

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659570

研究課題名（和文）統合失調症を合併した22q11.2欠失症候群のiPS細胞の解析

研究課題名（英文）Analysis of iPS cells from patients with 22q11.2 deletion and schizophrenia

研究代表者

吉川 武男（YOSHIKAWA TAKEO）

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：30249958

研究成果の概要（和文）：

22q11.2欠失と統合失調症を合併した2人から、iPS細胞を樹立した。対照群としては、精神疾患の既往歴のない2人からiPS細胞を樹立した。さらに、iPS細胞から神経幹細胞塊(NS: neurosphere)へと分化させた。NSの段階でcDNAマイクロアレイ解析をしたところ、DGCR8というmiRNAのプロセッシングに関与する遺伝子の発現が患者サンプルで低下していたので、miRNAの網羅的解析を行ったところ、NSから神経系の細胞分化に必要なmiRNAの発現に異常が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We established iPS cells from two patients with 22q11.2 deletion and schizophrenia. Control iPS cells were from two normal subjects. We differentiated them into neurospheres (NS). Using these NS, we performed cDNA microarray analysis and found that *DGCR8* gene, which is responsible for miRNA processing, is down-regulated in the NS from patients. Then we did miRNA chip analysis and revealed that the expressions of miRNAs relevant to differentiation from NS to neurons are dysregulated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：22q11.2欠失、統合失調症、iPS cell、neurosphere、DGCR8、let-7 family

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト22番染色体

ヒト22番染色体長腕(22q)は、1) 集団遺伝学的解析において、連鎖や関連が繰り返し報告されてきた領域である、2) 実際、22q11.2の微小欠失が統合失調症の発症リスクを約40倍増大させる、ことなどから統合失調症の責任領域の一つとして重要視されている。なお22q11.2近傍には、*PRODH*, *TBX1*, *RTN4R*, *COMT*, *NEFH*, *ZNF74*, *CHEK2*,

NF2, *SOX10*, *EP300*, *WNT7B*, *SHANK*などの(精神疾患関連)遺伝子が含まれるが、決定的な責任遺伝子の同定には至っていない。また、その詳細なメカニズムも解明されていない。

(2) 22q11.2欠失症候群

22q11.2欠失症候群は、染色体異常症の一つで、22qの一部であるq11.2のヘテロ欠失(deletion)が認められる。臨床上の特徴として、特異的な顔貌、胸腺の低形成、副甲状腺の低

形成、心室流出路から大血管の異常をともなった先天性心疾患などを合併することが多い。また、統合失調症の合併率は、上述のように染色体異常のない群に比較して約 40 倍高くなると言われている。

(3) iPS 細胞

iPS 細胞は、成体の分化細胞から誘導した多能性幹細胞である（京都大学の山中教授が 2006 年にマウス iPS 細胞を、2007 年にヒト iPS 細胞を作製した）。ヒトの iPS 細胞は、マウスの場合と同様に分化細胞にレトロウイルスによって多能性幹細胞特異的転写因子群（*OTX3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC*）を導入し、多能性を獲得したものを選抜することにより作製する。

2. 研究の目的

統合失調症は一旦発症すると完治が困難であるため、発症機序解明と発症予防開発が疾患研究にとって重要な目標と言える。統合失調症の原因については、種々の状況証拠から神経発達障害仮説が、遺伝子研究では 22q11.2 との関係が古くから知られているが、決定的な発症機序解明には至っていない。本研究では、統合失調症を合併した 22q11.2 欠失症候群患者様について、1) ゲノム欠失領域を決定し、欠失遺伝子群を絞りこむ、2) 健常者および患者様由来 iPS 細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行い、mRNA、miRNA の発現制御異常の観点から、神経細胞への分化・発達に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Array CGH

22q11.2 の欠失領域を正確に決定するために、DNA アレイを用いた比較ゲノムハイブリダイゼーション (comparative genomic hybridization) 法を用いた解析を行った。市販の合成核酸を貼付けたアレイ [Human CGH 3x1.4M Whole-Genome Tiling Arrays (NimbleGen)] を用いることにより、loss of heterozygosity (LOH) を検索した。

(2) 22q11.2 欠失症候群患者様由来 iPS 細胞の樹立および分化能の検討

当該患者様由来 iPS 細胞を、胚様体 (EB: embryonic body) 専用培地を用いて 30 日間浮遊培養を行い、EB を作製する。その後、神経幹細胞塊 (NS: neurosphere) 専用培地を用いて浮遊培養を行い、12 日ごとに NS の継代を繰り返す。少なくとも 3 回の継代を経た後に、NS を神経系細胞に分化誘導する。健常者由来 iPS 細胞についても同様のアプローチを採用する。22q11.2 欠失症候群患者様由来 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞について上記の解析を行い、結果を比較することにより、22q11.2 欠失が神経系細胞分化に与える影響を詳細に検討する。

(3) トランスクリプトーム解析

iPS 細胞、NS を対象に、mRNA に関しては、Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) のプラットフォームを、miRNA に関しては、SurePrint G3 Human miRNA 8x60K Rel16.0 (Agilent) のプラットフォームを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) Array CGH

欠失領域の大きさは、2 人 (両方女性) とも、2.6 Mb であった。図 1 参照。

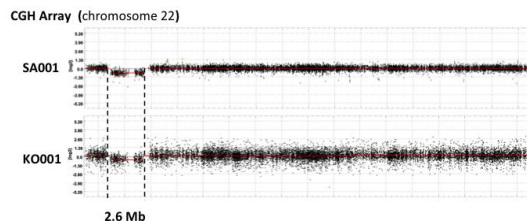


図 1 : SA001 および KO001 は、患者様の ID

(2) 22q11.2 欠失症候群患者様由来 iPS 細胞の樹立および分化能の検討

患者様由来 iPS 細胞、および健常者由来 iPS 細胞は、すべて NS および β III-tubulin 陽性の神経細胞に分化させることが出来ることが分かった。図 2 参照。

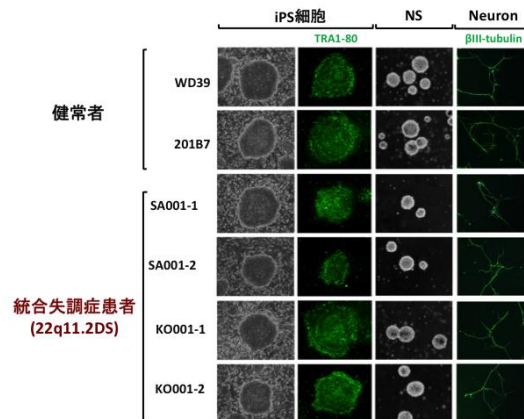


図 2

ただ、分化効率に関しては、患者群と健常群の間で、明瞭な差は認められなかった。

(3) トランスクリプトーム解析

マイクロアレイを用いた解析で、欠失領域に存在する遺伝子の転写産物のうち、発現量に関して有意な P 値を示した代表的な mRNA を、iPS 細胞と NS に分けて示したものが下図である。22q11.2 はヘテロ欠失なので、患者

群では発現量がほぼ半分に低下している。欠失領域の中に *DGCR8* という遺伝子が含まれるが、これは pri-miRNA を pre-miRNA に変換する際働く。理由は不明であるが、*DGCR8* 発現量は iPS 細胞の段階では患者群と健常群で差がみられなかったが、NS の段階では患者群での発現レベルは、健常群の約半分に低下していた。図 3 参照。

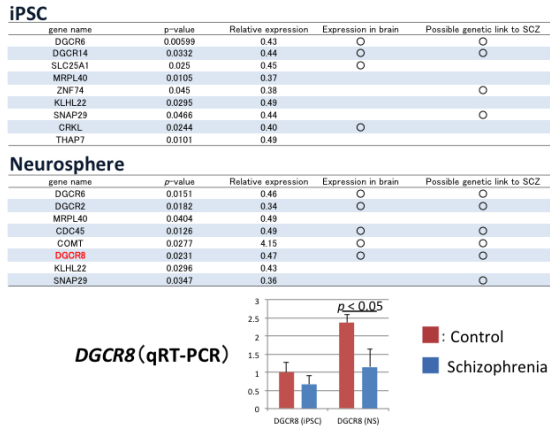


図 3

そこで miRNA 解析を iPS 細胞段階と NS 段階で行ったところ、iPS 細胞段階では疾患群と健常群で発現量は比較的相関したが、NS 段階では相関係数の低下を認めた。図 4 参照。このことは、*DGCR8* 遺伝子の発現量変化が iPS 細胞段階と NS 段階で異なることと関連している可能性はあるが、詳細は不明である。

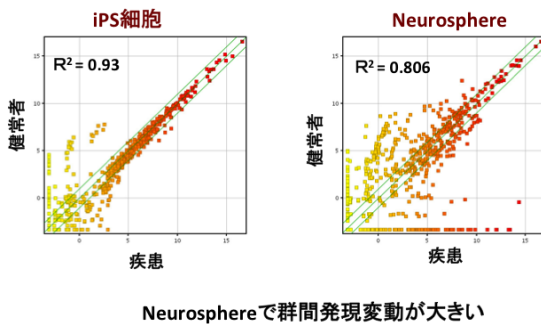


図 4

miRNA (hsa-miR)	P-value	Relative expression	chr
126	0.0252	2.04	chr9
1274a	0.0115	2.08	chr5
4284	0.0081	2.24	chr7
1260b	0.0081	2.36	chr11
424	0.0273	4.25	chrX
371-5p	0.0211	6.54	chr19
498	0.0102	8.95	chr19
1181	0.0345	9.80	chr19

発現増加

miRNA (hsa-miR)	P-value	Relative expression	chr
29c	0.0322	0.50	chr1
27b	0.0185	0.47	chr9
532-3p	0.0044	0.45	chrX
362-3p	0.0105	0.44	chrX
500a	0.0096	0.44	chrX
502-3p	0.0003	0.41	chrX
23b	0.0457	0.39	chr9
501-5p	0.0459	0.34	chrX
598	0.0419	0.33	chr8
342-5p	0.0419	0.33	chr14
652	0.0344	0.32	chrX
124	0.0463	0.28	chr8
4306	0.0126	0.26	chr13
338-3p	0.0175	0.22	chr17
185	0.0351	0.20	chr22
95	0.0368	0.16	chr4
9	0.0390	0.12	chr1
let-7a	0.0374	0.04	chr9

発現減少

疾患群の NS で発現量の変化が認められた代表的な miRNA のリストを図 5 に示す。

図 5

我々は、図 5 で *let-7a* miRNA の疾患群での発現レベルの低下に注目した。というのは、*let-7 family* は図 6 のように NS への分化に深く関わっているからである。

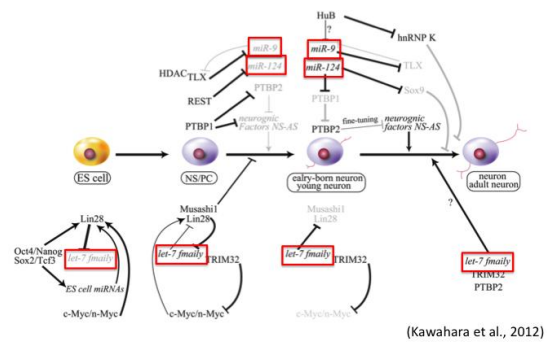


図 6

(4) まとめ

22q11.2 を持った「特殊な」統合失調症、iPS 細胞、トランスクリプトーム解析というキーワードで、統合失調症の神経発達障害にアプローチしたところ、注目すべき遺伝子として、*let-7 family* という miRNA が浮かび上がってきた。今後は、統合失調症の「一般例」を対象に加えて、上記 miRNA の役割、および NS の分化過程を詳細に検討することが重要と考えられる。

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 1 件)

Toyosima M, Maekawa M, Toyota T, Iwayama Y, Arai M, Ichikawa T, Miyashita M, Arinami T, Itokawa M, Yoshikawa T: A patient with 22q11.2 deletion who developed schizophrenia with additional genetic defects in *GL01* and *PHOX2B*. *Br J Psychiatry* 199: 245-246, 2011. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

豊島学、統合失調症特殊例 (22q11.2) の iPS 細胞樹立およびその機能解析. 第 45 回精神神経系薬物治療報告会、2012 年 12 月 15 日、大阪

[その他]

ホームページ:

http://www.riken.jp/en/research/labs/bsi/mol_psych/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 武男 (YOSHIKAWA TAKEO)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学
研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 30249958

(2) 研究分担者

前川 素子 (MAEKAWA MOTOKO)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学
研究チーム・研究員

研究者番号: 50435731

豊島 学 (TOYOSHIMA MANABU)

独立行政法人理化学研究所・分子精神科学
研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号: 90582750

(3) 研究協力者

慶応大学医学部生理学教室

岡野 栄之、赤松 和土、岡田 洋平