

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19753

研究課題名(和文)一卵性双生児不一致例のiPS細胞由来神経細胞を用いた双極性障害の分子病態解明

研究課題名(英文) Analysis of iPS cell-derived Neural Cells from Monozygotic Twins Discordant for Bipolar Type Schizoaffective Disorder

研究代表者

澤田 知世 (Sawada, Tomoyo)

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：90708471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病や双極性障害は、社会生活への影響が極めて大きく、原因解明と診断法・根本的治療法の開発が強く望まれる精神疾患である。ヒトiPS細胞の技術進歩により、患者iPS細胞由来神経細胞の解析が盛んになっているが、疾患による影響よりも個々人の遺伝的背景によるバラツキの影響を強く受けるため、病因解明につながるような知見は得られていない。本研究では、双極性障害の類似疾患である双極型失調感情障害にかんして不一致な遺伝的背景の違いによるバラツキのない一卵性双生児を対象に、iPS細胞より分化誘導した前脳特異的神経幹・前駆細胞および皮質神経細胞の解析を行い、疾患の発症と強く関連する表現型の同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：Major depression and bipolar disorder are neuropsychiatric disorders which cause severe psychosocial disturbance without defined molecular pathogenesis, definitive methods for diagnosis and fundamental treatment. Recent progresses in iPS cell technologies have enabled us to analyze patient's neurons. However, large genetic variability between individuals often hampers the identification of subtle disease-relevant changes in cellular functions. In this study, we recruited a pair of monozygotic twins discordant for schizoaffective disorder, bipolar-type and analyzed forebrain specific neural stem/progenitor cells and cortical neurons derived from the twins' iPS cells. This approach can minimize the genetic variability and thus enhance the likelihood of identifying subtle disease-associated cellular phenotypes.

研究分野：細胞生物学、精神医学

キーワード：精神疾患 iPS細胞 一卵性双生児

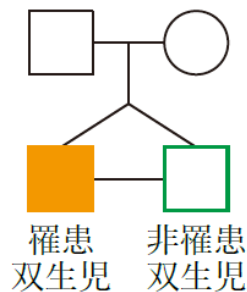
1. 研究開始当初の背景

(1) うつ病や双極性障害(躁うつ病)は、自殺の主な要因となるなど、社会生活への影響が極めて大きく、原因解明と診断法・根本的治療法の開発が強く望まれる精神疾患である。一卵性双生児における双極性障害の一致率は40~70%(Craddock N, et al., *Lancet*. 2013)と高く、その発症にはゲノム要因が強く寄与すると考えられる。しかし、これまでのゲノム研究で同定された各遺伝子の影響は非常に小さく、双極性障害の原因遺伝子と呼べるものは見つかっていない。

(2) ヒトiPS細胞(Takahashi K, et al., *Cell*. 2007)の技術進歩により、患者由来神経細胞を用いた病態解明が可能となって以来、精神疾患研究の分野でも、統合失調症をはじめとした患者iPS細胞由来神経細胞の解析が盛んになっている(Brennan KJ, et al., *Nature*. 2011など)。しかし、現時点ではゲノム要因を考慮しない孤発例患者由来のiPS細胞を用いた解析が中心であり、疾患による影響よりも個々人の遺伝的背景によるバラツキの影響を強く受けるためか、病因解明につながるような知見は得られていない。

2. 研究の目的

双極性障害の類似疾患である双極型失調感情障害にかんして不一致な一卵性双生児(図1)を対象に、(1)双生児iPS細胞由来神経細胞の遺伝子発現差異、および(2)これに寄与するゲノム差異(*de novo*変異)の探索を行い、双極性障害の‘なりやすさ(感受性)’に大きく影響するゲノム変異を特定するとともに、(3)ゲノム変異が神経細胞の機能におよぼす影響を明らかにし、双極性障害の発症に関わる分子メカニズムの解明を目指す。



【図1】本研究で対象とした一卵性双生児不一致例を含む家系図

3. 研究の方法

(1) 双極型失調感情障害にかんして不

一致な一卵性双生児の末梢血単核球よりエピソードマーカーを用いて作製したiPS細胞(一人あたり8クローン)の神経分化能および分化抵抗性について検討するため、SFEBq法(Koyanagi-Aoi M, et al., *PNAS*. 2013)を用いて神経前駆細胞を分化誘導し、誘導開始から14日目における神経前駆細胞特異的表面マーカーPSA-NCAMおよび多能性幹細胞マーカーTRA-1-60の発現をFlow cytometryで評価する。

(2) 3-(1)の結果を踏まえ、一人あたり2クローンのiPS細胞を選択し、Kondo T, et al., *Acta Neuropathol Commun*. 2016に従って前脳特異的神経幹・前駆細胞を誘導する。また、成熟皮質神経細胞を得るため、誘導開始24日目の細胞をマウス新生児脳より単離培養したアストロサイト上に播き直し、神経前駆細胞の最終分化(成熟化)を促す。

(3) 3-(2)の方法で分化誘導した前脳特異的神経幹・前駆細胞のtotal RNAを誘導開始8日目および24日目に回収し、RNA sequencingによる遺伝子発現解析を行う。ライブラリ調整には、illumina社のTruSeq RNA Sample Preparation Kit v2を用い、シーケンス反応はHiSeq 2500 systemを用いて実施する。シーケンス結果の解析に際しては、リファレンスゲノムとしてThe UCSC Human Reference Genome (hg19/GRCh37)を用いる。

(4) 3-(3)のシーケンス結果をもとに、まず実験系の妥当性を評価するため、罹患双生児、非罹患双生児それぞれにおいて、神経分化誘導8日目と24日目の遺伝子発現パターンを比較し、 $|\text{Fold change}| > 2$ かつFalse Discovery Rate (FDR) < 5%の条件を満たして発現量に差が認められた遺伝子に着目し、upregulated genes、downregulated genesのそれぞれに関してIngenuity Pathway Analysis software (Ingenuity)を用いた解析を行う。

(5) 次に、神経分化誘導8日目、24日目における双生児間の遺伝子発現パターンを比較する。 $|\text{Fold change}| > 1.5$ かつFalse Discovery Rate (FDR) < 5%の条件を満たして発現量に差が認められた遺伝子に着目し、Ingenuity Pathway Analysisを実施する。

(6) 神経分化誘導120日目以降の成熟皮質神経細胞における興奮性神経細胞、抑制性神経細胞のバランスについて、各種シナプ

スマーカーを用いた免疫染色により評価する。用いる一次抗体は以下のとおりである。

Presynaptic marker:

Anti-Synapsin1 (Millipore)

Postsynaptic marker:

Anti-Homer1 (Synaptic Systems、興奮性)

Anti-Gephyrin(Synaptic Systems、抑制性)

(7) 成熟皮質神経細胞の形態について評価するため、誘導開始から 120 日前後の細胞に Lipofectamine 2000 (invitrogen) を用いて EGFP をトランスフェクションし、細胞体サイズ、分岐数 (Sholl analysis)、突起数を Image J software (NIH) で解析する。

(8) 成熟皮質神経細胞の自発発火能、シナプス伝達について、パッチクランプ法を用いて検討する。微小興奮性シナプス後電位の測定時には、recording solution に TTX および Picrotoxin を、微小抑制性シナプス後電位の測定時には、TTX を加える。

(9) 一卵性双生児およびその両親の末梢血由来ゲノム DNA を用いた全ゲノム解析結果から、*de novo* 変異 (一塩基変異、コピー数変異、トランスポゾン挿入変異) 候補を絞り込み、PCR - ダイレクトシーケンス法による変異の確認を行う。

4 . 研究成果

(1) 分化誘導 14 日目には、双生児由来 iPS 細胞 (一人あたり 8 クローン) のすべてにおいて、7-AAD で染色されない生細胞の 85%以上が PSA-NCAM 陽性の神経前駆細胞に分化し、TRA-1-60 陽性の未分化細胞の割合は 0.5%と極めて少なかったことから、双生児由来 iPS 細胞中に分化抵抗性を示すクローンが存在しないことが確認できた。また、8 クローンの平均 PSA-NCAM 陽性率には双生児で差は認められず、iPS 細胞の神経分化能には罹患双生児と非罹患双生児で差がないことを確認し、その後の解析に用いる細胞として各 2 クローンの iPS 細胞を選択した。

(2) Kondo T, et al. (2016) に従って分化誘導した前脳特異的神経幹・前駆細胞の分化度について、8 日目、24 日目における細胞表面マーカー (CD15、CD24、CD56、CD184) の発現を flow cytometry で評価した結果、罹患双生児由来の 2 クローン、非罹患双生児由来の 2 クローンともに 100% 近くの生細胞で発現が認められ、神経幹・前

駆細胞への分化を確認した。また、8 日目、24 日目における生細胞数にも双生児間で差は認めなかった。

(3) 各 2 クローンの iPS 細胞から分化誘導した 8 日目、24 日目の前脳特異的神経幹・前駆細胞から total RNA を抽出・精製し、RNA-seq を行った。

(4) iPS 細胞から神経分化誘導した前脳特異的神経幹・前駆細胞の 8 日目および 24 日目における遺伝子発現パターンを罹患双生児、非罹患双生児それぞれで比較した結果、 $|\text{Fold change}| > 2$ かつ False Discovery Rate (FDR) $< 5\%$ の条件を満たして発現量に差が認められた遺伝子は、罹患双生児で 2448 個、非罹患双生児で 2222 個であった。IPA の結果、8 日目と比較して 24 日目の細胞で発現が上昇していた遺伝子は、罹患双生児、非罹患双生児ともに、神経分化に関わる遺伝子群であり、発現が低下していた遺伝子は細胞増殖や細胞周期に関連する遺伝子群であった。この結果から、双生児由来 iPS 細胞からの時間依存的神経分化が確認でき、また RNA-seq 解析の結果妥当性についても確認できた。

(5) 分化誘導 8 日目の前脳特異的神経幹・前駆細胞における双生児間の遺伝子発現を比較した結果、 $|\text{Fold change}| > 1.5$ かつ False Discovery Rate (FDR) $< 5\%$ の条件を満たして発現量に差が認められた遺伝子は、190 個あり、非罹患双生児と比較して罹患双生児で発現上昇が認められたのが 62 遺伝子、発現低下が認められたのが 128 遺伝子であった。計 190 遺伝子の IPA の結果、Wnt シグナルに関連する遺伝子が有意にエンリッチしていた。また、24 日目に双生児間で発現量が異なっていた遺伝子は 184 個 (うち罹患双生児で発現増加が認められたのが 105 遺伝子、発現低下が認められたのは 79 遺伝子) あり、IPA の結果、Wnt シグナルのほかに、GABA 作動性神経細胞の分化に関連する遺伝子のエンリッチメントが確認された。

(6) 神経分化誘導 120 日目以降の成熟皮質神経細胞における興奮性・抑制性シナプスの免疫染色の結果、罹患双生児では非罹患双生児と比較して興奮性シナプスが少なく、抑制性シナプスが多いことを見出した。この結果を確認するため、GABA 抗体を用いた免疫染色を行い、GABA 陽性神経細胞の割合を評価したところ、罹患双生児 iPS 細胞由

来の皮質神経細胞では、非罹患双生児と比較して、その割合が多いことを確認した。

(7) 成熟皮質神経細胞の細胞体サイズおよび分岐数に双生児間で差は認められなかったが、罹患双生児由来の神経細胞では突起 (dendritic protrusion) の数に増加傾向が認められた。

(8) 罹患双生児、非罹患双生児いずれの iPS 細胞由来皮質神経細胞にも、非常に低頻度ではあるものの、自発発火能を有する細胞が存在し、興奮性・抑制性シナプス電位も確認できたことから、iPS 細胞由来の皮質神経細胞が生理学的にある程度成熟し、ネットワークを形成していることを確認した。

(9) 全ゲノム解析の結果から両親のゲノムには存在せず、双生児のどちらか一方のみに認められる *de novo* 変異 (一塩基変異、コピー数変異、トランスポゾン挿入変異) の候補を絞り込み、PCR - ダイレクトシーケンスによる確認を行ったが、双生児間で不一致な *de novo* 変異の同定には至らなかった。

< 引用文献 >

(1) Craddock N, et al., Genetics of bipolar disorder. *Lancet*. **381**, 1654-1662 (2013)

(2) Takahashi K, et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. **131**, 861-872 (2007)

(3) Brennand KJ, et al., Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. **473**, 221-225 (2011)

(4) Koyanagi-Aoi M, et al., Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **110**, 20569-20574 (2013)

(5) Kondo T, et al., Modeling Alexander disease with patient iPSCs reveals cellular and molecular pathology of astrocytes. *Acta Neuropathol Commun*. **4**, 69 (2016)

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 0件)

[学会発表](計 3件)

(1) Sawada T, Chater TE, Goda Y, Kato T.

Neurodevelopmental differences underlie discordant psychosis in a pair of monozygotic twins. *Neuroscience 2016*, San Diego, CA (USA), Nov 15, 2016

(2) Sawada T, Chater TE, Goda Y, Kato T. Analysis of iPSC-derived Neural Cells from Monozygotic Twins Discordant for Bipolar Type Schizoaffective Disorder. *CiRA/ISSCR International Symposium 2016*, Kyoto Univ (Kyoto, Kyoto), Mar 23, 2016

(3) Sawada T, Chater TE, Goda Y, Kato T. Characterization of iPSC-derived Neural Cells from Monozygotic Twins Discordant for Bipolar Type Schizoaffective Disorder. *RIKEN Epigenetics 2016*, RIKEN (Wako, Saitama), Feb 15, 2016

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

澤田 知世 (SAWADA, Tomoyo)
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：90708471

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者

チェイター トーマス エドワード

(CHATER, Thomas Edward)

合田 裕紀子 (GODA, Yukiko)

加藤 忠史 (KATO, Tadafumi)