

平成 31 年 5 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04645

研究課題名(和文) iPS細胞由来神経細胞分化の基盤技術開発および患者神経細胞を用いた統合失調症研究

研究課題名(英文) Modeling of psychiatric disorders using iPSC technologies

研究代表者

中澤 敬信 (Nakazawa, Takanobu)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：00447335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の病因や病態は不明な点が多く、治療薬の効果も不十分な現状にあり、新たな病因や病態に立脚した創薬が求められている。本研究では、臨床データを保持する患者由来のiPS神経細胞の解析を行い、統合失調症の病態メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。独自にみいだした統合失調症多発家系患者等のiPS神経幹細胞、神経細胞の解析から、疾患との関連性が示唆される遺伝子発現異常、スプライシング反応異常、あるいはシナプス機能異常といった新たな分子病態を同定した。本研究により、創薬研究や診断や治療効果を反映するバイオマーカーの開発に資する統合失調症の分子病態の一端を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症の病因や病態は不明な点が多く、治療薬の効果も不十分な現状にある。本研究では、直接的に患者由来の神経細胞が解析可能となる患者iPS細胞を介して神経細胞を作製するという、これまでに報告例が少ない新規の系を利用した研究を実施した。その結果、統合失調症と関連することが期待される神経機能の異常(遺伝子発現異常、スプライシング機能異常、及びシナプス機能異常)を同定した。本研究により得られた成果は、疾患の分子病態の同定のみならず、創薬研究、統合失調症の診断や治療に伴う有効性を評価するバイオマーカーの開発、および疾患の細分類系の確立のために極めて有効な基礎データを提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is a common psychiatric disorder that occurs mainly in adolescence, characterized by positive and negative symptoms. Despite a large number of studies, much remains unknown about the molecular etiology of schizophrenia. In this study, we applied iPSC technologies to generate patients' live neuronal cells that enable us to precisely analyze the disease-associated neuronal phenotype. We analyzed the neural function of iPSC-neurons derived from patients from a family with multiple occurrence of schizophrenia and other patients. In these neurons, we found that the impaired gene expression, splicing events and synaptic functions, all of which may be associated with schizophrenia. These results imply that iPSC-derived neurons of patients with schizophrenia provide important insights into the development of new treatment strategies and biomarkers for diagnosis and treatment efficacy.

研究分野：分子神経科学

キーワード：iPS細胞 統合失調症 患者神経細胞 分子病態 神経細胞分化 RNA発現解析 スプライシング反応 電気生理学解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、国内では医療費や非就業のコストが約2.8兆円と大きな社会負担になっているが、その発症機序はいまだ不明である。その主要な原因の一つとして、これまでの分子レベルの研究では、死後脳、患者血液由来細胞、もしくはモデル動物などが用いられてきており、いずれも患者の活動する脳細胞を直接的に解析していない点が考えられている。また、既存のゲノムワイドの方法では、患者に共通した疾患関連遺伝子を同定することができなかった。従って、新たな手法による分子レベルの疾患研究が求められている。近年、直接的に患者由来の神経細胞が解析可能となる患者由来 iPS 細胞を介して神経細胞を作製する系を利用した研究が期待されているが、現在までのところ、iPS 細胞技術を使用した遺伝的解析を実施した特定の統合失調症患者の研究報告は、少数にとどまっている。

2. 研究の目的

本研究では、治療履歴、認知機能検査データ、脳画像データ、および遺伝子解析データをすでに解析済みの患者の脳を対象とした分子レベルの研究を実施する。具体的には、患者由来の iPS 細胞を介した疾患神経細胞の解析を行い、統合失調症における脳機能異常や病態のメカニズムを分子レベルで明らかにする。また、解析に必要な iPS 細胞を成熟した神経細胞に分化させる基盤技術開発も併せて実施する。本研究から、疾患の分子病態のみならず、創薬研究のための基礎データや、統合失調症の診断や治療に伴う有効性を評価するバイオマーカーの開発、および疾患の細分類系の確立をめざす。

3. 研究の方法

本研究では、独自に収集してきた患者サンプルを解析し、統合失調症の病態を分子レベルで明らかにすることを目的として、統合失調症多発家系に属する患者等のサンプルを用いて、以下の実験を行う。①疾患神経細胞の発達や機能の異常を解析し（ゲノム動態解析、遺伝子発現解析、プロテオーム解析、シナプス機能を調べる電気生理学的解析）、同定済みの変異の生物学的意義を明らかにする。②統合失調症が多因子疾患であることを考慮し、明らかになった分子機構の異常を個々にではなく、複数個単位で相関解析を行う。③得られた結果とその結果と関連する患者の臨床データとを関連づけ、統合失調症の診断や治療の有効性を評価するため、および疾患細分化の分子マーカーを同定する。

4. 研究成果

(1) 標準的な方法によって、臨床情報が保持されている統合失調症患者4名から iPS 細胞を新たに樹立した。また、患者由来のリンパ芽球を直接的に神経細胞に分化させることを目的として、種々の神経系特異的転写因子群、エピゲノム関連薬剤等を用いた分化法の開発を試み、リンパ芽球を直接的に神経細胞に分化させることができたが、効率が悪く、分化法のさらなる改良が必要であることが明らかになった。

(2) 統合失調症の多発家系および健常者の iPS 細胞から神経幹細胞および神経細胞を分化させた。神経幹細胞および神経細胞の RNA 発現解析を実施したところ、発達関連遺伝子群、MHC 遺伝子、細胞接着因子群、液性の分泌因子等の発現に健常者と患者で相違があることが明らかになった。

(3) 統合失調症患者に独自に見いだしている変異をもつ遺伝子群の神経細胞の発達過程における機能解析を *in utero* エレクトロポレーション法により実施したところ、SHZ2、SHZ4 遺伝子について、神経細胞の発達に関与していることを示唆する結果を得た。

(4) 統合失調症の多発家系患者において、神経伝達物質受容体のスプライシングに異常があ

ることが明らかになった。また、そのスプライシングに関与することが示唆されるスプライシング因子に患者特異的なアミノ酸変異があることが明らかになった。当該受容体のエクソン 6～エクソン 8 番目に相当するミニジーンを作製し、変異が同定されたスプライシング因子の機能を調べたところ、当該スプライシング因子の異常により、患者で同定されたスプライシング異常が引き起こされている可能性が示唆された。また、この現象は用いる細胞株によって違うことが示唆されたことから、HEK293T 細胞のみならず、SHSY5Y 細胞等、様々な細胞株を用いて解析を実施した。

(5) 電気生理学実験により、統合失調症の多発家系患者の iPS 神経細胞では、miniature EPSC の振幅や頻度が亢進する等といった、シナプス機能に異常があることが明らかになった。また、成熟した iPS 神経細胞の RNA 発現解析を実施し、シナプス機能を調節している PSD 分子群の動態異常が見いだされた。

本研究から、細胞接着因子群の動態異常、神経伝達物質受容体のスプライシング異常、シナプス機能の異常上昇等を疾患の分子病態として同定することができた。これらの成果は、創薬研究、統合失調症の診断や治療の有効性を評価するバイオマーカーの開発、および疾患の細分類系の確立のための基礎データを提供するものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Seiriki K, Kasai A, Nakazawa T, Niu M, Naka Y, Tanuma M, Igarashi H, Yamaura K, Hayata-Takano A, Ago Y, Hashimoto H. Optimized FAST for whole-brain imaging at subcellular resolution. *Nat. Protoc.* 14:1509-1529 (2019). DOI: 10.1038/s41596-019-0148-4. 査読有
2. Kawase H, Ago Y, Naito M, Higuchi M, Hara Y, Hasebe S, Tsukada S, Kasai A, Nakazawa T, Mishina T, Kouji H, Takuma K, Hashimoto H. ms-11, a mimetic of the msin3-binding helix in NR5F, ameliorates social interaction deficits in a prenatal valproic acid-induced autism mouse model. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 176:1-5 (2019). DOI: 10.1016/j.pbb.2018.11.003. 査読有
3. Shintani Y, Hayata-Takano A, Moriguchi K, Nakazawa T, Ago Y, Kasai A, Seiriki K, Shintani N, Hashimoto H. β -arrestin1 and 2 differentially regulate PACAP-induced PAC1 receptor signaling and trafficking. *PLoS ONE* 13:e0196946 (2018). DOI: 10.1371/journal.pone.0196946. 査読有
4. Inoue N, Ogura S, Kasai A, Nakazawa T, Ikeda K, Higashi S, Isotani A, Baba K, Mochizuki H, Fujimura H, Ago Y, Hayata-Takano A, Seiriki K, Shintani Y, Shintani N, Hashimoto H. Knockdown of the mitochondria-localized protein p13 protects against experimental parkinsonism. *EMBO Rep.* 19:e44860 (2018). DOI: 10.15252/embr.201744860. 査読有
5. Inoue N, Hirouchi T, Kasai A, Higashi S, Hiraki N, Tanaka S, Nakazawa T, Nunomura K, Lin B, Omori A, Hayata-Takano A, Kim Y, Doi T, Baba A, Hashimoto H, Shintani N. Unbiased compound screening with a reporter gene assay highlights the role of p13 in the cardiac cellular stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495:1992-1997 (2018). DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.116. 査読有
6. Hara Y, Ago Y, Higuchi M, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Oxytocin attenuates deficits in social interaction but not recognition memory in a prenatal valproic acid-induced mouse model of autism. *Horm. Behav.* 96:130-136 (2017). DOI: 10.1016/j.yhbeh.2017.09.013. 査読有
7. Hara Y, Ago Y, Taruta A, Hasebe S, Kawase H, Tanabe W, Tsukada S, Nakazawa T, Hashimoto

- H, Matsuda T, Takuma K. Risperidone and aripiprazole alleviate prenatal valproic acid-induced abnormalities in behaviors and dendritic spine density in mice. *Psychopharmacol.* 234:3217-3228 (2017). DOI: 10.1007/s00213-017-4703-9. 査読有
8. Hara Y, Ago Y, Takano E, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Prenatal exposure to valproic acid increases miR-132 levels in the mouse embryonic brain. *Mol. Autism* 8:33 (2017). DOI: 10.1186/s13229-017-0149-5. 査読有
 9. Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, Akamatsu W, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophr. Res.* 181:75-82 (2017). DOI: 10.1016/j.schres.2016.10.012. 査読有
 10. Seiriki K, Kasai A, Hashimoto T, Schulze W, Niu M, Yamaguchi S, Nakazawa T, Inoue K, Uezono S, Takada M, Naka Y, Igarashi H, Tanuma M, Waschek JA, Ago Y, Tanaka KF, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Shintani N, Hashimoto R, Kunii Y, Hino M, Matsumoto J, Yabe H, Nagai T, Fujita K, Matsuda T, Takuma K, Baba A, Hashimoto H. High-speed and scalable whole-brain imaging in rodents and primates. *Neuron* 94:1085-1100 (2017). DOI: 10.1016/j.neuron.2017.05.017. 査読有
 11. Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Watanabe S, Umehara H, Shimodera S, Nakazawa T, Kikuchi M, Nakaya A, Hashimoto H, Imoto I, Hashimoto R, Ohmori T. Effect of clozapine on DNA methylation in peripheral leukocytes from patients with treatment-resistant schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci.* 18(3).pii:E632 (2017). DOI: 10.3390/ijms18030632. 査読有
 12. Yamaguchi H, Hara Y, Ago Y, Takano E, Hasebe S, Nakazawa T, Hashimoto H, Matsuda T, Takuma K. Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behav. Brain Res.* 333:67-73 (2017). DOI: 10.1016/j.bbr.2017.06.035. 査読有
 13. Kasai A, Kakihara S, Miura H, Okada R, Hayata-Takano A, Hazama K, Niu M, Shintani N, Nakazawa T, Hashimoto H. Double in situ hybridization for microRNAs and mRNAs in brain tissues. *Frontiers Mol. Neurosci.* 9:126 (2016). DOI: 10.3389/fnmol.2016.00126. 査読有
 14. Seiriki K, Kasai A, Kuwaki T, Nakazawa T, Yamaguchi S, Hashimoto H. Critical involvement of the orbitofrontal cortex in hyperlocomotion induced by NMDA receptor blockade in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 480:558-563 (2016). DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.089. 査読有
 15. Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S. Involvement of brain-enriched guanylate kinase-associated protein (BEGAIN) in chronic pain after peripheral nerve injury. *eNeuro* 3:e0110-16 (2016). DOI: 10.1523/ENEURO.0110-16.2016. 査読有
 16. Onaka Y, Shintani N, Nakazawa T, Kanoh T, Ago Y, Matsuda T, Hashimoto R, Ohi K, Hirai H, Nagata K, Nakamura M, Kasai A, Hayata-Takano A, Nagayasu K, Takuma K, Ogawa A, Baba A, Hashimoto H. Prostaglandin D₂ signaling mediated by the CRTH2 receptor is involved in MK-801-induced cognitive dysfunction. *Behav. Brain Res.* 314:77-86 (2016). DOI: 10.1016/j.bbr.2016.07.050. 査読有
 17. Matsumura K, Nakazawa T, Nagayasu K, Gotoda-Nishimura N, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Yamamori H, Yasuda Y, Hashimoto R, Hashimoto H. *De novo* POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of POGZ. *J. Mol. Psychiatry* 4:1 (2016). DOI: 10.1186/s40303-016-0016-x. 査読有

18. Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y, Tanimura A, Hashimotodani Y, Ohi K, Yamamori H, Yasuda Y, Umeda-Yano S, Kiyama Y, Konno K, Inoue T, Yokoyama K, Inoue T, Numata S, Ohnuma T, Iwata N, Ozaki N, Hashimoto H, Watanabe M, Manabe T, Yamamoto T, Takeda M, Kano M. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *Nat. Commun.* 7:10594 (2016). DOI: 10.1038/ncomms10594. 査読有
19. Hashimoto R, Nakazawa T, Tsurusaki Y, Yasuda Y, Nagayasu K, Matsumura K, Kawasaki 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.* 61:199-206 (2016). DOI: 10.1038/jhg.2015.141. 査読有

〔学会発表〕 (計 58 件)

1. 中澤敬信、橋本亮太、田熊一徹、橋本均、iPS 細胞関連技術とヒト型疾患モデルマウスを用いた精神疾患の分子病態解析、第 28 回日本臨床精神神経薬理学会 第 48 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2018 年
2. 中澤敬信、橋本亮太、田熊一徹、橋本均、iPS 細胞関連技術を用いた統合失調症の分子病態解析および神経細胞分化の基盤技術開発、日本薬学会 第 138 回年会、2018 年
3. 中澤敬信、田熊一徹、橋本亮太、橋本均、自閉スペクトラム症に高頻度に認める POGZ 遺伝子座の患者特異的 de novo 変異の表現型解析、第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会 合同年会、2017 年
4. 中澤敬信、橋本亮太、橋本均、iPS 細胞関連技術を用いた統合失調症患者のクロザピン応答性の個人間の相違の分子機構解析、第 46 回 日本神経精神薬理学会年会、2016 年
5. Nakazawa T, Matsumura K, Nagayasu K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Takuma K, Yamamori H, Yasuda Y, Hashimoto R, Hashimoto H, ASD-associated *de novo* mutations in *POGZ* impair the DNA-binding activity of POGZ. 55th Annual Meeting, ACNP, 2016 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院歯学研究科薬理学教室
<https://web.dent.osaka-u.ac.jp/pharm/>
大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野
<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：橋本 均

ローマ字氏名：Hashimoto Hitoshi

研究協力者氏名：橋本 亮太

ローマ字氏名：Hashimoto Ryota

研究協力者氏名：栗生 俊彦

ローマ字氏名：Kuriu Toshihiko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。