

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860940

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた培養系・移植実験系による統合失調症の神経細胞病態解明

研究課題名(英文) Analysis of induced pluripotent stem cell derived-neurons of patients with schizophrenia in vitro and in vivo

研究代表者

鳥塚 通弘 (Toritsuka, Michihiro)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20588529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は人口の約1%を占める精神疾患だが、その病態は未解明である。生体脳から細胞を採取して解析できないことが、未解明である要因として大きい。iPS細胞の技術を用いることでヒト神経細胞の観察が可能になった。よって我々はより厳密な比較検討のため、統合失調症一卵性双生児不一致症例のサンプルを得て、iPS細胞由来神経細胞を作製し、その細胞生物学的な差異を検討した。結果として、統合失調症患者由来の神経細胞ではシナプス形成の異常が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathobiology of schizophrenia is still unclear despite its high lifetime prevalence about 1%. There exist methodological limitations under the difficulty such as inaccessibility of the live brain. However, a technology of induced pluripotent stem cells (iPSCs) allows us to investigate living human brain cells. Here, we present our studies using iPSCs-derived neurons of discordant schizophrenia and the healthy controls. As a result, impaired synapse formation was observed in iPSCs-derived neurons of schizophrenia patient.

研究分野：精神医学

キーワード：統合失調症 iPS細胞 シナプス 細胞培養

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の約1%を占め、臨床的には幻覚・妄想などの陽性症状、自閉・無為といった陰性症状と認知機能障害によって特徴づけられる、多くは慢性的な経過をたどる精神疾患である。その病因・病態については、疫学研究、遺伝学研究、死後脳研究や画像研究、動物モデルを用いた研究など幅広く行われているが、未だその解明には至っておらず、根治的な治療法の開発に向けた端緒も開けていないのが現状である。これまでのところ、複数の脆弱性遺伝子が複合的に作用して遺伝的基盤を形成し、環境要因とも相互作用しながら発病に至ると考えられている。死後脳研究からは、神経変性疾患で観察されるような顕著かつ特異的な病理学的所見は見出されておらず、より微細なレベルでの変化が病因と考えられている。疾患モデルとして培養系モデルが有用であると考えられるが、生体脳から検体を直接採取して培養を行うことは倫理的観点から現実には不可能であり、低侵襲の培養系が必要であった。

2006年に山中氏らによって確立されたiPS細胞(induced Pluripotent Stem cell)の技術(Takahashi K. & Yamanaka S., Cell 126, 663-676, 2006)は、応用することで患者由来の神経細胞やグリア細胞への分化誘導も原理的に可能となり、中枢神経の細胞生物学的解析に取り組めるようになった。

我々の知る限り、既に統合失調症患者のiPS細胞から神経細胞を作製し、比較検討している報告がいくつか存在しているが、いずれも症例数が少なく、また比較する上で適切な症例・対照を対象としているとは言い難い。よって我々は、統合失調症の一卵性双生児不一致症例ペア由来のiPS細胞を用いてこの疾患の病態生理の解明に迫りたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、統合失調症の一卵性双生

児不一致症例ペア由来のiPS細胞から作製した神経細胞を用いて、その細胞生物学的な差異を解析することにより統合失調症の病態生理の解明を目指すことである。

3. 研究の方法

(i) 対象およびiPS細胞の樹立

奈良県立医科大学精神科に通院、入院中の統合失調症患者で本研究に同意能力があり同意を得た患者、および本研究の趣旨に賛同し同意を得た健常対照者から、書面にて研究参加の同意を得る。対象者の上腕内側部等から、局所麻酔下に皮膚生検を行う。得られた皮膚から線維芽細胞を培養し、エピソーマルプラスミドベクターを用いた方法(Okita K. et al., Nat Methods., 8(5):409-12, 2011)でiPS細胞を樹立し、保存する。樹立したiPS細胞株の中から、qPCR法でエピソーマルプラスミドベクターの残存が無い株を選び、以降の解析に用いる。

(ii) 培養系における解析

樹立したiPS細胞株から神経細胞への分化誘導法に関しては、慶應義塾大学医学部生理学教室・岡野栄之研究室からの技術指導を得て、ニューロスフェア法で行う。同研究室で開発された方法によって、iPS細胞から2週間程度で神経幹細胞(ニューロスフェア)を誘導できるようになっている。浮遊培養にてニューロスフェアを誘導後、接着させ神経細胞に分化させる。免疫染色法による組織学的解析、マイクロアレイやqRT-PCR法による遺伝子発現解析、パッチクランプ法による電気生理学的解析を継時的に行う。

一個体につき複数のiPS細胞株を分化誘導し、安定して実験に供せる株を特定する。

(iii) マウス脳内への移植実験

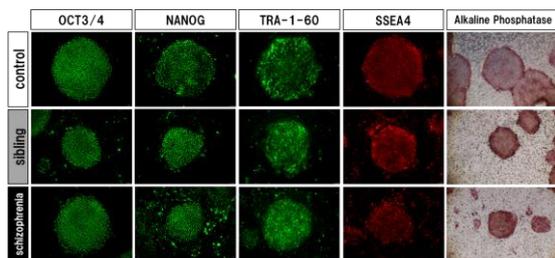
統合失調症の死後脳研究や画像研究を鑑みた場合、細胞レベルでの変化は極めて微細

なものになると予想される。このため詳細な細胞生物学的な解析をマウス生体内で行う方法として、ヒト神経幹細胞（ニューロスフェア）にレンチウイルスベクターで膜タンパク融合 GFP（Green Fluorescent Protein）の遺伝子を組み込み、免疫不全マウス（NOD/SCID マウス）の脳内に移植し、1-2 ヶ月後に屠殺し解析する。

4. 研究成果

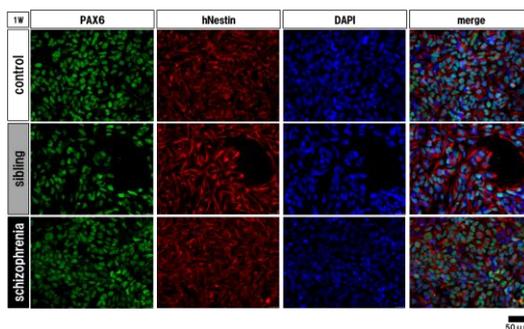
統合失調症患者 11 名、健常対照者 12 名から書面にて研究参加の同意を得た。全例の上腕内側部からパンチバイオペシーを行ったが、特に合併症は生じなかった。得られた皮膚から皮膚線維芽細胞を培養し保存した。このうち 8 名の検体からエピソーマルプラスミドベクターを用いた方法で iPS 細胞を樹立し、保存した。作成した iPS 細胞のうち、双子 1 ペア及び年齢・性別をマッチさせた健常対照者 1 名の計 3 名のサンプルを用いて、以後の解析を行い以下の結果を得た。

(1) iPS 細胞の誘導性に群間で差は無かった。iPS 細胞の多能性細胞マーカーの発現を免疫染色法で確認したが、群間で差は認めなかった。



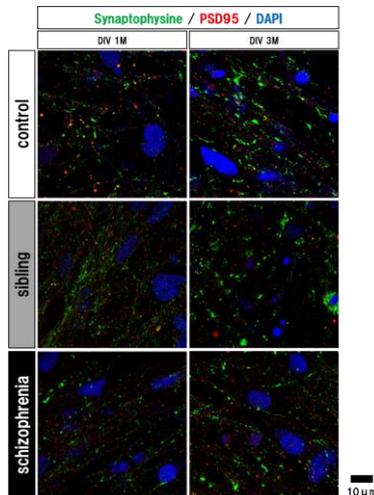
多能性細胞マーカーの免疫染色

(2) iPS 細胞からニューロスフェアへの分化誘導性に差は認めず、ニューロスフェアを接着培養した後の PAX6 陽性/Nestin 陽性細胞の増殖にも差は無かった。接着培養後の細胞は、そのほとんどが vGlut1 陽性で大脳皮質の Layer marker 陽性の細胞であった。

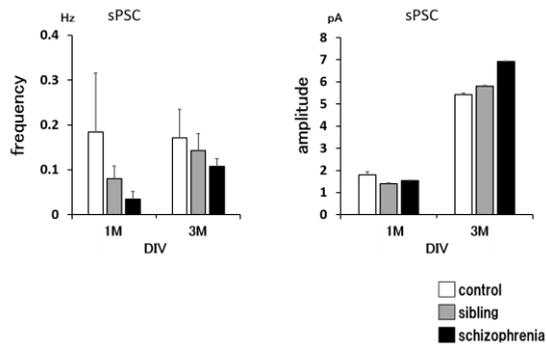


(3) 接着培養後、シナプス前蛋白質である Synapsin I の発現を qRT-PCR 法で継続的に測定したところ、その発現パターンに群間で有意差を認めた (Two-way ANOVA, $F(2, 103)$, $p < 0.05$)。

(4) 接着培養後 1 ヶ月、3 ヶ月の時点でのシナプス蛋白質の発現を免疫染色法で確認したところ、3 ヶ月時点でのシナプス前蛋白質である Synaptophysin の発現量が、健常者と比較して双生児由来神経細胞で低かった。



(5) パッチクランプ法による電気生理学的解析を接着培養後 1 ヶ月、3 ヶ月の時点で行ったところ、細胞の発火数、閾値、振幅などの性質に差は無かった。シナプス機能を反映すると考えられる自発性シナプス後電流 (sPSC) の頻度、振幅についても有意差は認めなかった。



(6) 移植実験については、レンチウイルスベクターによる細胞の標識は可能であるが、NOD/SCID マウス脳内での細胞の生着・分布に課題を残し十分な解析に至れなかった。

今回、我々の培養系で認められた結果は、統合失調症のシナプス仮説を一部支持する結果であった。今後さらにサンプルを加えて解析を進め、統合失調症の病因となりうる差異を同定したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Toritsuka M, Makinodan M, Kishimoto T. Social Experience-Dependent Myelination: An Implication for Psychiatric Disorders. *Neural Plast.* 2015;465345.

2. Yamamuro K, Makinodan M, Kimoto S, Kishimoto N, Morimoto T, Toritsuka M, Matsuoka K, Takebayashi Y, Takata T, Takahashi M, Tanimura Y, Nishihata Y, Matsuda Y, Ota T, Yoshino H, Iida J, Kishimoto T.

Differential patterns of blood oxygenation in the prefrontal cortex between patients with methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia. *Sci Rep.* 2015 Jul 16;5:12107.

3. 牧之段学、鳥塚通弘、岸本年史

経験依存性のミエリン形成：脳 21, 18 巻
1;114-120, 2015

4. 鳥塚通弘

22q11 欠失症候群モデルマウスを用いた統合失調症の病態解析：奈良県医師会医学会年報, 1;82-84, 2015

[学会発表] (計 1 件)

Michihiro Toritsuka, Manabu Makinodan, Hiroki Yoshino, Kaori Hamano-Iwasa, Kazuhiko Yamamuro, Wado Akamatsu, Yohei Okada, Sohei Kimoto, Daisuke Ikawa, Kazumichi Hashimoto, Shin-ichi Fukami, Yasunori Yamashita, Akira Imamura, Koji Nishihara, Hiroki Ozawa, Yuji Okazaki, Hideyuki Okano and Toshifumi Kishimoto
Induced pluripotent stem cells-derived neurons of the patients with discordant schizophrenia

第 58 回日本神経化学会、大宮ソニックシティ、埼玉、2015 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特に無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥塚 通弘 (TORITSUKA MICHIIRO)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20588529