

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19511

研究課題名(和文) 22q11.2欠失を起点とするiPS細胞を用いた統合失調症の脳・心臓病態解明

研究課題名(英文) Understanding brain and cardiac pathology in schizophrenia using 22q11.2 deletion patient-derived iPS cells.

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) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の臨床には、脳病態が不明で難治症例が多い、心疾患の合併や抗精神病薬の心循環器系副作用による死亡率の高さ、という課題が存在する。本研究では、統合失調症の最大発症リスクである22q11.2欠失症候群患者iPS細胞由来心筋細胞及び神経細胞を用い、心臓及び脳病態を明らかにすることを企図した。その結果、脳病態の一因として小胞体ストレスに対する脆弱性の関与を明らかにした。また、心臓モデルとして心筋細胞への分化誘導および、その電気生理解析法を確立した。しかし、分化誘導キット製造中止により研究の中断を余儀なくされ、本研究期間内に詳細な解析を行うことはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症の臨床課題の解決には心臓及び脳双方の病態とその関連性についての理解が不可欠である。本研究では22q11.2欠失症候群患者からiPS細胞を樹立し、心筋細胞及び神経細胞を作製した。これらは統合失調症患者の心臓と脳双方の病態を反映するモデルとして有用と考えられ、今後の詳細な解析により病態解明への一歩となることが期待される。さらに、神経細胞を用いた解析では統合失調症患者の脳病態の一つとして小胞体ストレスに対する脆弱性の関与を明らかにしており、病態に基づく治療薬や将来的な発症予防法の開発に繋がるものが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have to solve the two main issues in schizophrenia: (1) the existence of many refractory cases due to unclear brain pathophysiology, (2) the high mortality rate due to complications of cardiac disease and cardiovascular side effects of antipsychotic drugs. To tackle the above-mentioned issues, we aimed to generate cardiomyocytes and neurons from 22q11.2 deletion syndrome patient-derived iPS cells and clarify the pathophysiology of heart and brain. As a result, we revealed the involvement of vulnerability to endoplasmic reticulum stress in dopaminergic neurons as one of the causes in brain pathophysiology. In addition, we established the method of differentiation into cardiomyocytes and electrophysiological analysis of cardiomyocytes. However, due to the discontinuation of the cardiomyocytes differentiation kit, we were forced to suspend our research and were not able to conduct a detailed analysis during this study.

研究分野：精神医学分野

キーワード：22q11.2欠失 iPS細胞 統合失調症 脳病態 心臓病態

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は国内で受診患者が約 80 万人を数え、世界では約 2000 万人が罹患していると推定されるなど、発症頻度の高い疾患の一つである。統合失調症では幻覚や妄想といった特徴的な症状に加え、意欲低下や認知機能の障害など脳に由来する精神症状をきたす。また、統合失調症患者では心臓死が多く、健常者と比較して寿命が短いことが知られる。

現在、統合失調症の臨床には 2 つの大きな課題が存在する。第一に「脳病態が不明で難治症例が多い点」、第二に「心疾患の合併や治療薬抗精神病薬の心循環器系副作用による死亡率の高さ」である。これらの課題の克服には、統合失調症における脳と心臓双方の病態理解が不可欠である。しかし、これまでの統合失調症の病態解明研究では、専ら脳だけが対象とされており、心臓病態については十分に検討されておらず、心臓病態と脳病態双方の関連性については未だ不明な点が多い。

染色体 22q11.2 領域の欠失は統合失調症の最大発症リスクであると同時に、高率に先天性心疾患を併発するため、22q11.2 欠失症候群 (22q11.2DS) 患者は抗精神病薬の効果と心循環器系副作用の両課題を抱えた代表例である。そのため、22q11.2DS 患者人工多能性幹 (iPS) 細胞から誘導した神経細胞及び心筋細胞は、統合失調症患者の脳と心臓の病態を反映する最適なモデル細胞と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は統合失調症に加え、先天性心疾患を併存する 22q11.2DS 患者由来 iPS 細胞を活用して脳と心臓の病態を反映するヒトモデル細胞を作製し、統合失調症患者における脳と心臓の病態を明確化することである。将来的には、治療効果と安全性に優れた治療薬開発に資することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) iPS 細胞の樹立

樹立対象は健常者及び 22q11.2DS 患者とした。それぞれの末梢血リンパ球に対して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 iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞の樹立および解析については、名古屋大学医学部生命倫理審査委員会によって承認を受けた (承認番号 2012-0184)。

### (2) 心筋細胞への分化誘導

iPS 細胞から心筋細胞への分化誘導は、計画開始当初は PSDif-Cardio Cardiomyocyte Differentiation Kit (StemRD 社) を用いていたが、研究期間の途中で販売中止となってしまう、入手が不可となった。他の数社のキットを用いて新たに誘導条件を検討し直した結果、PSC Cardiomyocyte Differentiation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いることに変更した。

### (3) 心筋細胞の機能解析

分化誘導した心筋細胞は心筋細胞マーカーである心筋トロポニン T (cTnT) を用いて免疫蛍光染色を行った。また、分化した心筋細胞を微小平面電極アレイ上に播種し、MED64 (アルファメッドサイエンティフィック) を用いて心筋の自発拍動に伴う細胞外電位変化を測定及び解析を行った。補正 FP 持続時間 (FPdCF) は下記の Fridericia 補正式に基づいて算出した。

$$FPdCF = \frac{FPD}{Inter\ spike\ interval^{0.33}}$$

### (4) 神経細胞への分化誘導と解析

解析対象神経細胞はドパミン神経細胞とした。ドパミン神経細胞への誘導は我々の既報に準じた (Arioka Y et al., Transl Psychiatry 8(1):129, 2018)。誘導効率はドパミン神経細胞マーカーである TH の陽性率によって解析した。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、質量分析による半定量プロテオーム解析を行った。その後、結果に基づく検証を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 健常者及び 22q11.2DS 患者由来 iPS 細胞からの心筋細胞分化誘導

分化開始 14 日目に免疫染色を行ったところ、健常者 (Control) 及び 22q11.2DS 患者細胞はともに cTnT 発現が認められ、心筋細胞へと分化していることが確認された。しかし、cTnT 発現細胞数は少なく、細胞株によっても大きく異なるため、既報に基づき心筋細胞の選別を行った。心筋細胞においては酸化的リン酸化によりエネルギーを得ており、グルコースを除去し、乳酸を添加した培地にて培養することで心筋細胞の選別が可能であることが報告されている。本研究においても分化誘導後に無グルコース乳酸添加培地で培養することにより、cTnT 陽性細胞数が増加し健常者、22q11.2DS 患者心筋細胞ともに選別が可能であった。

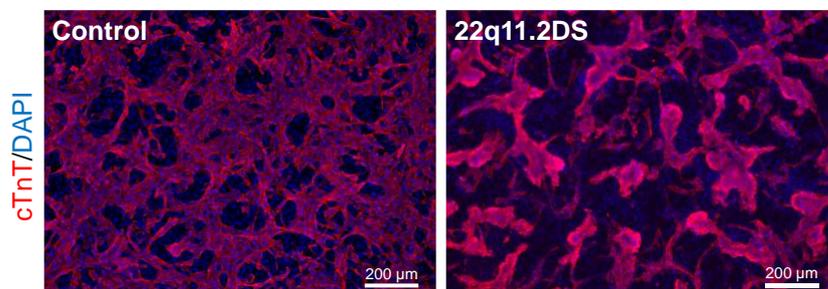


図 1 健常者 (Control) 及び 22q11.2DS 患者心筋細胞の免疫蛍光染色

### (2) iPS 細胞由来心筋細胞の機能解析

無グルコース乳酸添加培地により選別後の心筋細胞を微小平面電極アレイ上に播種し、hERG チャンネル阻害剤 (E-4031n 水和物) 添加による細胞外電位変化、特に心電図の QT 間隔に相当する FPD 変化の検討を行った。ベースラインにおける FPDcF は健常者と 22q11.2DS 患者心筋細胞でそれぞれ 270.3 msec 及び 277.9 msec であり、FPD に差は認められなかった。今回用いた iPS 細胞を樹立した 22q11.2DS 患者では、QT 延長などの心電図異常は認められず正常範囲内であり、本結果は実臨床と一致していると考えられる。また、E-4031n 水和物添加により健常者、22q11.2DS 患者心筋細胞ともに FPD の濃度依存的な延長が認められた。

本研究期間中に QT 延長評価に応用可能な心筋細胞を健常者と 22q11.2DS 患者それぞれから作製することに成功した。作成した 22q11.2DS 患者 iPS 細胞由来心筋細胞は新規抗精神病薬開発において、より実臨床に近い心循環器系副作用スクリーニング評価系として有用である可能性がある。今後、詳細な解析により心臓病態の解明を行うとともに、健常者と 22q11.2DS 患者心筋細胞に抗精神病薬が及ぼす FPD への影響の違いを検討していくことで、より安全性に優れた治療薬開発に貢献可能な評価系を構築することを目指す。

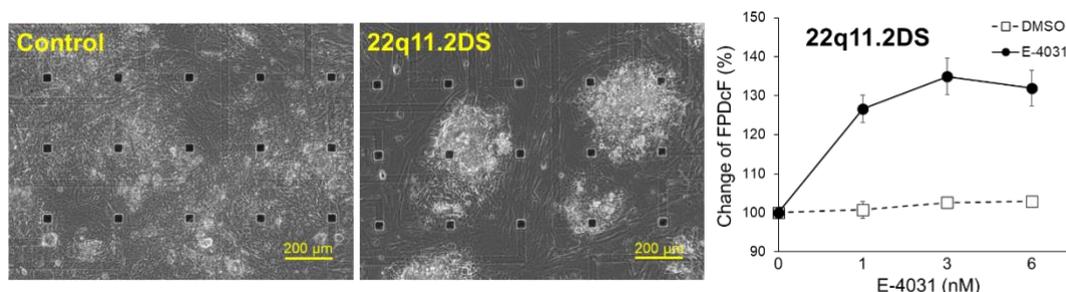


図 2 微小平面電極アレイ上の心筋細胞及び 22q11.2DS 患者心筋細胞における FPD 変化

### (3) iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の解析

健常者 3 例と 22q11.2DS 患者 3 例の iPS 細胞からそれぞれドパミン神経細胞へと誘導したところ、すべての iPS 細胞において同様に TH 陽性細胞への分化が可能であった。これらのドパミン神経細胞に対し、質量分析による半定量プロテオーム解析を行った。健常者に比べ、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が 272 個同定された。これらタンパク質について KEGG パスウェイ解析を行ったところ、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に関与することから、小胞体ストレスに対する応答性について、ツニカマイシン (小胞体ストレス誘発剤) を用いて調べたところ、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞ではより低濃度のツニカマイシンで細胞死することがわかった。22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では小胞体ストレス応答 (UPR) 関連シグナルが変化していることが示唆された。そこで、UPR 関連シグナルを調べたところ、キナーゼタンパク質である PERK の顕著な発現低下とともに下流シグナルの変化が認め

られた。以上から、22q11.2DS 患者の脳病態のひとつとして、PERK シグナル変化による小胞体ストレス応答異常が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1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 Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Okada T, Uno Y, Morikawa M, Ishizuka K, Shiino T, Kimura H, Arioka Y, Yoshimi A, Takasaki Y, Yu Y, Nakamura Y, Ozaki N	4. 巻 24(11)
2. 論文標題 Comparative Analyses of Copy-Number Variation in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Reveal Etiological Overlap and Biological Insights	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 2838-2856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 ASCP2019DrugDevelopment（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
---------	---------