

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19760

研究課題名（和文）22q11.2欠失細胞から捉える統合失調症の病態解明

研究課題名（英文）Elucidation of schizophrenia pathology using iPSCs with 22q11.2 deletion

研究代表者

有岡 祐子 (Arioka, Yuko)

名古屋大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10709497

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）：染色体22q11.2欠失患者は統合失調症をはじめとする多様な精神神経疾患の発症リスクを有する。しかしながら、22q11.2欠失を起点として如何なる機序で精神神経疾患発症を引き起こすかは不明である。そこで本研究では、患者iPS細胞から誘導した神経細胞を用いて、22q11.2欠失が引き起こす神経細胞の分子・細胞病態解明を目指した。22q11.2欠失神経細胞では、小胞体関連シグナル異常とそれに伴う細胞内脆弱性が生じていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体22q11.2欠失症候群は指定難病のひとつであり、生涯にわたって多様な精神神経疾患の発症リスクを背負う。患者iPS細胞を用いた本研究結果により、染色体22q11.2欠失症候群の細胞・分子病態の一端が解明された。小胞体関連シグナルは近年様々な神経機能への影響が報告されている。今回同定した分子異常がどのように脳細胞異常を引き起こし、さらにはどのような脳機能異常をもたらすのか、今後のさらなる研究が期待される。

研究成果の概要（英文）：Patients with chromosome 22q11.2 deletion have high-risks for the onset of various neuropsychiatric disorders; however, its molecular and cellular pathology remains unclear. To address this, we used patient iPSC cell (iPSC)-derived neurons. Our findings revealed that compared to healthy control iPSC-derived neurons, patient iPSC-derived neurons showed defects in signals related to endoplasmic reticulum stress.

研究分野：生物精神医学

キーワード：染色体22q11.2欠失 精神神経疾患 iPSC細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) iPS 細胞を用いた精神疾患研究では再現性ある報告が乏しい  
iPS 細胞技術により、これまで不可能であったヒト由来中枢神経系の細胞レベルでの解析が可能となった。それに伴い、統合失調症患者由来 iPS 細胞を用いた報告が増えつつあるが、知見の再現性に欠ける。例えば、患者由来だとドパミン作動性ニューロン数が増加するという報告があれば減少してとの報告もある (Stem Cell Reports, 2014, Mol Psychiatry, 2013)。再現性の乏しい理由のひとつとして、統合失調症の遺伝的異質性、つまり発症に関わるゲノム変異の多様性にあると考えられる。
- (2) *In vitro* での精神疾患モデル作製にはゲノム変異に基づくことが適切  
精神疾患発症には遺伝要因に加え、環境要因も関係しているとされているが、*in vitro* では環境要因の再現は難しい。これを補うためには多数の患者由来の iPS 細胞を用いた解析が必要となるが現実的ではない。そのため、iPS 細胞を用いた精神疾患研究においては発症に強く関与する同一のゲノム変異保有者を対象として細胞解析をするのが適切だと提唱されている (Biol Psychiatry, 2014)。
- (3) 同一ゲノム変異保有者由来 iPS 細胞同士は同一の表現型を示す (申請者の研究成果)  
リーリンは統合失調症患者で分泌異常が報告されている (PNAS, 1998, Arch Gen Psychiatry, 2000)。研究代表者はリーリントランパク質をコードする RELN の欠失保有者 2 名から樹立した iPS 細胞を中枢神経系へ分化誘導を行ない、RELN 欠失群-健常者群で比較解析をおこなった。RELN 欠失群で神経細胞の migration 異常が観察された。RELN 欠失者間でばらつきが少なかったことから、同一のゲノム変異に基づいた iPS 細胞由来の神経細胞を用いることで、少ない n 数でも均一な条件下での解析が可能になると考えられる。

(1)-(3)から、ヒト *in vitro* モデルを用いた精神疾患の病態解明には、発症脆弱性が強い同一ゲノム変異に基づいて解析を進めることが最善策ではないかと着想した。

- (4) 染色体 22q11.2 欠失は最も強い精神疾患の脆弱性因子のひとつだがその理由是不明  
大規模な全ゲノム解析により、統合失調症発症には多様なゲノムコピー数変異 (CNV) が関与していることが報告されている。その中でも染色体 22q11.2 欠失保有者 (=22q11.2 欠失症候群: 22q11.2DS) は、欠失がない人に比べ約 40 倍も統合失調症発症リスクがあることが知られている。さらに、自閉スペクトラム症、うつ、双極性障害などその他の精神疾患の発症リスクでもある。しかし、未だどの様なメカニズムで染色体 22q11.2 欠失が精神疾患を引き起こすのか、ヒトにおける発症分子病態は明らかにされていない。

以上の背景から、染色体 22q11.2 欠失を標的として解析をすることが、精神疾患の病態解明に至る最適の方策と考えた。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は次の 2 つである。

- (1) 染色体 22q11.2 欠失細胞における分子ネットワーク異常を明らかにする  
健常者および 22q11.2DS 患者 iPS 細胞由来中枢神経系細胞を用いて分子ネットワーク解析を行ない、22q11.2 欠失が及ぼす細胞内分子ネットワークへの影響を明らかにする。
- (2) 22q11.2 欠失が及ぼす中枢神経系の表現型への影響を明らかにする  
健常者および 22q11.2DS 患者 iPS 細胞から中枢神経系へ分化させ、形態比較、分化能、生理的性質を比較する。また、1) で差異が認められた分子との関連を調べる。

## 3. 研究の方法

- (1) 対象 iPS 細胞  
健常者 3 例、22q11.2DS 患者 3 例からの iPS 細胞を使用した。健常者 1 例は理研から入手した 201B7 (Control1)、残り 2 例は日本人健常者男性 41 歳 (Control2)、日本人健常者女性 30 歳 (Control3) 由来とした。22q11.2DS 患者は 23 歳男性 (22DS1)、42 歳女性 (22DS2)、23 歳女性 (22DS3) 由来とした。201B7 以外はいずれも末梢血リンパ球からエピソームマルベクターによって初期化因子を導入し、iPS 細胞を樹立した。樹立基準は未分化マーカー (NANOG、TRA-1-60) の発現、*in vitro* における三胚葉分化能 (内胚葉: SOX17, 中胚葉:  $\alpha$ SMA, 外胚葉:  $\beta$ III-tubulin) を有すること、標的ゲノム変異以外疾患関連ゲノム変異以外を有していないこと、とした。
- (2) ドパミン神経細胞への誘導  
誘導方法は文献 1 に記載している方法に準じておこなった。
- (3) 質量分析による半定量プロテオーム解析  
タンパク質抽出はテンブロック型ホモジナイザーによる破碎抽出とした。抽出したタンパク質 (15 $\mu$ g) を処理したのち、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) によって解析した。出てきたデータに対し、Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fischer 社) と MASCOT search engine version 2.6.0 (Matrix Science 社) を利用してタンパク質を同定した。その後、健常者群と 22q11.2DS 患者群で発現量差が 10 倍以上かつ  $p < 0.05$  であったタンパク質に対

し、KEGG パスウェイ解析をおこなった。

- (4) 細胞免疫染色  
細胞を 4%PFA で固定後、0.3% TritonX-100 と 1%BSA により透過・ブロッッキング処理をした。1 次抗体 4°C で一晩反応後、それぞれ適切な蛍光標識 2 次抗体で室温 1 時間反応させた。1 次抗体は  $\beta$ III-tubulin 抗体 (T8660、Sigma-Aldrich 社)、tyrosine hydroxylase (TH) 抗体 (AB152、Millipore 社)、LC3-II (GTX127375、GeneTex 社) を使用した。
- (5) 薬剤  
小胞体ストレス誘導にはツニカマイシン (Sigma Aldrich 社)、酸化ストレス誘導には過酸化水素 (Wako 社) を用いた。細胞生存率の測定試薬には CellTiter96 Aqueous One Solution Promega 社 を用いて、測定感度以下の数値は 0 とした。Autophagic flux の評価としてバフィロマイシン A1 (Sigma Aldrich 社) を用いた。
- (6) タイムラプス撮像と解析  
タイムラプス撮像 およびその解析は IncuCyte (EssenBioscience) 社によって行なった。
- (7) 統計解析  
二群間の比較は Student の t 検定あるいは Welch の t 検定を適用した。P 値が 0.05 以下のものを有意とした。

#### 4. 研究成果

- (1) ドパミン神経細胞への誘導過程  
健常者および 22q11.2DS 患者 iPS 細胞をドパミン神経細胞へと誘導し、その分化過程を解析した。すべての iPS 細胞において、同様に TH (ドパミン神経細胞のマーカー) 陽性の細胞への分化が可能であった。しかし、22q11.2DS 患者群においては、 $\beta$ III-tubulin 陽性の神経突起長の有意な短縮が認められた。タイムラプス撮像による経時的な突起伸長変化を解析した結果からも、22q11.2DS 患者群の突起伸長異常が認められた (図 1)。22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では neuritogenesis の異常が存在することが示唆された。

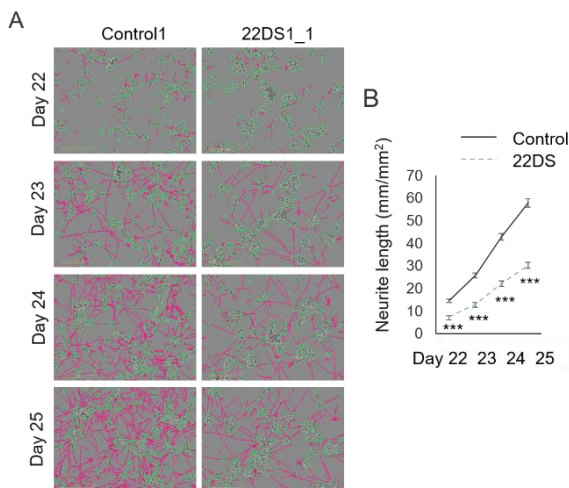


図 1 タイムラプス撮像による突起伸長の経時的解析  
22q11.2DS 患者由来の神経細胞は突起長が短い。\*\*\* $p < 0.001$  vs Control

- (2) 22q11.2DS ドパミン神経細胞の分子病態解析  
22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞における分子病態を明らかにするため、健常者由来ドパミン神経細胞と 22q11.2DS 患者由来ドパミン神経細胞を対象として、質量分析による半定量プロテオーム比較解析をおこなった。健常者群に比べ、22q11.2DS 患者群で発現差が 10 倍以上、かつ  $P < 0.05$  であったタンパク質は 272 個 (発現低下 264 個、発現増加 8 個) 同定された。この 272 個のタンパク質について KEGG パスウェイ解析をおこなったところ、最も有意に集積していたパスウェイは“Protein processing in endoplasmic reticulum”であった。このパスウェイは小胞体ストレスやタンパク質のクオリティコントロールに関与することから、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では小胞体ストレス応答やオートファジー異常が推測された。
- (3) 小体ストレス応答および autophagic flux 解析  
健常者ドパミン神経細胞および 22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞の小胞体ストレスに対する反応性を小胞体ストレス誘導時の生存率によって調べた。健常者ドパミン神経細胞では、4 $\mu$ g/ml 濃度のツニカマイシンから細胞死が認められはじめるのに対し、22q11.2DS 患者では 1 $\mu$ g/ml から顕著な細胞死が認められた。22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では、小胞体ストレスに対する抵抗性が低下していることが明らかとなった。また、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞ではオートファジー異常があるかどうかを解析するため、バフィロマイシン A1 添加前後の LC3-II 量 (autophagic flux) を比較した。22q11.2DS 患者群では autophagic flux の低下が認められ、オートファジー異常が示唆された。

#### <今後の展望>

小胞体ストレス応答やオートファジーはいずれもタンパク質のクオリティコントロールによって細胞内恒常性を維持する機構であり、今後この観点から 22q11.2DS の病態を解析していくことが期待される。

#### <引用文献>

1. Arioka Y, Shishido E, Kubo H, Kushima I, Yoshimi A, Kimura H, Ishizuka K, Aleksic B, Maeda T, Ishikawa M, Kuzumaki N, Okano H, Mori D, Ozaki N. Transl Psychiatry 8(1):129, 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有岡祐子、尾崎紀夫
2. 発表標題 稀なゲノム変異（バリエント）を有する患者iPS細胞に着目した精神疾患研究
3. 学会等名 第28回日本臨床精神神経薬理学会、第48回日本神経精神薬理学会合同年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有岡 祐子、久島 周、宍戸 恵美子、森 大輔、尾崎 紀夫
2. 発表標題 細胞から捉える精神疾患患者の分子基盤破綻
3. 学会等名 第34回日本ストレス学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有岡祐子、久島周、尾崎紀夫
2. 発表標題 染色体22q11.2欠失患者iPS細胞由来の神経細胞はストレス応答機構に依存した脆弱性を有する
3. 学会等名 第41回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----