来 iPS 細胞を用いた KIF17 遺伝子がシナプスの神経伝達や形態変化に与えている影響の解析。患者及び健常者から iPS 細胞の樹立と集積を行う。さらに SFEBq 法によりドパミン神経に分化させる。KIF17 遺伝子のオーバーエクスプレッション、ノックダウン等の操作を行った上で、表現型の変化を解析する。

4. 研究成果

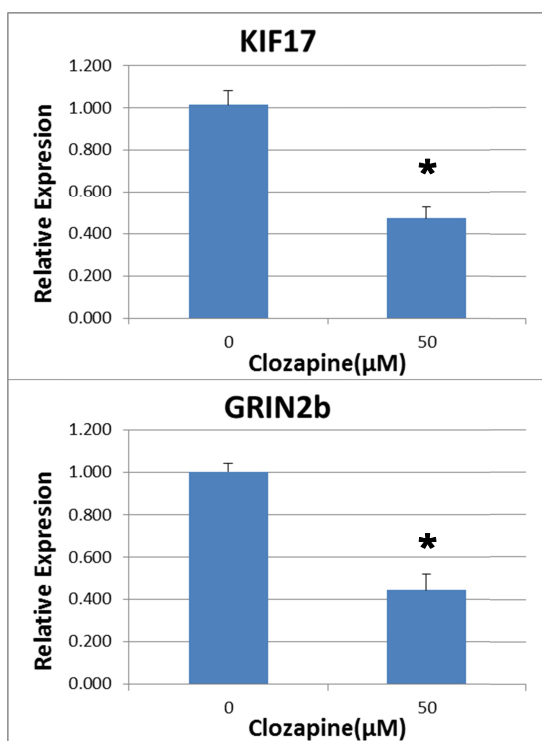
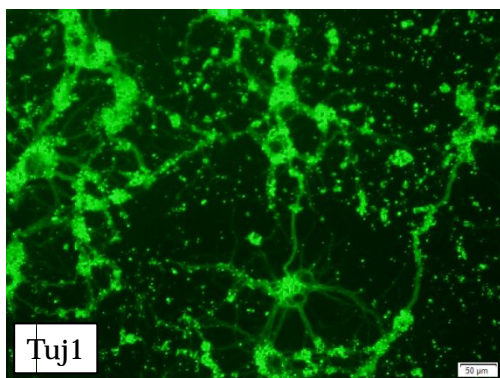
新生仔マウスより NPC を分離し、継代維持培養系を立ち上げた。さらに KIF17 遺伝子をノックダウンし、BrdU アッセイで増殖能を評価したところ、有意な差は認めなかった (下図、N=3)。分化および生存 (抗アポトーシス) についてさらに解析をすすめている。



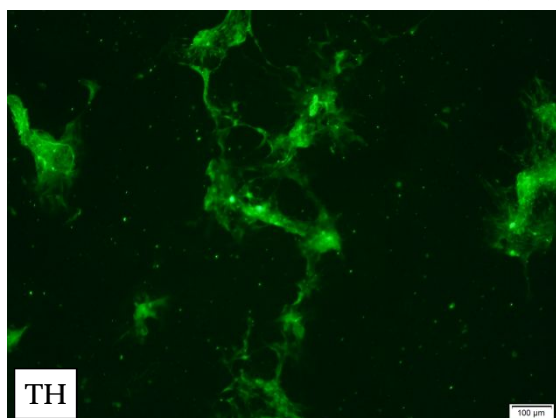
新生仔マウスよりアストロサイトを分離し初代培養系を立ち上げた。さらに抗精神病薬 (クロルプロマジン、ハロペリドール、リスペリドン、クロザピン) を処置し、KIF17 及び GRIN2b の遺伝子発現を Q-RT-PCR で評価した。クロザピンで濃度依存性に発現低下し、50μM で KIF17 及び GRIN2b の遺伝子発現の有意な減少を認めた (p<0.05, N=3)。他の薬剤では有意な変化を認めなかった。



さらに、ニューロンの初代培養系を立ち上げ、クロザピン 50 μ M を処置した。その結果、KIF17 及び GRIN2b の遺伝子発現の有意な減少を認めた ($p < 0.05$, $N = 6$)。



患者及び健常者から iPS 細胞の樹立と集積を継続して行っている。SFEBq 法によりドパミン神経に分化させる実験系を立ち上げている。KIF17 遺伝子操作を行った上で、iPS 細胞からドパミン神経細胞への分化に及ぼす KIF17 の影響の解析を行う予定である。



抗精神病薬処置によって、アストロサイトとニューロンにおいて KIF17 及び GRIN2b の遺伝子発現が変化することが示唆された。今後もさらに、KIF17 遺伝子による神経系細胞への表現型への影響について、NPC および iPS 細胞を用いた解析をすすめていく。

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 5 件)

1. Ratta-apha W, Boku S, Mouri K, Okazaki S, Otsuka I, Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T, Shirakawa O, Sora I, Hishimoto A. Association analysis of the HLA-DRB1*01 and HLA-DRB1*04 with schizophrenia by tag SNP genotyping in the Japanese population. *Psychiatry Res.* 229:627-628 (2015)
2. Otsuka I, Watanabe Y, Hishimoto A, Boku S, Mouri K, Shiroya K, Okazaki S, Nunokawa A, Shirakawa O, Someya T, Sora I. Association analysis of the Cadherin13 gene with schizophrenia in the Japanese population. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 11:1381-1393 (2015)
3. Ratta-Apha W, Mouri K, Boku S, Ishiguro H, Okazaki S, Otsuka I, Sora I, Arinami T, Shirakawa O, Hishimoto A. A decrease in protein level and a missense polymorphism of KIF17 are associated with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 230(2):424-429 (2015)
4. Okazaki S, Boku S, Otsuka I, Mouri K, Aoyama S, Shiroya K, Sora I, Fujita A, Shirai Y, Shirakawa O, Kokai M, Hishimoto A. The cell cycle-related genes as biomarkers for schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016 3;70:85-91.
5. Shimmyo N, Hishimoto A, Otsuka I, Okazaki S, Boku S, Mouri K, Horai T, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I. Association study of MIF promoter polymorphisms with suicide completers in the Japanese population. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2017 Mar 22;13:899-908

[学会発表](計 3 件)

1. 岡崎賢志、菱本明豊、朴秀賢、毛利健太郎、白岩恭一、大塚郁夫、白井豊、藤田愛子、白川治、湖海正尋、曾良一郎．統合失調症における細胞周期関連遺伝子に着目した 3 段階 mRNA 発現解析．第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会 合同年会．2015 年 9 月
2. 岡崎賢志、菱本明豊、朴秀賢、毛利健太郎、竹村幸洋、麻生克郎、山本訓也、曾

良一郎・危険ドラッグの臨床症状への影響および遺伝子多型との関連の検討．第27回日本依存神経精神科学会．2015年10月

3. Akitoyo Hishimoto, Shuken Boku, Hiroki Ishiguro, **Kentaro Mouri**, Woraphat Ratta-apha, Ichiro Sora. A decrease in protein level and a missense polymorphism of KIF17 are associated with schizophrenia 30th CINP WORLD CONGRESS OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY. 2016年7月

〔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〕

なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

毛利健太郎 (Kentaro, Mouri)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：00642125