

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2018～2022

課題番号：18H05416

研究課題名（和文）組織全細胞イメージング法を用いた精神疾患発症起点となるシンギュラリティ細胞の探索

研究課題名（英文）Identification and characterization of brain disorder-related singularity cells by whole-brain imaging

研究代表者

橋本 均（Hashimoto, Hitoshi）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：30240849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 99,200,000 円

研究成果の概要（和文）：特定の少数の脳細胞群の活動が爆発的に広い脳領域に拡散し、大規模な脳細胞の活動が変化することにより生じる精神疾患等の脳疾患のシンギュラリティ現象を明らかにすることを目指した。膨大な数の脳細胞を包括的に観察・解析する方法論や複数神経細胞種の神経活動レポーターマウス、iPS細胞関連の基盤技術を開発した。また、精神的ストレスや自閉スペクトラム症のモデルマウスの脳内にある、ごく少数の神経細胞の活動異常が行動レベルの表出に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、創薬の標的としての脳疾患におけるシンギュラリティ現象の同定が可能になったことである。精神疾患分野では、新規分子病態を標的とする創薬が難航しており、既存薬の治療効果も限定的である。本研究の実施により創薬につながる新しい分子病態情報を得ることができ、急務である中枢神経系創薬の推進に貢献することが期待される点で、本研究は社会的要求が著しく高いといえる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the singularity phenomenon in brain disorders, such as mental illnesses, which occur when the activity of a specific subset of brain cells explosively spreads to a wide brain region, leading to widespread changes in neuronal activity. We developed methodologies to comprehensively observe and analyze a vast number of brain cells, as well as neuronal activation reporter systems and foundational technologies related to induced pluripotent stem cells. Furthermore, we revealed the significance of abnormal activity in an exceedingly small number of neurons within the brains in stress-exposed mice and a mouse model of autism spectrum disorder, as it relates to the expression of behavioral abnormalities.

研究分野：神経薬理学

キーワード：シンギュラリティ細胞 自閉スペクトラム症 ストレス

1. 研究開始当初の背景

脳は膨大な数の細胞により構成されている巨大なシステムである。特定の少数の脳細胞群の活動が爆発的に広い脳領域に拡散し、大規模な脳細胞の活動が変化することにより、脳機能が制御・発現される。精神疾患等の脳疾患は、脳の少数の細胞群の活動異常の蓄積に環境要因等が加わるという、シンギュラリティ現象の破綻により引き起こされるが、少数の脳細胞群の機能異常がどのように起点となり、脳の広い領域に影響をあたえ、個体の精神・行動パターンを変化させるのか？また、計測・解析スケールをどれだけ大規模化すればいいのか？このような本質的な疑問を解決し、脳の動作原理を理解するためには、個々の神経細胞の機能と同時に広範な脳領域の神経細胞の機能連関を時空間的にかつ詳細に計測・解析する必要があるが、既存の研究手法では両立可能な空間と時間の分解能が限られており、脳疾患の時空間的な分子基盤の解析は未開拓である。

我々は最近、FAST を開発し、神経活動レポーターマウスを用いた活動イメージングにおいて、全ての脳領域の神経活動を一細胞レベルで解析することに成功している。また、妥当性の高い独自の疾患モデルマウスを用いて、脳全体で約1 億5 千万個の細胞のうち、大脳皮質の小さい脳領域の500個程度のごく少数の神経細胞の異常が精神活動に変容をもたらし、それらの細胞の活動を操作することにより、精神活動が回復することや臨床サンプルから同定したヒト精神疾患の原因となる一塩基変異により、脳内の約0.001%の神経細胞の活動が特異的に活性化するという新しいシンギュラリティ現象を見いだしている。

2. 研究の目的

本研究では、精神疾患等の脳疾患に関与するシンギュラリティ細胞の特性を決める分子基盤はなにか？精神疾患等の脳疾患に関与するシンギュラリティ細胞の活動異常が広範な脳領域に広がる分子基盤はなにか？精神疾患等の脳疾患に関与するシンギュラリティ細胞の時空間的な活動操作により個体の精神・行動パターンを操作可能か？シンギュラリティ細胞の発生や発達のメカニズムおよび脳疾患の発症の起点はなにか？シンギュラリティ現象により制御される脳の動作原理の重要性はなにか？などの生物学的問いに答えるために、シンギュラリティ細胞の詳細な特性を明らかにするとともに、シンギュラリティ細胞を時空間的に操作し、シンギュラリティ現象の個体レベルの重要性を明らかにする。この際、新規神経活動レポーターマウスや膨大な数の神経細胞情報を処理するビッグデータ解析技術等の開発とともに、妥当性の高い疾患モデルマウスや最新のiPS 細胞関連技術を駆使した研究を実施する。

3. 研究の方法

疾患モデルマウスとして、社会的敗北ストレス負荷マウスおよび、自閉スペクトラム症患者から同定した POGZ de novo 点変異を導入したマウスを用いた。これらの疾患モデルマウスにおいて神経細胞の活性化を標識するために、最初期遺伝子レポーターマウスである Arc-dVenus マウスを用いて疾患モデルマウスを作成した。

4. 研究成果

(1) 疾患モデルマウスのシンギュラリティ細胞の特性解析

これまで精神的なストレス負荷後の全脳全細胞解析により、ストレスによる不安応答を制御するごく少数の細胞集団を同定している。そのシンギュラリティ候補細胞の特性評価のため、カテコラミンシグナル阻害薬を用いた薬理学的実験および活動操作時の全脳活動マッピングを

実施し、ストレス誘発不安関連行動を再現する脳状態にあることを明らかにした。

自閉スペクトラム症患者から同定したPOGZ de novo点変異を導入したマウスの前帯状皮質のごくわずかな神経細胞群(シンギュラリティ候補細胞)の過剰な活性化が社会行動異常と関連することを見出した。そのシンギュラリティ候補細胞の特性評価のため、オキシトシンを用いた薬理学的実験を実施した結果、シンギュラリティ候補細胞の過剰な活性化がオキシトシンにより抑制されることを明らかにした。また、同点変異を有する患者から樹立したiPS細胞由来分化神経細胞の網羅的な遺伝子発現解析・ChIP解析等を実施し、POGZによる直接的な制御分子を複数同定した。

脳疾患モデルマウスにおけるヒト脳疾患と関連するシンギュラリティ(候補)細胞の特性を詳細に解析するため、蛍光タンパク質の輝度や神経活動の活性化のタイムコースを指標に、細胞を分取し、シングル細胞のRNA発現解析を実施した。その結果、複数の遺伝子発現パターンにより、周囲の細胞と区別できることを明らかにした。また、本課題で用いている脳疾患モデルマウスに関連する脳疾患患者由来のiPS細胞から分化させた神経細胞を用いたトランスクリプトーム解析により、神経発達段階における遺伝子発現に異常があること、また同細胞における電気生理学的な解析により、シナプス機能に異常があることが明らかになった。

(2) シンギュラリティ細胞や脳疾患の起点の解析のための基盤技術開発

シンギュラリティ現象を理解するための膨大な数の単一細胞を包括的に観察・解析する方法論を確立するため、シングル細胞トランスクリプトーム解析のための基盤技術、複数神経細胞種の神経活動レポーターマウス、また、シンギュラリティ細胞や脳疾患の起点の解析のためにiPS細胞関連の基盤技術を開発した。さらに、複数神経細胞種を同時にイメージングする技術や活動の履歴に依存する神経細胞の脳機能変化を経時的に捉える時間分解能も必要である。そこで、時間分解能を高めた不安定型蛍光タンパク質、タモキシフェン誘導型Cre組み換え酵素およびtetシステムを組み合わせたアデノ随伴ウイルスベクターを構築するとともに、対応するレポーターマウスも開発した。

脳疾患マウスモデルに関連する患者および健常者のiPS細胞を用いた3次元細胞培養系の構築を実施したが、クローンによって細胞の成熟度にばらつきがあることが明らかになった。成熟度が悪いクローンに関して、その原因を探ったところ、iPS細胞の段階での細胞の増殖性に問題があることが示唆された。増殖性が悪いクローンに関しては、Essential8培地やStem Fit培地などを用いて増殖性の改善を指標に培養条件を決定し、健常者6ライン、POGZ点変異患者3ラインの調製を完了させた。患者および健常者由来のiPS細胞の培養に適用し、それぞれの3次元細胞を調製し、表現型を観察した結果、PAX6やTBR2などの神経細胞の初期発達マーカーを指標にした実験系では、患者と健常者間で明確な差異は観察されず、患者由来の神経幹細胞の初期分化に大きな異常がないことが示唆された。また、これまでに開発してきた技術を用いて培養した細胞では、CTIP2やSATB2といった成熟神経細胞マーカーの発現量が低いことが示唆されたため、さらなる技術開発のために細胞生物学的な実験を推進した。その結果、iPS細胞を用いた3次元培養細胞とマウス成熟脳由来の神経細胞のmRNA発現量を比較したところ、CaMKIIシグナルやMAPKシグナルの活性化レベルが、iPS細胞由来の細胞で低いことを示唆する結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Yamamoto K et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Multiple alterations in glutamatergic transmission and dopamine D2 receptor splicing in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with familial schizophrenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41398-021-01676-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hayata-Takano A et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 PACAP-PAC1 Signaling Regulates Serotonin 2A Receptor Internalization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 732456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2021.732456	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Niu M et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Clastrum mediates bidirectional and reversible control of stress-induced anxiety responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eai6375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawano S et al.	4. 巻 605
2. 論文標題 Autism-associated ANK2 regulates embryonic neurodevelopment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 45～50
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.03.058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takemoto T et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Oxytocin ameliorates impaired social behavior in a mouse model of 3q29 deletion syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-022-00915-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa K et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Intranasal oxytocin administration ameliorates social behavioral deficits in a POGZWT/Q1038R mouse model of autism spectrum disorder	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00769-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Niu M et al.	4. 巻 44
2. 論文標題 Altered Functional Connectivity of the Orbital Cortex and Striatum Associated with Catalepsy Induced by Dopamine D1 and D2 Antagonists	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 442 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-01006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi C et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Lipocalin-type prostaglandin D synthase regulates light-induced phase advance of the central circadian rhythm in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01281-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi S et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Activation of the VPAC2 Receptor Impairs Axon Outgrowth and Decreases Dendritic Arborization in Mouse Cortical Neurons by a PKA-Dependent Mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumura Kensuke, Baba Masayuki, Nagayasu Kazuki, Yamamoto Kana, Kondo Momoka, Kitagawa Kohei, Takemoto Tomoya, Seiriki Kaoru, Kasai Atsushi, Ago Yukio, Hayata-Takano Atsuko, Shintani Norihito, Kuriu Toshihiko, Iguchi Tokuichi, Sato Makoto, Takuma Kazuhiro, Hashimoto Ryota, Hashimoto Hitoshi, Nakazawa Takanobu	4. 巻 519
2. 論文標題 Autism-associated protein kinase D2 regulates embryonic cortical neuron development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 626 ~ 632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura et al	4. 巻 11
2. 論文標題 Pathogenic POGZ mutation causes impaired cortical development and reversible autism-like phenotypes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14697-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanuma Masato, Kasai Atsushi, Bando Kazuki, Kotoku Naoyuki, Harada Kazuo, Minoshima Masafumi, Higashino Kosuke, Kimishima Atsushi, Arai Masayoshi, Ago Yukio, Seiriki Kaoru, Kikuchi Kazuya, Kawata Satoshi, Fujita Katsumasa, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Direct visualization of an antidepressant analog using surface-enhanced Raman scattering in the brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e133348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.133348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Shuto, Kawanai Takuya, Yamauchi Ryosuke, Chen Lu, Miyaoka Tatsunori, Yamada Mei, Asano Satoshi, Hayata-Takano Atsuko, Nakazawa Takanobu, Yano Koji, Horiguchi Naotaka, Nakagawa Shinsaku, Takuma Kazuhiro, Waschek James A., Hashimoto Hitoshi, Ago Yukio	4. 巻 14
2. 論文標題 Activation of the VPAC2 Receptor Impairs Axon Outgrowth and Decreases Dendritic Arborization in Mouse Cortical Neurons by a PKA-Dependent Mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi et al	4. 巻 3
2. 論文標題 Lipocalin-type prostaglandin D synthase regulates light-induced phase advance of the central circadian rhythm in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01281-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawase Haruki, Ago Yukio, Naito Megumi, Higuchi Momoko, Hara Yuta, Hasebe Shigeru, Tsukada Shinji, Kasai Atsushi, Nakazawa Takanobu, Mishina Tadashi, Kouji Hiroyuki, Takuma Kazuhiro, Hashimoto Hitoshi	4. 巻 176
2. 論文標題 mS-11, a mimetic of the mSin3-binding helix in NRSF, ameliorates social interaction deficits in a prenatal valproic acid-induced autism mouse model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmacology Biochemistry and Behavior	6. 最初と最後の頁 1~5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pbb.2018.11.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 橋本均
2. 発表標題 High-speed and scalable whole-brain imaging system FAST
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitoshi Hashimoto, Kaoru Seiriki, Atsushi Kasai, Takanobu Nakazawa
2. 発表標題 High-speed and high-resolution whole-brain imaging system FAST (block-face serial microscopy tomography)
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia, Advances in Optical Imaging of Living Cells & Organisms: Focus on the Brain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kaoru Seiriki, Atsushi Kasai, Takanobu Nakazawa, Hitoshi Hashimoto
2. 発表標題 Whole-brain analysis of the NMDA receptor antagonist-induced neuronal activation in mice using high-speed and high-resolution imaging system FAST (block-face serial microscopy tomography)
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia, Advances in Optical Imaging of Living Cells & Organisms: Focus on the Brain (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中澤敬信、橋本亮太、田熊一敞、橋本均
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第48回日本神経精神薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本均
2. 発表標題 脳疾患の病態解析と創薬へ向けたアンバイアス全脳イメージング
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野ホームページ
<http://molpharm.umin.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中澤 敬信 (Nakazawa Takanobu) (00447335)	東京農業大学・生命科学部・教授 (32658)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------