

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860055

研究課題名(和文) 精神疾患特異的iPS細胞における神経発達異常の検証

研究課題名(英文) Studies on mental disorder using patient-specific iPS cells

研究代表者

永安 一樹 (Nagayasu, Kazuki)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：00717902

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)：疾患特異的iPS細胞は、多くが未解明のヒトにおける疾患の成立過程を解析できる画期的実験系である。近年、神経発達や投射経路など発達初期の異常が精神疾患の原因として注目されているが、これら発達の初期過程が実際の患者どのように変化しているのかは不明である。そこで本研究では、精神疾患の疾患特異的iPS細胞の樹立および分化後の神経機能の解析を行った。その結果、患者および健常者からiPS細胞を樹立するとともに、迅速な神経分化誘導法の開発に成功した。さらにこれらの手法とトランスクリプトーム解析を組み合わせることで、治療薬への反応性に関わる可能性のある候補遺伝子の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that patient-specific iPS cells are promising resource to reveal the mechanisms of mental disorders. Lines of evidences indicate that abnormalities during neural development play a critical role in the development of mental disorders such as autism and schizophrenia. However, little is known about molecular mechanisms of the development of mental disorders. To unveil it, here we improved differentiation method for neural induction from human iPS cells and investigated possible mechanisms of the development of mental disorders.

研究分野：神経薬理学

キーワード：幹細胞 ウイルスベクター 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

精神疾患は、発症後の治療期間が非常に長期にわたる慢性疾患であるにもかかわらずその寛解率は低く、疾患原因の究明と治療法の開発は急務である。これらの精神疾患の背景には、遺伝素因およびその環境との相互作用における異常があると考えられており、現に一卵性双生児を対象とした研究により、自閉症における遺伝率 (heritability) は 90% にも及ぶことが明らかとなっている (Steffenburg ら, 1989, Bailey ら, 1995, Freitag, 2007)。

しかし、非常に大規模な解析が行われているにもかかわらず、多くの患者で共通してみられる変異は未発見であることから、大きな影響を及ぼす非常に希な変異 (rare variants) が各患者ごとに個別に発生しているのではないかという common-disease rare-variant 仮説が提唱されているものの (Cirulli and Goldstein, 2010) その実証には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、特にアンメットニーズが大きい精神疾患の疾患特異的 iPS 細胞の樹立および分化後の神経の機能の解析を行うとともに、exome 解析より得られる遺伝学的情報とを組み合わせ、これら疾患の成立、発展過程に関わる分子ネットワークを解明し、治療薬開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

沖田らの方法に従い、患者由来細胞にエピソームベクターを用いて初期化因子を一過性に発現させることで、患者由来 iPS 細胞の樹立を行った。樹立した iPS 細胞の維持は、Essential 8 medium (Life Technologies 社製)を用いて行い、3-4 日に 1 回、EDTA による継代を行った。

神経細胞への分化誘導 (直接法) は、Zhang らの方法に従い、neurogenin-2 発現レンチウイルスベクターを用いて行った。

神経幹細胞への分化誘導は、neural induction medium (Life Technologies 社製)を用いて行い、分化誘導後の継代は 3-4 日に 1 回、accutase を用いて行った。

その他の実験は常法に従って行った。

4. 研究成果

共同研究者である大阪大学病院・精神科・橋本亮太准教授、大阪大学大学院薬学研究科中澤敬信准教授、慶應大学医学部・岡野栄之教授らのご協力の下、複数の精神疾患患者より、iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞における未分化マーカーの発現、増殖速度やコロニーの形態などについて、健常者由来 iPS 細胞および患者由来 iPS 細胞の間の差について検討した結果、予備的ではあるが、両群間に顕著な差は見られなかったことから、幹細胞としての性質に著明な差は無いと考

えられた。

次に、iPS 由来神経細胞の機能解析に必要な神経分化誘導プロトコルの確立を行った。既報に従い、neurogenin-2 発現レンチウイルスベクターを用いた迅速な神経細胞への分化誘導を実施したところ、神経細胞様の形態をした細胞を得ることができたが、生存率は高くなく、極めて限られた数の神経細胞しか得られていない可能性が示唆される。生存細胞数の少なさの原因について、さらなる検討を行ったところ、死細胞の数が多いため、分化誘導後の接着率の低さにその原因がある可能性が示唆されたため、培養基質および培地について詳細に検討をおこなった。その結果、コート剤の濃度を高めるとともに、ウイルス感染効率を高める polybrene を培地から除去する等の改変をほどこすことで、多数の神経様細胞を得ることに成功した。またこの細胞を、神経細胞のマーカーである Tuj1 に対する抗体を用いて染色したところ、ほとんどすべての細胞が Tuj1 陽性の神経細胞であることが明らかになった (図 1)。

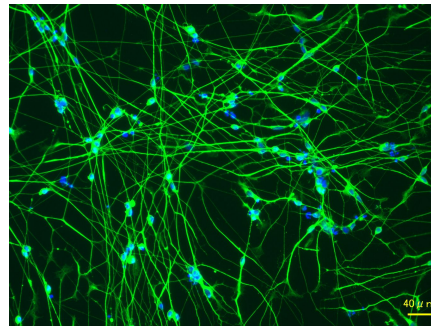


図 1. ヒト iPS 細胞の neurogenin-2 過剰発現による分化誘導

ヒト iPS 細胞に neurogenin-2 発現レンチウイルスベクターを感染させた。感染の 1 週間後、細胞を固定し、Tuj1 (緑) に対する免疫染色を行った。Hoechst による対比染色 (青) を行った。スケールバー = 40 μm

次に、神経系の発達過程における異常を検出するため、神経幹細胞を経由して神経細胞へと分化させる手法の確立を目指した。神経幹細胞を経由する分化手法としては、TGFβ および BMP 阻害薬を用いたいわゆる dual-SMAD inhibition が有用であると報告 (Chambers et al., Nature Biotech.)があるが、本研究では、一部異なるものの同様のリガンドを用いる、neural induction medium を使用した。

神経系の発達過程においては、腹側 - 背側軸の形成に sonic hedgehog (SHH) が重要な役割を果たしていることが知られている。そこでこの神経幹細胞への分化系が、生体内同様の SHH への感受性を有しているか検討を行ったところ、予備的ではあるが、SHH の添加により濃度依存的に NKX2.2, FOXA2, EN1, OLIG2, PHOX2A, GBX2 の発現が上昇し、PAX6 の発現が減少することを示唆する結果を得た。これらの結果は、本分化系が SHH 等のモ

ルフォジェンの影響を受け得る、生体内の器官発生と同様の経路を経ている分化系である可能性を示唆しているが、今後さらなる詳細な検討が必要であると考えらる。

最後に、neurogenin-2 発現レンチウイルスベクターを用いた分化プロトコルを、治療薬への反応性の異なる精神疾患患者由来 iPS 細胞に適用し、神経細胞における機能解析を実施した。分化誘導後得られた神経様細胞へと治療薬を持続処置し、処置後の細胞より RNA を回収し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、治療薬への反応性と相関して発現変動する遺伝子を複数同定することに成功した。今後、この同定した分子が、神経細胞において果たしている役割について解析を進めていく予定である。

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 15 件)

- 1 . Hashimoto R, Nakazawa T, Tsurusaki Y, Yasuda Y, Nagayasu K, Matsumura K, Kawashima H, Yamamori H, Fujimoto M, Ohi K, Umeda-Yano S, Fukunaga M, Fujino H, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Takeda M, Matsumoto N, Hashimoto H. Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder. *J Hum Genet.* 2016 Mar;61(3):199-206.
- 2 . Asaoka N, Nagayasu K, Nishitani N, Yamashiro M, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Olanzapine augments the effect of selective serotonin reuptake inhibitors by suppressing GABAergic inhibition via antagonism of 5-HT₆ receptors in the dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology.* 2015 Aug;95:261-8.
- 3 . Shibasaki Y, Hayata-Takano A, Hazama K, Nakazawa T, Shintani N, Kasai A, Nagayasu K, Hashimoto R, Tanida M, Katayama T, Matsuzaki S, Yamada K, Taniike M, Onaka Y, Ago Y, Waschek JA, Köves K, Reglődi D, Tamas A, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H. Atomoxetine reverses locomotor hyperactivity, impaired novel object recognition, and prepulse inhibition impairment in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuroscience.* 2015 Jun 25;297:95-104.
- 4 . Higashi S, Katagi K, Shintani N, Ikeda K, Sugimoto Y, Tsuchiya S, Inoue N, Tanaka S, Koumoto M, Kasai A, Nakazawa T, Hayata-Takano A, Hamagami K, Tomimoto S, Yoshida T, Ohkubo T, Nagayasu K, Ago Y, Onaka Y, Hashimoto R, Ichikawa A, Baba A, Hashimoto H. p13 overexpression in pancreatic β -cells ameliorates type 2 diabetes in high-fat-fed mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jun 12;461(4):612-7.
- 5 . Imoto Y, Kira T, Sukeno M, Nishitani N, Nagayasu K, Nakagawa T, Kaneko S, Kobayashi K, Segi-Nishida E. Role of the 5-HT₄ receptor in chronic fluoxetine treatment-induced neurogenic activity and granule cell dematuration in the dentate gyrus. *Mol Brain.* 2015 May 15;8:29.
- 6 . Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T, Haba R, Ago Y, Wang H, Kanoh T, Hayata-Takano A, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Hashimoto R, Matsuda T, Waschek JA, Kasai A, Nagayasu K, Baba A, Hashimoto H. CRTH2, a prostaglandin D2 receptor, mediates depression-related behavior in mice. *Behav Brain Res.* 2015 May 1;284:131-7.
- 7 . Asaoka N, Nagayasu K, Nishitani N, Yamashiro M, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Inhibition of histone deacetylases enhances the function of serotonergic neurons in organotypic raphe slice cultures. *Neurosci Lett.* 2015 Apr 23;593:72-7.
- 8 . Schulze W, Hayata-Takano A, Kamo T, Nakazawa T, Nagayasu K, Kasai A, Seiriki K, Shintani N, Ago Y, Farfan C, Hashimoto R, Baba A, Hashimoto H. Simultaneous neuron- and astrocyte-specific fluorescent marking. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Mar 27;459(1):81-6.
- 9 . Yamasaki A, Kasai A, Toi A, Kurita M, Kimoto S, Hayata-Takano A, Nakazawa T, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Ito A, Meltzer HY, Ago Y, Waschek JA, Onaka Y, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H. Identification of the role of bone morphogenetic protein (BMP) and transforming growth factor- β (TGF- β) signaling in the trajectory of serotonergic differentiation in a rapid assay in mouse embryonic stem cells in vitro. *J Neurochem.* 2015 Feb;132(4):418-28.
- 10 . Ogata K, Shintani N, Hayata-Takano A, Kamo T, Higashi S, Seiriki K, Momosaki H, Vaudry D, Vaudry H, Galas L, Kasai A, Nagayasu K, Nakazawa T, Hashimoto R, Ago Y, Matsuda T, Baba A, Hashimoto H. PACAP enhances axon

- outgrowth in cultured hippocampal neurons to a comparable extent as BDNF. PLoS One. 2015 Mar 25;10(3):e0120526.
- 1 1 . Malchenko S, Sredni ST, Hashimoto H, Kasai A, Nagayasu K, Xie J, Margaryan NV, Seiriki K, Lulla RR, Seftor RE, Pachman LM, Meltzer HY, Hendrix MJ, Soares MB. A mouse model of human primitive neuroectodermal tumors resulting from microenvironmentally-driven malignant transformation of orthotopically transplanted radial glial cells. PLoS One. 2015 Mar 31;10(3):e0121707.
 - 1 2 . Shintani N, Onaka Y, Hashimoto R, Takamura H, Nagata T, Umeda-Yano S, Mouri A, Mamiya T, Haba R, Matsuzaki S, Katayama T, Yamamori H, Nakazawa T, Nagayasu K, Ago Y, Yagasaki Y, Nabeshima T, Takeda M, Hashimoto H. Behavioral characterization of mice overexpressing human dysbindin-1. Mol Brain. 2014 Oct 9;7:74.
 - 1 3 . Nishitani N, Nagayasu K, Asaoka N, Yamashiro M, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Raphe AMPA receptors and nicotinic acetylcholine receptors mediate ketamine-induced serotonin release in the rat prefrontal cortex. Int J Neuropsychopharmacol. 2014 Aug;17(8):1321-6.
 - 1 4 . Haba R, Shintani N, Onaka Y, Kanoh T, Wang H, Takenaga R, Hayata A, Hirai H, Nagata KY, Nakamura M, Kasai A, Hashimoto R, Nagayasu K, Nakazawa T, Hashimoto H, Baba A. Central CRTH2, a second prostaglandin D2 receptor, mediates emotional impairment in the lipopolysaccharide and tumor-induced sickness behavior model. J Neurosci. 2014 Feb 12;34(7):2514-23.
 - 1 5 . Takahashi A, Nagayasu K, Nishitani N, Kaneko S, Koide T. Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. PLoS One. 2014 Apr 16;9(4):e94657.
- [学会発表](計20件)
- 1 . 永安一樹、金子周司：背側縫線核セロトニン神経による情動調節機構 - ウイルスベクターを用いて - 第89回薬理学会年会 . 2016年3月
 - 2 . 永安一樹：アデノ・アデノ随伴・レンチウイルスベクターの作製と応用 第89回薬理学会年会 . 2016年3月
 - 3 . M. Fujiwara, M. Kikuchi, K. Nagayasu, T. Nakazawa, H. Yamamori, A. Kasai, A. Hayata-Takano, N. Shintani, M. Fujimoto, Y. Yasuda, M. Ishikawa, W. Akamatsu, H. Okano, A. Nakaya, H. Hashimoto, R. Hashimoto. Studies on the molecular mechanism of clozapine action with iPSC technology. 第89回薬理学会年会 . 2016年3月
 - 4 . 大住康晃, 永安一樹, 笠井淳司, 木本早紀, 尾中勇祐, 早田敦子, 中澤敬信, 新谷紀人, 橋本均：セロトニン神経機能に関わる遺伝子発現に対するmiRNAの作用 . 第128回日本薬理学会近畿部会 . 2015年11月
 - 5 . 笠井淳司、柿原素楽、岡田遼、狭間啓佑、中澤敬信、永安一樹、早田敦子、新谷紀人、橋本均：Practical optimization of in situ hybridization procedure for the detection of microRNAs and mRNA expression in brain tissues. Neuroscience 2015. 2015年10月
 - 6 . 加茂俊彦、早田敦子、勢力薫、尾形勝弥、中澤敬信、永安一樹、笠井淳司、新谷紀人、橋本均：miRNAを介したPACAPによる樹状突起スパイン形成機構 第45回日本神経精神薬理学会・第37回日本生物学的精神医学会合同年会 . 2015年9月
 - 7 . Matsumura K., Hashimoto R., Nakazawa T., Tsurusaki Y., Yasuda Y., Nagayasu K., Kawashima H., Yamamori H., Fujimoto M, Ohi K., Satomi U., Fukunaga M., Fujino H., Kasai A., Hayata A., Shintani N., Takeda M., Matsumoto N., Hashimoto H. : A screening method for functional analysis of autism-associated genes . 第38回日本神経科学大会 . 2015年7月
 - 8 . 尾中 勇祐、木野村 元彦、新谷 紀人、平井 博之、永田 欽也、中村 正孝、長谷部 茂、永安一樹、吾郷 由希夫、笠井 淳司、早田 敦子、中澤 敬信、田熊一敬、松田 敏夫、馬場 明道、橋本 均：がん治療後の脳機能障害の解明に有用な動物モデルの作製 . 第127回日本薬理学会近畿部会 . 2015年6月
 - 9 . 西谷直也、永安一樹、浅岡希美、山城茉弓、白川久志、中川貴之、金子周司 光遺伝学的手法を用いた背側縫線核セロトニン神経特異的制御による行動学的変化 . 2014年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム . 2014年12月
 - 1 0 . 永安一樹、松村憲佑、中澤敬信、安田由華、山森秀長、梅田知美、大井一高、橋本亮太、武田雅俊、橋本均 自閉スペクトラム症関連候補遺伝子のハイス

- ループ機能評価系による解析．2014年度包括脳ネットワーク冬のシンポジウム．2014年12月
- 11．西谷直也、永安一樹、浅岡希美、山城茉弓、白川久志、中川貴之、金子周司 ケタミンは縫線核 AMPA 受容体およびニコチン性アセチルコリン受容体を介して前頭前皮質 5-HT 遊離を引き起こす．第24回日本臨床精神神経薬理学会 第44回日本神経精神薬理学会合同年会．2014年11月
- 12．浅岡希美、永安一樹、西谷直也、山城茉弓、白川久志、中川貴之、金子周司 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の持続処置が縫線核セロトニン神経に与える影響．第24回日本臨床精神神経薬理学会 第44回日本神経精神薬理学会合同年会．2014年11月
- 13．松村憲佑、永安一樹、中澤敬信、安田由華、山森秀長、梅田知美、大井一高、橋本亮太、武田雅俊、橋本均 自閉症の疾患特異的候補遺伝子の機能的スクリーニング系の確立．第24回日本臨床精神神経薬理学会 第44回日本神経精神薬理学会合同年会．2014年11月
- 14．中澤敬信、橋本亮太、永安一樹、安田由華、山森秀長、梅田知美、藤本美智子、大井一高、石川充、赤松和土、岡野栄之、武田雅俊、橋本均 iPS 細胞関連技術を用いた統合失調症研究．第24回日本臨床精神神経薬理学会 第44回日本神経精神薬理学会合同年会．2014年11月
- 15．K.Nagayasu, N. Nishitani, N. Asaoka, M. Yamashiro, H. Shirakawa, T. Nakagawa, S. Kasparov, S. Kaneko. Lentiviral vector system for potent gene expression in serotonergic neurons of rats and mice. Neuroscience 2014. 2014年11月
- 16．勢力薫、笠井淳司、丹生光咲、早田敦子、永安一樹、中澤敬信、新谷紀人、橋本岳、橋本均 精神・神経疾患モデル動物の病態解析のための三次元全脳形態計測法の構築．第36回日本生物学的精神医学会 第57回日本神経化学学会大会合同年会．2014年9月
- 17．橋本均、新谷紀人、早田敦子、笠井淳司、永安一樹、中澤敬信 神経ペプチド PACAP による精神機能調節：創薬への展望．第36回日本生物学的精神医学会 第57回日本神経化学学会大会合同年会．2014年9月
- 18．柿原素楽、笠井淳司、岡田遼、狭間啓佑、中澤敬信、永安一樹、早田敦子、新谷紀人、橋本均 脳内 miRNA 発現の高感度検出に向けた in situ hybridization 法の最適化：炎症によ

り発現変化する脳内 miRNA の同定．生体機能と創薬シンポジウム 2014．2014年8月

- 19．尾中 勇祐、新谷 紀人、木野村 元彦、平井 博之、長田 欽也、中村 正孝、早田 敦子、笠井 淳司、永安一樹、中澤敬信、馬場 明道、橋本 均：コルチコステロン誘発性うつ病モデルを用いたプロスタノイド受容体 DP2 を介する情動制御機構の解析．生体機能と創薬シンポジウム 2014．2014年8月
- 20．浅岡希美、永安一樹、西谷直也、山城茉弓、白川久志、中川貴之、金子周司 オランザピンの縫線核セロトニン神経に対する作用と SSR1 作用増強機構．第125回日本薬理学会近畿部会．2014年6月

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://molpharm.umin.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

永安 一樹 (NAGAYASU, Kazuki)

大阪大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号：00717902

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし