

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461724

研究課題名(和文)統合失調症の社会機能回復 - 細胞とオキシトシンを用いた“共感性/気遣い”の脳解析

研究課題名(英文) Social function recovery in schizophrenia: brain mechanism of empathy/concerning function using stem cells and oxytocin

研究代表者

鶴飼 渉 (Ukai, Wataru)

札幌医科大学・医療人育成センター・准教授

研究者番号：40381256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：はじめに、幹細胞を投与したモデル動物の社会性機能行動と、投与細胞の脳内分布の解析を進め、患者由来細胞では、移植後に脳内でGAD67/Parvalbumin陽性のGABA系 interneuronになりにくいこと、また、患者由来細胞を移植した群では、コントロール、および健康者由来細胞を移植した群に比べ社会性行動が減少することを観察した。次に、GABA系インターニューロンのシナプス形成能について、前駆構造体フィロポディアのアクチン運動を指標とした解析を進め、患者由来細胞における、フィロポディア運動の低下と、それに対する転写因子TBX1の発現低下の影響の可能性を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：First, we analyzed the social functioning behavior of model animals administered with stem cells and the distribution of cells in the brain. We detected that the patient-derived stem cells was difficult to become GAD67 and Parvalbumin-positive GABA interneurons in the brain after administration, and social interaction behavior was decreased in the patient-derived stem cell administered group compared to the control and healthy-derived stem cell administered group. Next, the synapse forming ability of the GABAergic interneuron was analyzed by the actin motility of the precursor structure filopodia, and found the reduction of the filopodia movement in the patient-derived cells. We also found that the possibility of the influence of decreased expression of the transcription factor TBX1 against it.

研究分野：精神科学

キーワード：統合失調症 オキシトシン 細胞治療 再生医療 社会性機能 GABA系インターニューロン 共感・気遣い

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症では、幻覚・妄想などの陽性症状の問題に加え、対人コミュニケーション能をはじめ、種々の社会的な認知機能の障害があり、これが、患者の職業的・社会的復帰の深刻な妨げになっていることが指摘されている。社会相互性・言語コミュニケーションの障害は自閉症領域でも指摘される重大な脳機能の障害であるが、これらの社会性機能の脳病態は複雑で、直接的に有効な治療法は未だ存在しない。

これまでに我々は、精神疾患の認知・行動異常を改善させる脳内メカニズムとして、神経回路網の修復・再生促進効果の重要性の観点から研究を進め、外来から移植した種々の幹細胞が、脳の神経回路に（一部は GABAergic neuron として）組み込まれ、シナプス密度を増加させること、また、種々の精神疾患モデル動物の認知・行動異常を改善させる効果を有することを示してきた。

そこで、統合失調症治療の上で重要な課題である、職業的・社会的機能回復の問題について、聴くこと・語ることの訓練を介して生じる脳機能変化（言語・聴覚関連脳領域の修復・再生～他者への共感・気遣いの機能の増強）を明らかとし、その効果をより高める新たな治療手段としての、薬物・幹細胞併用療法の有用性の検討、開発を進めることとした。

## 2. 研究の目的

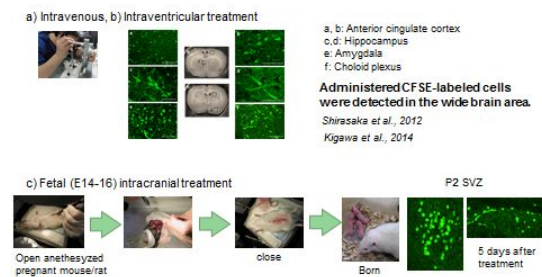
精神疾患研究の難しさの1つには、ヒトの病態を的確に反映した病態モデルの作製が困難であることがあげられる。例えば統合失調症においては、これまでに、DISC1 やリーリン、カルモジュリンなど、原因候補遺伝子の改変マウスが作製され、それらの動物ではある程度ヒトの病態に類似した行動変異フェノタイプが確認されているが、多くの精神疾患が複数の遺伝子異常の組み合わせで成り立っているとの、近年の大規模遺伝子解析研究の結果は、単一遺伝子の改変動物を用いるだけでは、より高い精度でヒト精神疾患の病態解明研究を進めていくことに限界があることを示唆している。そこで、例えば、ヒト精神疾患患者から作製した iPS 細胞をマウスに移植することによって、新たな精神疾患病態モデル動物を作製しようとする試みが進められている。今回、我々は、ヒト患者体細胞より作成した iPS 細胞から、神経系の細胞に分化を進めた neurosphere を得て、これをマウス/ラットの脳室および静脈内に投与する方法で投与し、移植した動物の脳神経回路変異や行動異常を解析した。この方法では、投与を行う動物の週齢を調整することで、発達段階依存的な神経回路網の変異とその修復・再生法について探索を進めることも可能である。また、同時に、iPS-neurosphere を用いた in vitro 解析を実施し、患者由来の神経系細胞の脆弱性、発達異常につながる細胞病態の発見を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) in vivo での検討

種々の由来の幹細胞の投与が、モデル動物の脳内にどのような形で生着し、神経回路修復に影響を及ぼすかを検討する為、投与細胞の標識法の改良を図り、CFSE 色素標識法に加え、GFP 遺伝子導入の検討を進め、胎児脳由来神経幹細胞、および iPS 細胞で、それぞれ明瞭な標識結果を得、複数の投与方法（脳室内投与、静脈内投与、胎仔頭蓋内投与）において、投与1週～1か月後の脳内での生存・生着を得た。また、幹細胞を投与した健常、および精神疾患モデル動物の社会性機能行動と、投与細胞の脳内分布の解析を進めた（図1）。

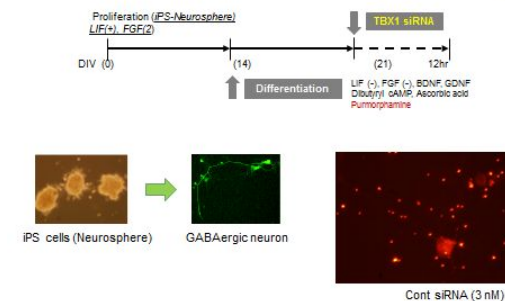
図 1. 実験方法 in vivo



### (2) in vitro での検討

成体での脳内新生も考えられている GABA 系インターニューロンのシナプス形成能について、前駆構造体フィロポディアのアクチン運動を指標とした解析を進めた。具体的には、健常者および統合失調症を合併した 22q11.2 欠失症候群患者由来の iPS 細胞から、それを Neurosphere に分化させた細胞を用いて、神経分化誘導を行った際の神経突起上のフィロポディアの動きに注目し、タイムラプスイメージングを用いた運動変化の比較解析、および変異メカニズムの一端の解明を試みた（図2）。

図 2. 実験方法 in vitro



#### 4. 研究成果

##### (1) 脳室内投与

健常者、および患者（統合失調症の症状を有する 22q11.2 症候群）由来 iPS-neurosphere を用いて、蛍光色素で標識後に、マウス、およびラットの脳室内への投与を進めた。投与1~3か月後、健常者由来、患者由来のいずれの移植細胞も脳内での存在が観察され、帯状回、海馬領域に比較的多く認められた。投与された健常者由来 iPS-neurosphere は、脳内で GAD67, Parvalbumin, および Somatostatin 陽性の GABAergic interneuron へ高率に分化している可能性が伺われた（図3）。一方、患者由来 iPS-neurosphere については、Somatostatin 陽性の細胞への分化は同様に認められるものの、GAD67, および Parvalbumin 陽性細胞への分化は減少している可能性が観察された。しかしながら、このままの方法では、移植細胞の生存率は悪く、また、生存率の定量化もこのままでは困難であり、移植細胞の分化動態や、シナプス形成変異についての解析は難しく、課題として残される結果となった（図4）。

図3. 幹細胞の脳内動態(脳室内投与)

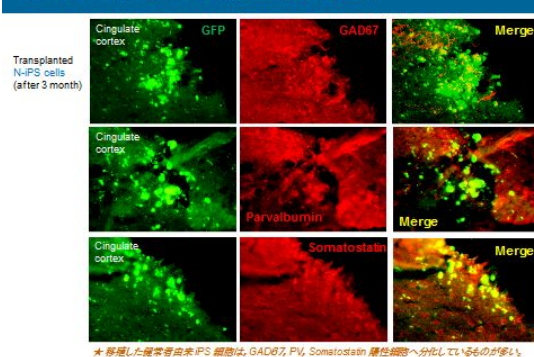
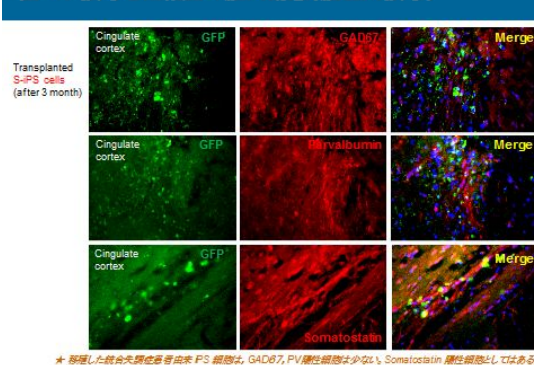


図4. 投与した細胞の脳内動態(脳室内投与)



##### (2) 胎仔頭蓋内投与

より多くの移植細胞が生存していくことが期待される投与方法として、胎仔頭蓋内投与方法の検討を進めた。この方法では、胎生期（E14）ラット脳の頭蓋内に、色素標識した iPS-neurosphere を投与し、脳室内投与の場合よりも、多くの移植細胞の生存が得られ、1~3ヶ月齢の前脳部 Medial preoptic

nucleus 領域では、ニューロンとして生存も認めている（図5）。胎仔頭蓋内投与は、生存・分化後の（シナプス）細胞機能を追跡する上で期待がもたれたが、この方法では、なぜか健常者由来の iPS-neurosphere を投与した胎仔の出生のみが正常に起こらず、健常者、および患者由来細胞を移植したラットを同時に得て比較解析することができていない。これはこれで、非常に興味深い知見ではあるが、当初の研究計画を進めていく方法としては、まだ検討の追加が必要である。また、細胞内に残るタイプの色素による（蛍光）標識法では、移植細胞の生存の定量・追跡に難しさがあった。そこで、Electroporation 等を用いた移植細胞の GFP 標識を試み、改善が得られた。

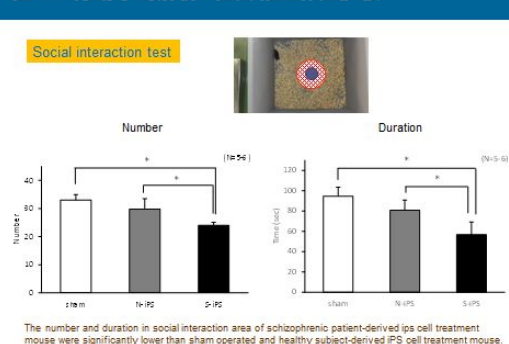
図5. 幹細胞の脳内動態(胎仔頭蓋内投与)



##### (3) 行動学的解析

幹細胞の移植が脳機能と個体の行動に及ぼす影響について解析を進めた。現在、まだ例数は少ないものの、患者由来の iPS-neurosphere を投与(脳室内)した群では、コントロール群、ならびに健常者由来の iPS-neurosphere を投与した群の両群に対して、social interaction 行動が減弱するとの知見を得た（図6）。現在、移植細胞の機能解析をより綿密に進められる方法で投与した際の行動変化解析を実施していくとともに、統合失調症モデル動物に投与した際の影響について追加解析を行っている。また、細胞投与が脳機能変化に及ぼす影響を解析する手段の一つとして、行動中の脳波解析について、準備実験を進めているところである。

図6. 行動学的解析: 社会相互作用試験

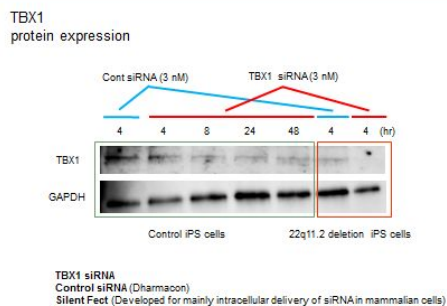




#### (4) TBX1 遺伝子ノックダウン

近年、統合失調症の遺伝学的研究において、ゲノム変異がシナプス関連遺伝子群に集積しているとの知見が多くみられるが、シナプスの機能障害がなぜ実行機能や認知機能障害を含む統合失調症の脳機能異常につながるのかについて、その生物学的メカニズムはいまだ不明な点が多い。そこで、我々は、健常者および統合失調症を合併した 22q11.2 欠失症候群患者由来の iPS 細胞 (iPSCs) から、それを Neurosphere に分化させた細胞を用いて、神経分化誘導を行った際の神経突起上のフィロポディア (スパイン前駆構造体) の動きに注目し、タイムラプスイメージングを用いた運動変化の比較解析を試みた。22q11.2 領域に含まれる遺伝子にコードされ、自閉症関連遺伝子産物としての可能性が明らかとなった、転写因子 TBX1 遺伝子サイレンシングによって、TBX1 タンパク発現の低下が認められた(図7)。

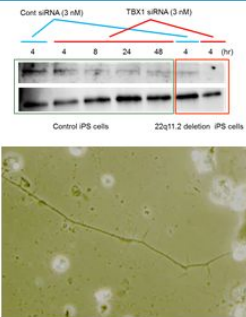
図 7. iPS細胞におけるTBX1遺伝子ノックダウン



#### (5) TBX1 発現異常とフィロポディア運動

iPS 細胞から作製した iPS-Neurosphere を FGF(-), LIF(-)の分化条件下で培養し、ニューロンへ分化させた。分化ニューロンの突起先端から少し後ろの部分において、突起からのフィロポディアの運動(伸展と収縮)を記録した結果、患者由来 iPS 細胞では、フィロポディア運動(数・頻度・大きさ)が、健常者由来 iPS 細胞に比べ減弱していることを認めた。次に、フィロポディア運動変異の分子メカニズムを明らかにする目的で、22q11.2 領域に含まれる遺伝子にコードされ、自閉症関連遺伝子産物としての可能性が明らかとなった、転写因子 TBX1 の発現変化との関連について解析を進めた。その結果、遺伝子サイレンシングによって、TBX1 タンパク発現を低下させることで、健常者 iPSCs 由来ニューロンでフィロポディア運動が減弱することが判明した(図8)。転写因子 TBX1 の変化が、どのようにして、ニューロンのフィロポディア運動の変異につながるのかについては、まだ知見は得られていない。今後、TBX1 発現変化と、パルプアルブミンを含め、フィロポディア運動を支えるアクチン分子の機能に影響を及ぼす分子群の関係を中心に、探索を進めていきたいと考えている。

図 8. TBX1 遺伝子ノックダウンがフィロポディア運動に及ぼす影響



Time-laps video analysis of filopodia dynamics on iPS cell-derived neuron (Control).

#### (考察・今後)

本研究では、聴くこと・語ることの訓練を介して生じる脳機能変化(言語・聴覚関連脳領域の修復・再生~他者への共感・気遣いの機能の増強)を明らかとし、その効果をより高める新たな治療手段としての、薬物・幹細胞併用療法の有用性を検討、開発を進めることを目指した。現在、認知機能への影響が推察されている薬物投与による脳諸領域と血中の関連因子の変動解析を進めるとともに、幹細胞投与による改善効果を報告した、子育て行動との関連で、ヒト子育て行動(プログラム)前後での、オキシトシン濃度変動の解析を進めている。頭書の目標達成に向けて足りていない部分の検討・評価を急ぎたいと思っている。

#### 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 10 件)

- 1) Kaneta H, Ukai W, Tsujino H, Furuse K, Kigawa Y, Tayama M, Ishii T, Hashimoto E, Kawanishi C. Antipsychotics promote GABAergic interneuron genesis in the adult rat brain: Role of heat-shock protein production. J Psychiatr Res. 2017; 92, 108-118 (有)
- 2) Hasegawa T, Ukai W. Targeting therapy for homocysteic acid in the blood represents a potential recovery treatment for cognition in Alzheimer's disease patients. Aging 2016; 8: 1838-1843 (有)
- 3) Kobayashi S, Ishii T, Tateno M, Sohma H, Kokai Y, Ito YM, Iwamoto T, Furuse K, Tsujino H, Morii H, Ukai W, Hashimoto E, Utsumi K, Kawanishi C. The effect of APOE 4 allele on brain perfusion SPECT in late onset Alzheimer's disease by an automated program, 3DSRT. Neuropsychiatry 2016; 6: 55-63 (有)
- 4) Kobayashi S, Makino K, Hatakeyama S,

- Ishii T, Tateno M, Iwamoto T, Tsujino H, Kawasaki K, Mikuni K, Ukai W, Murayama T, Hashimoto E, Utsumi K, Kawanishi C. The usefulness of combined brain perfusion single-photon emission computed tomography, DAT AQ4 -single-photon emission computed tomography, and 123I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy for the diagnosis of dementia with Lewy bodies. *Psychogeriatrics* 2016 [Epub ahead of print] (有)
- 5) 鶴飼 渉, 辻野華子, 古瀬研吾, 木川昌康. アルコール性臓器障害 - アルコールと脳神経疾患. *細胞* 2015; 47: 693-696 (無)
  - 6) 鶴飼 渉, 木川昌康, 石井豊男, 古瀬研吾, 辻野華子, 岩本倫, 田山真矢, 白石将毅, 橋本恵理, 河西千秋, 齋藤利和. 胎児期アルコール曝露と成長後のストレスを組み合わせた難治性うつ病モデルにおける神経幹細胞移植療法の有効性. *アルコールと医学生物学* 2015; 33: 39-44 (無)
  - 7) Kigawa Y, Hashimoto E, Ukai W, Ishii T, Furuse K, Tsujino H, Shirasaka T, Saito T. Stem cell therapy: a new approach to the treatment of refractory depression. *J Neural Transm* 2014; 121: 1221-1232 (有)
  - 8) Ishii T, Hashimoto E, Ukai W, Kakutani Y, Sasaki R, Saito T. Characteristics of attempted suicide by patients with schizophrenia compared with those with mood disorders: a case-controlled study in northern Japan. *PLoS One* 2014; 9: e96272 (有)
  - 9) Sauvanaud F, Lamy S, Hashimoto E, Riederer PF, Hesselbrock VM, Hesselbrock MN, Mann K, Ukai W, Sohma H, Schuckit MA, Saito T, Thibaut F. Marqueurs biologiques de l'alcoolisme. Consensus émis par le groupe de travail "Marqueurs biologiques" de la World Federation of Societies of Biological Psychiatry. *Alcoolologie et Addictologie* 2014; 36: 207-224 (有)
  - 10) 鶴飼 渉. アルコール性脳障害とうつ病に対するトランスレーショナルリサーチの展望 - 病態解明と診断の観点から -. *日本生物学的精神医学会誌* 2014; 25: 24-26 (無)
- 〔学会発表〕(計7件)
- 1) Watanabe R, Nishioka M, Bundo M, Sawai Y, Ueda J, Murata Y, Ishii T, Ukai W, Hashimoto E, Kasai K, Shimizu S, Kato T, Iwamoto K. Epigenetic status of LINE-1 promoters in neurons and non-neurons. In: 30th Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP): 2016 July 3-5: Seoul, Korea.
  - 2) Furuse K, Hanako T, Kigawa Y, Tayama M, Ukai W, Ishii T, Iwamoto T, Shiraishi M, Kobayashi S, Hashimoto E, Kawanishi C. Pathological analysis of refractory depression using fetal alcohol and adolescent corticosterone double stress model. In: 30th Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP): 2016 July 3-5: Seoul, Korea
  - 3) 鶴飼 渉. 統合失調症のシナプス形成異常: iPS 細胞由来ニューロンを用いたファイロポディア運動の解析. (シンポジウム) 第46回日本神経精神薬理学会, July 2, 2016, Seoul, Korea
  - 4) Watanabe R, Nishioka M, Bundo M, Sawai Y, Ueda J, Murata Y, Ishii T, Ukai W, Hashimoto E, Kasai K, Shimizu S, Kato T, Iwamoto K. The status of cytosine modification on the LINE-1 promoter regions in neurons and non-neurons. In: International Symposium for RIKEN Epigenetics Program 2016 Feb 15-16: Wako, Japan
  - 5) Ukai W, Furuse K, Kigawa Y, Tsujino H, Ishii T, Tayama M, Iwamoto T, Shiraishi M, Kobayashi S, Hashimoto E, Kawanishi C. Amelioration of treatment-refractory depression with intravenous stem cells. In: The International College of Neuropsychopharmacology (CINP), June 4-6, 2015, Dublin, Ireland
  - 6) Ukai W, Furuse K, Kigawa Y, Tsujino H, Ishii T, Tayama M, Iwamoto T, Shiraishi M, Inoue K, Kobayashi S, Hashimoto E, Saito T, Kawanishi C. Stem cell therapy: a regenerative approach for refractory psychiatric disease. [Symposium] Alcohol and Disease: Mechanism and Control In: Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB): 2015 May 12-14: Seoul, Korea
  - 7) Ukai W, Kigawa Y, Hashimoto E, Ishii T, Furuse K, Tsujino H, Saito T. Stem cell therapy as a candidate treatment approach for neural plasticity change in alcohol-induced brain damage and depression. [Symposium] Stem cells and related epigenetic factors in alcoholism In: Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum (CINP): 2014 Jun 21-26: Vancouver, Canada
- 〔図書〕(計1件)
- 1) 鶴飼 渉. 未来の細胞療法. 新しい診断と

治療の ABC - 精神 9 アルコール依存症 .  
齋藤利和編 . 大阪 : 最新医学社 ; 2014 ,  
177-187

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鵜飼 渉 (Ukai Wataru)

札幌医科大学・医療人育成センター・准教授

研究者番号 : 40381256

### (2)研究分担者

橋本 恵理 (Hashimoto Eri)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 30301401

石井 貴男 (Ishii Takao)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 40404701

木川 昌康 (Kigawa Yoshiyasu)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 50581146

相馬仁 (Sohma Hitoshi)

札幌医科大学・医療人育成センター・教授

研究者番号 : 70226702

### (3)連携研究者

岩本 和也 (Iwamoto Kazuya)

熊本大学・医学部・教授

研究者番号 : 40342753

森元 隆文 (Morimoto Takafumi)

札幌医科大学・保健医療学部・講師

研究者番号 : 60516730

### (4)研究協力者

( )