

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04040

研究課題名（和文）精神障害の神経・グリアネットワーク病態解明：病態に基づく診断体系構築を目指して

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology related to neuro-glial networks in psychiatric disorders: Toward a pathogenesis-based diagnostic system

研究代表者

尾崎 紀夫 (Ozaki, Norio)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40281480

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,900,000円

研究成果の概要（和文）：精神疾患のゲノム解析では、グリア関連遺伝子ASTN2の稀なゲノムコピー数変異（CNV）が精神障害のリスクに関連することを見出した。ASTN2欠失iPS細胞由来ニューロスフェアを用いた遺伝子発現解析から、精神疾患病態との関与が示唆されるZNF558遺伝子の著明な発現低下を見出した。一方、統合失調症の発症リスクやグリア異常と関連する22q11.2欠失に関して、モデルマウスを用いた検討から、中脳神経細胞におけるPERKシグナルの低下を見出した。さらに統合失調症患者の脳組織を解析し、ミエリン・オリゴデンドロサイト異常を示唆する病理学的所見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、グリアに関連する遺伝子が精神障害のリスクに関与することが明らかになった。またモデル生物を用いたゲノム変異の解析から、精神疾患の病態に関与する遺伝子の発現低下や神経発達に必須の細胞内シグナル伝達の低下を明らかにした。統合失調症患者脳組織の解析からもオリゴデンドロサイトと呼ばれるグリア細胞の異常を見出した。以上の知見は、精神障害病態におけるグリア異常の関与を支持するとともに、将来的には、病態に基づいた診断体系の構築や治療法の開発に資することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In our genomic analysis, we found that rare genomic copy number variations (CNVs) in the glial-related gene ASTN2 are associated with the risk of psychiatric disorders (e.g., bipolar disorder). In gene expression analysis of neurospheres derived from iPS cells with ASTN2 deletion, we also found a marked decrease in expression of the ZNF558, which is suggested to be involved in the pathogenesis of psychiatric disorders. For the 22q11.2 deletion, which is associated with the risk of schizophrenia and glial abnormalities, we revealed a decrease in PERK signaling in midbrain neurons using a mouse model. Furthermore, analysis of brain tissue from schizophrenia patients identified pathological findings suggestive of myelin-oligodendrocyte abnormalities.

研究分野：精神医学分野

キーワード：グリア細胞 精神障害 iPS細胞 モデルマウス 22q11.2欠失 ASTN2

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から、正常な脳活動には神経細胞とグリア細胞の協調が不可欠であり、その破綻が精神障害の病態に関与することが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、統合失調症 (SCZ)、自閉スペクトラム症 (ASD)、双極性障害 (BD) を対象にゲノム解析を行い、グリア関連遺伝子のリスク変異、特に一塩基変異 (SNV) やコピー数変異 (CNV) を同定することで、グリアの病因としての意義を明らかにすることである。加えて、精神疾患横断的に発症に関与する変異 (ASTN2 欠失及び 22q11.2 欠失) に基づいたモデル生物を用いて、精神障害の神経・グリアネットワーク病態群を明らかにすることを目的とした。具体的には、ゲノム編集による ASTN2 欠失アイソジェニック iPS 細胞と ASTN2 欠失を有する SCZ 患者由来 iPS 細胞を用いて、ASTN2 欠失がもたらすヒト神経系細胞への生物学的影響と精神障害の病態への関与を検討した。一方、22q11.2 欠失は、神経軸索伸長やスパイン形成においてグリア細胞と密接に関与する Nogo 受容体をコードする RTN4R 遺伝子を含む。ゲノム編集技術によって 22q11.2 欠失をマウスで模倣したモデルマウスを作製し、22q11.2 欠失による神経細胞とグリア細胞が織りなす脳病態の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ターゲットシーケンス解析: SCZ、ASD、BD 患者と健常者を対象に、グリア関連遺伝子のシーケンス解析を実施した。シーケンスは、Ion Personal Genome Machine (PGM) システム (Thermo Fisher Scientific) を用いた。頻度の稀 (1%未満) な SNV と精神障害リスクとの関連を遺伝統計学的に検討した。データ解析は、Torrent Suite Software を用いた。

(2) 全ゲノム CNV 解析: SCZ、ASD、BD 患者と健常者を対象に、アレイ CGH (Agilent SurePrint G3 human CGH 400k) を用いて全ゲノムで CNV 解析を行った。CNV のコールは、Nexus Copy Number software v9.0 (BioDiscovery) を用いて実施し、CNV の quality control (QC) を経て、頻度の稀 (1%未満) な CNV データを得た。

(3) ASTN2 遺伝子の病態解析

iPS 細胞の樹立およびゲノム編集株の作製: 末梢血リンパ球に対し、エピソーマルベクターにて初期化因子を導入することで患者 iPS 細胞を樹立した。ASTN2 欠失 SCZ 患者の iPS 細胞の詳細は既報に記載した通りである (Arioka et al., Stem Cell Res 30:81-84, 2018)。

ASTN2 のノックアウト株の作製は、健常者 1 例より CRISPR/Cas9 法によって作製した。作製法は我々の既報に準じた方法で実施した (Arioka et al., Transl Psychiatry 8(1):129, 2018)。

ニューロスフェアの作製: 1 週間 iPS 細胞を SB431542, CHIR99021, dorsomorphin 入り培地で接着培養し、その後、B27, bFGF, LIF, Y-27632, CHIR99021, SB431542 入り培地にて浮遊培養することでニューロスフェアを作製した。解析は一度継代したニューロスフェアを用いた。

遺伝子発現解析: 網羅的遺伝子発現はマイクロアレイ (アジレント社) を用いた。定量的 RT-PCR の試薬は KAPA SYBR Fast qPCR (KAPA BIOSYSTEMS 社) を用い、解析は QuantStudio5 (Thermo Fisher Scientific 社) によって実施した。

(4) 22q11.2 欠失の病態解析

22q11.2 欠失モデルマウスの中脳における PERK シグナル病態の解析: 本研究項目の実施に先

立ち、22q11.2 欠失患者由来の iPS 細胞の樹立からドパミン神経細胞に分化し、形態学的には神経突起におけるアクチン動態の異常が認められ、その分子メカニズムの一端として PERK 遺伝子発現の低下によることを明らかにした(Arioka et al., EBioMedicine. 63:103138 2021)。このヒト細胞における現象が種間で保存されているかどうかを明らかにするために、22q11.2 欠失モデルマウスの脳において、ドパミン細胞が豊富に存在している中脳をピプラトームによる脳スライスの作成から実体顕微鏡下で採取し、イムノプロット法によって PERK 遺伝子の発現を調べた。

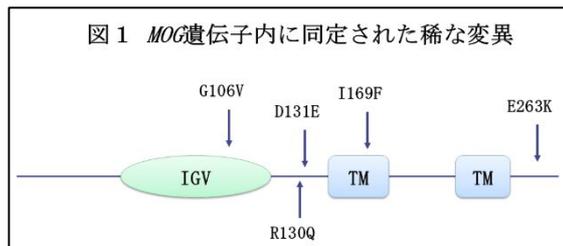
22q11.2 コンディショナルノックアウトマウスの作製：22q11.2 欠失モデルマウスのヘテロ欠失は発達が遅いものの繁殖は可能であるが、ホモ欠失は妊娠初期に致死となり、脳病態の解析は不可能である。この問題を解決するために、ゲノム編集技術によって loxP 配列をヒト 22q11.2 領域に相当するマウス染色体の 16A2 領域の両端にノックインしたマウスを作製した。C57BL6/J 系統によって戻し交配を進める過程で 2 箇所のノックインが同一の染色体に cis に入っていることを確認後に繁殖を進め、解析に必要な匹数を得ることを目指した。

(5) 患者死後脳組織の病理学的解析：SCZ 患者の死後脳を用いた病理学的検討では、病態との関連が指摘されている上側頭回と海馬においてオリゴデンドロサイトやミエリンの異常を、Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)の発現を指標に調べた。さらに臨床的に前頭側頭型認知症と診断され、行動異常や精神病症状を呈した患者の脳組織について、グリア細胞に着目して病理学的解析を実施した。

本研究で実施したゲノム解析、iPS 細胞解析、死後脳組織の解析は、名古屋大学医学部生命倫理委員会から承認を受けたうえで、患者または家族から書面で同意を得て実施した。

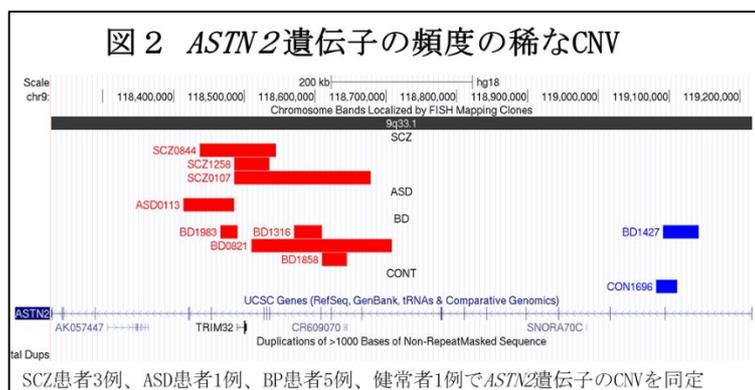
4. 研究成果

(1) ターゲットシーケンス解析：SCZ 患者 437 例、ASD 患者 187 例、健常者 524 例(合計 1148 例)を対象に、5 つのグリア関連遺伝子(MAFB, MAP1B, MOG, OLG1, SOX10)のシーケンス解析を実施した。その結果、各遺伝子のエクソン領域に合計 85 個の変異を同定し、そのうち頻度 1%未満の稀なミスセンス変異は合計 30 個だった(図 1：MOG 遺伝子内に同定された稀なミス



センス変異の例)。5 つのグリア関連遺伝子の稀な変異が患者群で多く集積しているか確認するため、5 遺伝子の変異をまとめて関連解析を実施したが、有意な差は認めなかった。加えて、各遺伝子毎の関連解析でも有意差を認めなかった。

(2) 全ゲノム CNV 解析：SCZ 患者 3014 例、ASD 患者 1205 例、BD 患者 1818 例、健常者 1847 例の CNV 解析を実施し、ASTN2 遺伝子の頻度の稀な CNV (1%未満)を SCZ 患者 3 例、ASD 患者 1 例、BD 患者 5 例、健常者 1 例で同定した(図 2)。ASTN2 欠失は ASD、ADHD を含む複数の精神疾患との関連が報告されていることもふまえ、疾患横断的な発症への関与が示唆さ

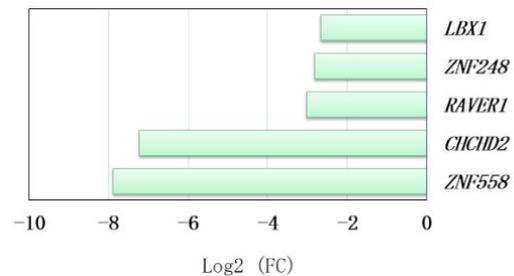


れた。遺伝統計学的な解析では、特に ASTN2 の CNV が BD リスクと有意に関連することを見出した。ASTN2 遺伝子は、astrotactin 2 をコードし、グリア細胞誘導性の神経細胞移動に関与する。

(3) ASTN2 遺伝子の病態解析

ASTN2 欠失 iPS 細胞由来ニューロスフェアの解析：ASTN2 欠失がニューロスフェアにどのような遺伝子発現変動をもたらすかを明らかにするため、健常者 iPS 細胞(ASTN2+/+)とその健常者から作製した ASTN2 欠失アイソジェニック iPS 細胞(ASTN2-/-)からそれぞれニューロスフェアを作製し、網羅的遺伝子発現比較解析を行った。Bonferroni による多重比較補正後 $p < 0.05$ の分子に絞り込んで解析をしたところ、ASTN2 欠失アイソジェニック細胞で発現低下していた分子は発現差が大きい順(トップ 5)に ZNF558, CHCHD2, RAV1, ZNF248, LBX1 であった(図 3)。

図 3 ASTN2欠失アイソジェニック細胞で発現低下していた分子 (top 5)



次に、ASTN2 欠失アイソジェニック細胞で発現低下が認められた分子が、精神障害の病態に関与しているかを調べるため、

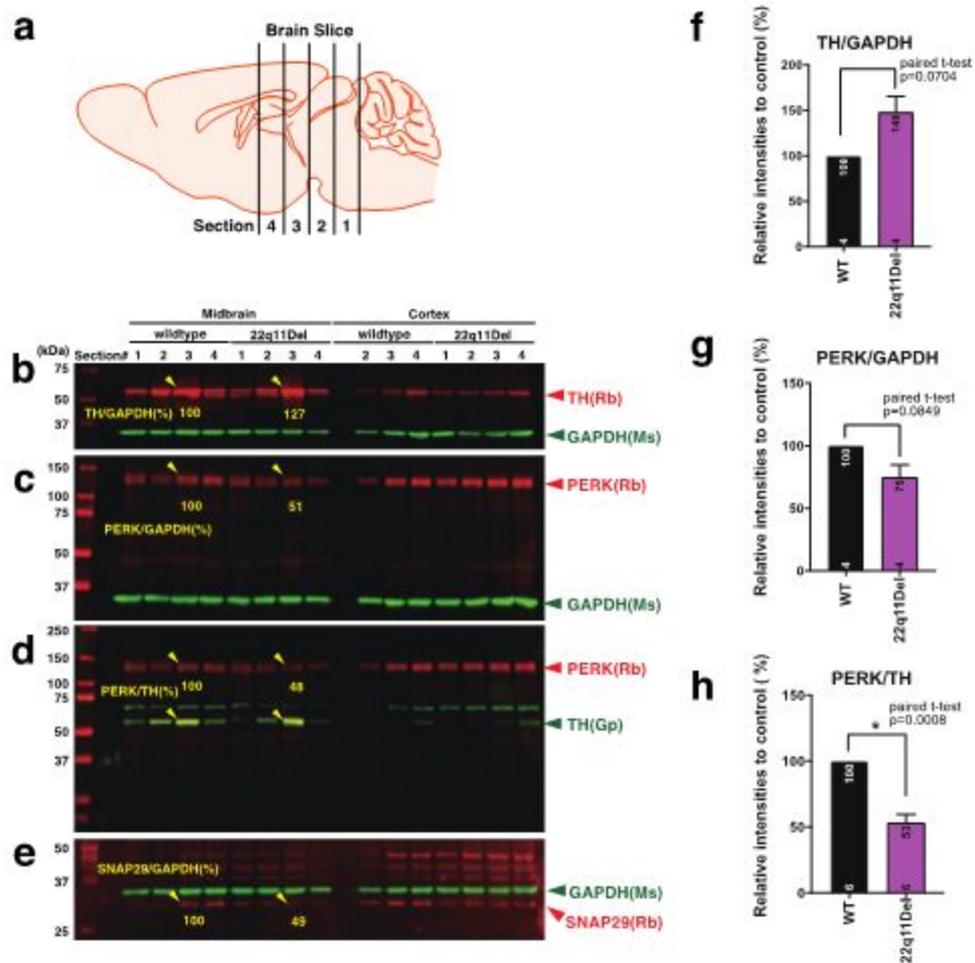
ASTN2 欠失 SCZ 患者から作製したニューロスフェアにおける発現を定量的 RT-PCR によって解析した。最も顕著に発現低下していた ZNF558 を調べたところ、ASTN2 欠失 SCZ 患者のニューロスフェアでも健常者に比べ、顕著な発現低下が認められた。ZNF558 の発現低下が精神障害の病態に関与している可能性が示唆された。ZNF558 は ASTN2 を含む ASD 関連遺伝子欠失神経細胞で共通して発現低下が認められた遺伝子として報告されている (Stem Cell Reports 11(5):1211-1225, 2018)。さらに、霊長類の中でもヒト特異的に発現することが報告されている (bioRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.08.18.255562>)。今後、ASTN2 と ZNF558 についてさらに詳細な解析をすすめ、精神障害の病態解明への寄与を目指す。

(4) 22q11.2 欠失の病態解析

22q11.2 欠失モデルマウスの中脳における PERK シグナル病態の解析：22q11.2 欠失モデルマウスの脳において、ドパミン細胞が豊富に存在している中脳をピラトームによる脳スライスの作成から実体顕微鏡下で採取した(図 4 a)。スライスの各フラクションに whole lysate を作成し、まずはドパミン神経細胞の多い画分をマーカー遺伝子であるチロシン水酸化酵素(TH)のシグナル強度からイムノプロット法によって同定した(図 4 b)。続いて、PERK の発現量に関して同サンプルを用いて調べた。それぞれ PERK のシグナルを GAPDH(図 4 c)と TH(図 4 d)のシグナル強度で補正し、相対量を算出したところ、図 4 f~h に示されたように 22q11.2 欠失マウス由来のドーパミン神経細胞の豊富な領域において PERK の遺伝子発現が低下していることを明らかにした。なお 22q11.2 欠失内の遺伝子の一つである SNAP29 遺伝子の発現は、野生型と比べてヘテロ欠失マウス由来の脳では遺伝子発現がおおよそ半分であった(図 4 e)。

22q11.2 コンディショナルノックアウトマウスの作製：ゲノム編集技術によって loxP 配列をヒト 22q11.2 領域に相当するマウス染色体の 16A2 領域の両端にノックインしたマウスを作製した。C57BL6/J 系統によって戻し交配を進める過程で 2 箇所のノックインが同一の染色体に cis に入っていることを確認した。またこのマウスから神経細胞を採取し、Cre-GFP を発現するプラスミドを遺伝子導入したところ、Cre の発現による loxP 間での組み替えを PCR とシーケンス解析によって確認した。Cre 発現マウスとの交配による個体レベルでの確認は現在実施中である。

図4 22q11.2欠失マウス中脳における PERK遺伝子発現の低下



(a) マウス中脳のサンプリング
 (b-e) イムノブロット
 (f-h) 相対定量結果

(5) 患者死後脳組織の病理学的解析：SCZ 患者の上側頭回の新皮質や海馬 CA3 領域において、健常者脳組織と比較して、MOG 発現の有意な低下を認めた。また患者では MOG 陽性の繊維状構造の厚さが有意に低下していることを見出し、SCZ におけるミエリン・オリゴデンドロサイト異常を支持する知見を得た。さらに 22q11.2 欠失をもつ SCZ 患者の死後脳組織を用いた検討でも同様の所見を得た。行動異常や精神病症状を呈し前頭側頭型認知症と診断された患者の病理解析では、オリゴデンドロサイト内に 4R-tau 陽性球状封入体 (globular oligodendroglial inclusion) の蓄積を見出し、Globular glial tauopathy の所見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Baba M, Yokoyama K, Seiriki K, Naka Y, Matsumura K, Kondo M, Yamamoto K, Hayashida M, Kasai A, Ago Y, Nagayasu K, Hayata-Takano A, Takahashi A, Yamaguchi S, Mori D, Ozaki N, Yamamoto T, Takuma K, Hashimoto R, Hashimoto H, Nakazawa T	4. 巻 44
2. 論文標題 Psychiatric-disorder-related behavioral phenotypes and cortical hyperactivity in a mouse model of 3q29 deletion syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 2125 ~ 2135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-019-0441-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimi A, Yamada S, Kunimoto S, Aleksic B, Hirakawa A, Ohashi MS, Matsumoto A, Hada K, Itoh N, Arioka Y, Kimura H, Kushima I, Nakamura Y, Shiino T, Mori D, Tanaka S, Hamada S, Noda Y, Nagai T, Yamada K, Ozaki N	4. 巻 9
2. 論文標題 Proteomic analysis of lymphoblastoid cell lines from schizophrenic patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-019-0461-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sawahata M, Mori D, Arioka Y, Kubo H, Kushima I, Kitagawa K, Sobue A, Shishido E, Sekiguchi M, Kodama A, Ikeda R, Aleksic B, Kimura H, Ishizuka K, Nagai T, Kaibuchi K, Nabeshima T, Yamada K, Ozaki N	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation and analysis of novel Reln deleted mouse model corresponding to exonic Reln deletion in schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12993	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yanjie Yu, Yingni Lin, Yuto Takasaki, Chenyao Wang, Hiroki Kimura, Jingrui Xing, Kanako Ishizuka, Miho Toyama, Itaru Kushima, Daisuke Mori, Yuko Arioka, Yota Uno, Tomoko Shiino, Yukako Nakamura, Takashi Okada, Mako Morikawa, Masashi Ikeda, Branko Aleksic, Kinji Ohno, Norio Ozaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Rare loss of function mutations in N-methyl-d-aspartate glutamate receptors and their contributions to schizophrenia susceptibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-017-0061-y	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Maeri, Kushima Itaru, Suzuki Ryohei, Branko Aleksic, Kawano Naoko, Inada Toshiya, Iidaka Tetsuya, Ozaki Norio	4. 巻 278
2. 論文標題 Aberrant functional connectivity between the thalamus and visual cortex is related to attentional impairment in schizophrenia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Psychiatry Research: Neuroimaging	6. 最初と最後の頁 35 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psychresns.2018.06.007	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kunisawa Kazuo, Shimizu Takeshi, Kushima Itaru, Aleksic Branko, Mori Daisuke, Osanai Yasuyuki, Kobayashi Kenta, Taylor Anna M., Bhat Manzoor A., Hayashi Akiko, Baba Hiroko, Ozaki Norio, Ikenaka Kazuhiro	4. 巻 147
2. 論文標題 Dysregulation of schizophrenia-related aquaporin 3 through disruption of paranode influences neuronal viability	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 395 ~ 408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14553	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Hiroki, Kushima Itaru, Yohimi Akira, Aleksic Branko, Ozaki Norio	4. 巻 21
2. 論文標題 Copy Number Variant in the Region of Adenosine Kinase (ADK) and Its Possible Contribution to Schizophrenia Susceptibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 405 ~ 409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ijnp/pyx103	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arioka Yuko, Kushima Itaru, Kubo Hisako, Mori Daisuke, Ozaki Norio	4. 巻 30
2. 論文標題 Induced pluripotent stem cells derived from a schizophrenia patient with ASTN2 deletion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 81 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2018.05.013	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 尾崎紀夫
2. 発表標題 精神疾患患者由来ゲノム・iPS細胞・死後脳の情報整備による大規模解析から根本的治療薬創成へ
3. 学会等名 精神神経学会研究推進委員会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ozaki N
2. 発表標題 22q11.2 deletion syndrome: clinical phenotypes to pathogenesis of mental disorders associated with this variant.
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Japanese Teratology Society The 13th World Congress of International Cleft Lip and Palate Foundation CLEFT2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ozaki N
2. 発表標題 Drug development for schizophrenia based on the pathogenesis from rare disease-susceptibility variants.
3. 学会等名 ASCNP2019DrugDevelopment (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------