

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07057

研究課題名(和文) 疾患iPS分化神経細胞を用いたシナプス機能解析による統合失調症の病態機序解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathological mechanism of schizophrenia using synaptic function analysis with disease-specific induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived neurons

研究代表者

栗生 俊彦 (KURIU, TOSHIHIKO)

大阪医科薬科大学・医学部・特別職務担当教員(講師)

研究者番号：10401374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の病態機序を明らかにするために、統合失調症患者から得られた疾患iPS分化神経細胞を用いて、シナプス機能解析を行った。電気生理学的手法の適用により、疾患iPS分化神経細胞では、健康者由来iPS分化神経細胞と比較して、シナプス後電流(mEPSC)の振幅と頻度に異常があることを見出した。興味深いことに、統合失調症多発家系患者では、mEPSCの振幅と頻度が増強しているのに対し、3q29 microdeletion syndrome患者では、mEPSCの振幅と頻度が減少していることが明らかになった。これらの結果は、統合失調症患者においてシナプスレベルで機能異常が生じていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、遺伝的背景および臨床情報が明らかな統合失調症患者由来の疾患iPS分化神経細胞を用いて、シナプス機能解析を行った。結果は、統合失調症患者においてシナプスレベルで機能異常が生じていることを示唆しているが、統合失調症であっても、患者の遺伝的背景が異なる場合には、異なったシナプス機能異常が起こっていることが明らかとなった。今後、さらに自閉症等も含めた他の患者群のシナプス機能を調べることにより、精神疾患全般の解明に繋がることが期待される。また、本実験系は培養系を用いるため、将来的に統合失調症の創薬研究におけるスクリーニング系としての活用に繋がっていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathological mechanisms of schizophrenia, we analyzed the synaptic function of diseased iPSC differentiated neurons obtained from schizophrenia patients. Using electrophysiological techniques, we found that the amplitude and frequency of small postsynaptic currents (mEPSCs) were abnormal in diseased iPSC differentiated neurons compared to iPSC differentiated neurons derived from healthy individuals. Interestingly, they found that the amplitude and frequency of mEPSCs were enhanced in patients with multiple schizophrenia families, whereas they were reduced in patients with 3q29 microdeletion syndrome. These results suggest that functional abnormalities occur at the synaptic level in patients with schizophrenia.

研究分野：神経生理学

キーワード：電気生理 シナプス 統合失調症 iPSC細胞 神経細胞 分子イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症や自閉症等の精神疾患は、医療費や非就業のコストが全疾患の中でも大きな割合を占めており、その社会的負担は大きい。その病態機序は未だ不明である。これまでの研究では、ヒト由来の生きた神経細胞を直接解析することができないことが大きな問題点であり、その代替として主に死後脳やモデル動物が用いられてきた。しかしながら、統合失調症における病態機序の詳細を明らかにするためには、統合失調症患者由来の生きた神経細胞を直接調べ、その機能異常をシナプスレベルで明らかにすることが必須である。近年、iPS細胞技術により、患者由来の疾患神経細胞を直接的に扱うことが可能となった。遺伝的背景および臨床情報が明らかな疾患 iPS 分化神経細胞のシナプス機能を解析することで、遺伝子情報およびその症状と、シナプス機能調節の“破綻”とを関連付けて解析することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝的背景および臨床情報が紐付けされた疾患 iPS 分化神経細胞のシナプス機能異常を解析し、統合失調症の病態機序をシナプスレベルで明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者がすでにマウス海馬培養神経細胞を用いて確立している分子生物学的手法、形態学的手法および生理学的手法を結び付けてシナプス機能を解析する技術を疾患 iPS 分化神経細胞に適用し、統合失調症の病態機序をシナプスレベルで明らかにする。具体的には、「電気生理学的手法」と「分子イメージング法」を組み合わせた解析手法を、家系特異的遺伝子変異のような遺伝子情報および詳細な臨床情報が明らかな疾患 iPS 分化神経細胞及びマウス海馬培養神経細胞に適用して解析を行った。解析対象として、「統合失調症多発家系患者から得られた疾患 PS 分化神経細胞」及び「3q29 欠失統合失調症 (3q29 microdeletion syndrome) 患者から得られた疾患 PS 分化神経細胞」を選択した。

(1) 疾患 iPS 分化神経細胞の電気生理学的手法を用いた解析

ホールセルパッチクランプ法を用いて、疾患 iPS 分化神経細胞から単一シナプス後電流 (mEPSC) 及び軸索 (シナプス前部) の電気刺激によって引き起こされるシナプス後電流 (eEPSC) を測定し、健常者と患者間で比較した。

(2) 疾患 iPS 分化神経細胞の分子イメージング法を用いた解析

疾患 iPS 分化神経細胞に分子イメージング法を適用するための前段階として、海馬培養神経細胞の系を用いて、統合失調症関連蛋白質 Neurexin を蛍光標識して、分子動態を解析した。

4. 研究成果

(1) 疾患 iPS 分化神経細胞の電気生理学的手法を用いた解析

統合失調症多発家系患者由来の疾患 iPS 分化神経細胞に電気生理学的手法を適用してそのシナプス機能を解析したところ、疾患 iPS 分化神経細胞では、健常者由来の iPS 分化神経細胞に比較して興奮性シナプス電流の振幅と頻度が増強されていることを明らかにした (図 1)。一方、3q29 欠失統合失調症 (3q29 microdeletion syndrome) 患者から得られた疾患 PS 分化神経細胞では、mEPSC の振幅と頻度が健常者由来の iPS 分化神経細胞に比較して減少していることが明らかに

なった。この結果は、3q29 欠失統合失調症患者では、前述の統合失調症多発家系患者で見られる mEPSC の振幅の増強とは逆向きのシナプス機能異常が起こっていることを示しており、今後、遺伝的背景や臨床情報との相関を解析する予定である。

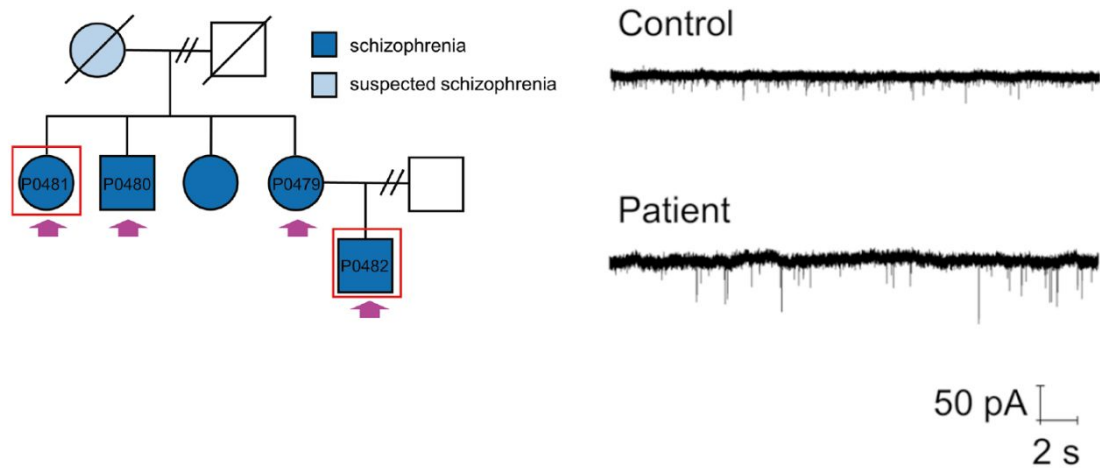


図1. 統合失調症多発家系患者由来 iPS 分化神経細胞における興奮性シナプス電流の増強。

(上図)統合失調症多発家系患者の家系図。(男性)および(女性)は統合失調症(schizophrenia)が発症した患者を示している。矢印は、遺伝子解析を行った患者を示している。(下図)P0481 と P0482(上図:囲み枠)の患者由来 iPS 分化神経細胞からシナプス電流(mEPSC)を測定した。健常者由来 iPS 分化神経細胞(Control)に比較して、患者由来 iPS 分化神経細胞(Patient)では、mEPSC の振幅および頻度が増強されていた(Yamamoto et al.2021 より改変)

さらに、3q29 欠失統合失調症患者については、連続して軸索を電気刺激することによって引き起こされるシナプス後電流(eEPSC)の paired-pulse depression についても測定を行った(図2)。Paired-pulse depression は、健常者と 3q29 欠失統合失調症患者では差が見られなかった。この結果は、3q29 欠失統合失調症患者ではシナプス前部の機能には異常がなく、主にシナプス後部機能が減弱していることを示唆している。

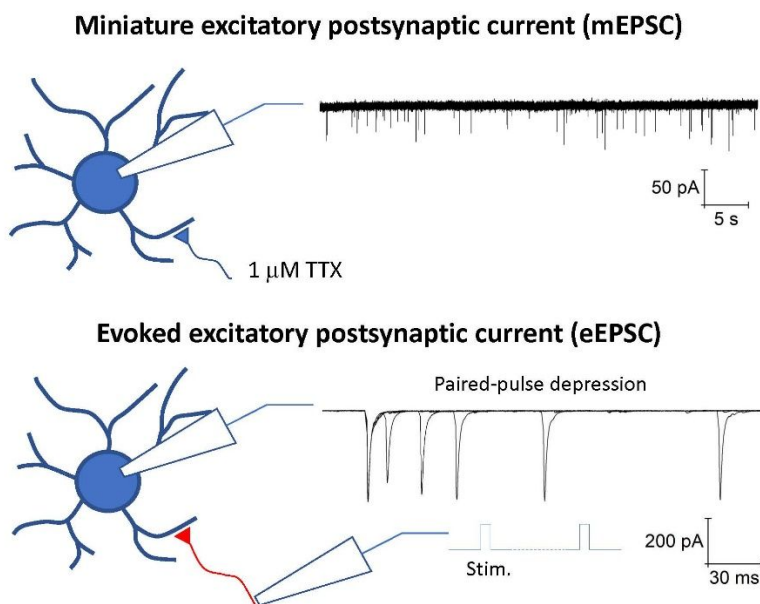


図2 . iPS 分化神経細胞から測定した興奮性シナプス後電流

(左) iPS 分化神経細胞における2種類の電気生理学的測定法の模式図。(右上) テトロドトキシン (TTX) 存在下で測定した単一シナプス後電流 (mEPSC)。(右下) 細胞外刺激電極による電気刺激によって引き起こされたシナプス後電流 (eEPSC)。15 ~ 30 ミリ秒間隔で連続した2回の電気刺激を与えると、2回目に引き起こされた eEPSC の振幅が減少した (Paired-pulse depression)。

(2) 疾患 iPS 分化神経細胞の分子イメージング法を用いた解析

統合失調症関連分子の分子イメージングについては、iPS分化神経細胞への適用の前段階として、マウス海馬神経細胞上でneurexin分子の動態解析を行った。これまでの結果から、軸索内でneurexin分子は両方向性の動態を示し、特定のシナプスに集積することにより、個々のシナプスの成熟を調節していることが明らかになった。これらの実験はマウス培養海馬神経細胞を用いているため、in vivoでも同様の現象が起こっているかを明らかにする必要がある。そのため、今後、海馬スライス標本を用いて、neurexin分子のin vivoでの機能を解析する予定である。さらに、iPS分化神経細胞上でneurexin分子の動態を観察することにより、統合失調症の病態機序をシナプスレベルで明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yamamoto K, Kuriu T, Matsumura K, Nagayasu K, Tsurusaki Y, Miyake N, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Fujiwara M, Baba M, Kitagawa K, Takemoto T, Gotoda-Nishimura N, Takada T, Seiriki K, Hayata-Takano A, Kasai A, Ago Y, Kida S, Takuma K, Ono F, Matsumoto N, Hashimoto R, Hashimoto H, Nakazawa T	4. 巻 11
2. 論文標題 Multiple alterations in glutamatergic transmission and dopamine D2 receptor splicing in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with familial schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 548-548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-021-01676-1	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 -

1. 著者名 Nozawa Osamu, Miyata Muneaki, Shiotani Hajime, Kameyama Takeshi, Komaki Ryouhei, Shimizu Tatsuhiko, Kuriu Toshihiko, Kashiwagi Yutaro, Sato Yuka, Koebisu Michinori, Aiba Atsu, Okabe Shigeo, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi	4. 巻 150
2. 論文標題 Nec12/3-mediated mechanism for tripartite synapse formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development	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) 10.1242/dev.200931	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 -

1. 著者名 Maruo Tomohiko, Mizutani Kiyohito, Miyata Muneaki, Kuriu Toshihiko, Sakakibara Shotaro, Takahashi Hatena, Kida Daichi, Maesaka Kouki, Sugaya Tsukiko, Sakane Ayuko, Sasaki Takuya, Takai Yoshimi, Mandai Kenji	4. 巻 299
2. 論文標題 s-Afadin binds to MAGUIN/Cnksr2 and regulates the localization of the AMPA receptor and glutamatergic synaptic response in hippocampal neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 103040 ~ 103040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.103040	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0件

〔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
---------	---------