

令和元年6月12日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10191

研究課題名(和文) シナプスプルーニング仮説に基づくiPS細胞由来神経培養系での統合失調症病態解明

研究課題名(英文) Analyzing synaptic pathology of schizophrenia by using the iPS cell derived neuronal culture.

研究代表者

鳥塚 通弘 (Toritsuka, Michihiro)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：20588529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症は人口の約1%を占める精神疾患であるが、その病態は未だ解明されていない。病態仮説として発達障害仮説やシナプス仮説が提唱されているが、脳の生検は不可能であるため生体脳での仮説を検証することは不可能である。このためiPS細胞の技術を用いて作成した患者由来神経細胞によって、シナプス形成と病態に関与すると考えられている補体・補体制御因子の発現を調べたところ、患者・健常者で発現に差を認めた。認められた結果がどのように病態を生むかについて、今後さらに解析を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳に原因があると考えられる精神疾患の病理病態を把握することは困難である。身体他の臓器の様に、生検を行って発病時や病勢の悪化時に何が起きているかを見ることができれば、治療薬のターゲットもより分かりやすいものとなる。これらの観点から、本研究の様にiPS細胞の技術を用いて患者由来の生きている神経細胞を解析し、健常者との比較において差異を見出したことは、今後の診断・治療の改善につながる一歩であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Schizophrenia is one of major psychiatric disorders with lifetime prevalence about 1%. Multimodal studies have been done and the developmental hypothesis or synaptic hypothesis is suggested, but the pathophysiology is still unclear because of the inaccessibility to living brain cells. Thus we tried to investigate the cellular phenotype of iPSC-derived neurons from schizophrenia patient focusing on complement and complement regulatory factors. As a result, gene expression of synaptic protein and complement regulatory factor CSMD-1 was different between groups.

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 培養系 プルーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は人口の約 1%が罹患する疾患であり、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、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が、未だその病因・病態の解明には至っていない。これまでのところ、病態仮説として発達障害仮説が最も有力な候補のひとつとされている (Weinberger DR, ArchGenPsy, 1987)。また、死後脳研究からは、統合失調症患者の大脳皮質前頭前野の錐体細胞樹状突起におけるシナプスが健常者に比して少ないことが報告されている (Glantz LA and Lewis DA, ArchGenPsy 2000)。シナプスの形成は生後から幼少期に増加の一途をたどるが、思春期に不要なシナプスが刈りこまれ (プルーニング) 成熟した脳を形成していく。このシナプスプルーニングの時間経過が統合失調症の臨床経過と相関するため、統合失調症の病態モデルとしてシナプスプルーニング障害が提唱され (Penzes *et al*, Nature Neuroscience, 2011)、死後脳研究における所見はシナプスプルーニング亢進の結果と考えられる。しかし、実際に統合失調症患者の神経細胞において、シナプスプルーニングが亢進していることを確かめた研究は申請者の知る限りまだ無い。

近年のマウスを用いた研究から、発達期におけるシナプスプルーニングには補体経路の活性化が必要であることが示され、さらに、補体成分 C1q・C3 によってタグ付けされたシナプスをミクログリアが認識してプルーニングすることが示された (Stevens, Cell, 2007; Paolicelli, Science, 2011)。この発達期におけるシナプスプルーニングには、Punishment factor としての補体、保護因子としての補体制御因子とプルーニングを実行するミクログリアが関わるのが想定される。補体・補体制御因子の異常が脳発達に与える影響は大きく、統合失調症の病態に関与すると想像されるが、補体制御因子がどのような働きでシナプスを保護するのか、またその発現量の多寡によってシナプスプルーニングが実際に変化するかどうかを確かめた研究は申請者の知る限りまだ無い。

以上の学術的知見から、統合失調症の病態モデルとしてシナプスプルーニングモデルを想定し、シナプスプルーニングに関わる補体、補体制御因子とミクログリアの機能を解析することで、統合失調症の病態解明につながると考える。

2. 研究の目的

統合失調症の病態仮説として有力なシナプスプルーニング仮説について、iPS 細胞の技術を用いることで、実際にヒト神経細胞でこれらを検証することが可能であるため、本研究では、統合失調症の一卵性双生児不一致症例ペア由来の iPS ニューロンを解析し仮説を検証する。

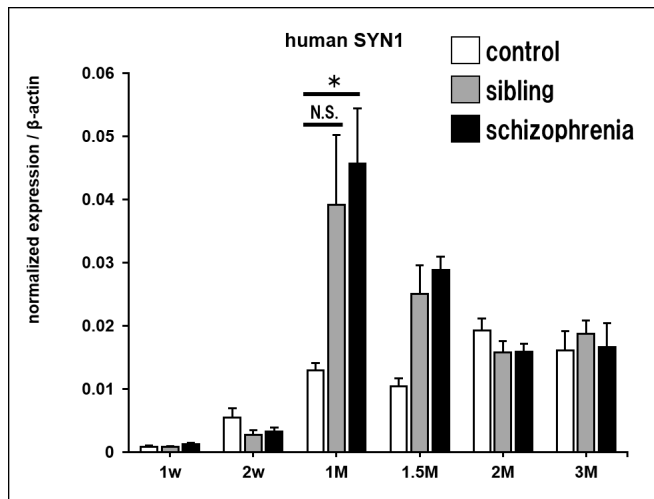
3. 研究の方法

皮膚繊維芽細胞にエピソーマルプラスミドベクターを導入して作成した iPS 細胞から神経細胞を分化誘導する実験系は既に確立しており、この培養系を用いて解析を進める。まずは健常者サンプル由来の iPS ニューロンにおける補体、補体制御因子の発現とシナプス形成の関係を継時的に解析することで、健常発達におけるこれらの関係を明らかにする。そして、統合失調症一卵性双生児不一致症例ペア由来 iPS ニューロンとの比較検討を行い、その病態としてのシナプスプルーニングの障害を確認し、その病態に寄与する分子を明らかにする。

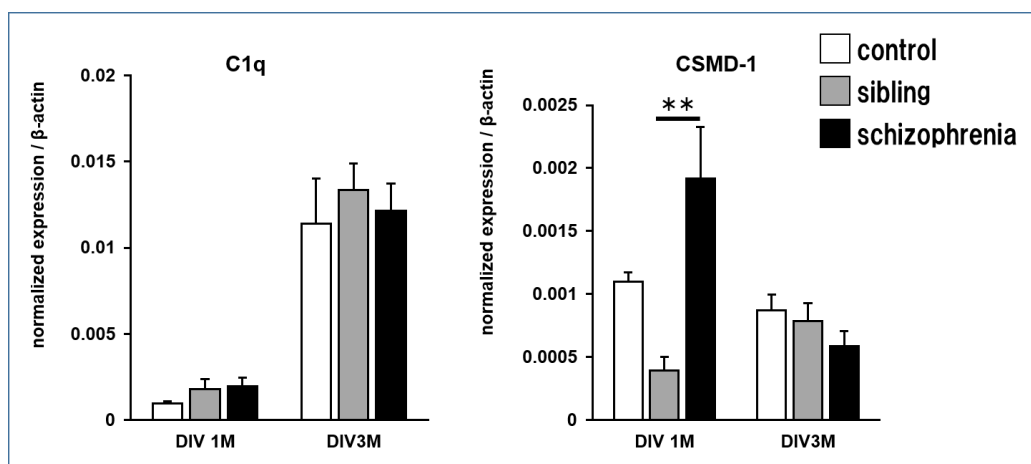
4. 研究成果

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 11 名、および本研究に賛同を得た健常対照者 12 名から、書面にて研究参加の同意を得た。全例の上腕内側部のパンチバイオプシーから得られた皮膚繊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 (Okita K. et al., Nat Methods., 8(5):409-12, 2011) で iPS 細胞を樹立し、保存した。我々の細胞培養系で iPS 細胞から分化誘導される神経細胞は、そのほとんどが vGlut1 陽性で大脳皮質の Layer marker 陽性の、大脳皮質の錐体細胞と同等の細胞であった。この培養神経細胞において、統合失調症双子不一致症例 1 ペアと年齢性別をマッチさせた健常対照者 1 名のサンプルを用いて解析を行った。まずシナプス蛋白である Synapsin1 の発現を qRT-PCR で確かめると、培養日数に従って継続的に増加し、発現が安定する様子が確かめられた。群間の比較では、有意差が認められたが、想定外なことに健常者の方が発現が低かった (two-way ANOVA, $F(2, 135)$, $p=0.014$, Control vs Schizophrenia : $P<0.05$, Tukey-HSD)。



免疫染色法で見ると、Synaptophysin と興奮性のシナプス後蛋白である PSD95 の発現を認め、一部は重なり合いシナプスを形成していると考えられたが、その数には有意差は認めなかった。パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析を行うと、活動電位を生じる機能的な神経であることが確認でき、さらには、自発性シナプス後電流 (Post synaptic current) も記録され、シナプスの形成が機能的にも確認できた。次に、補体および補体制御因子である CSMD-1 の発現を qRT-PCR 法にて調べた。補体の発現に群間で差は認めなかったら、補体制御因子の発現には有意差が認められた (two-way ANOVA, $F(2, 52)$, $p=0.0013$, sibling vs Schizophrenia : $P<0.01$, Tukey-HSD)。



今回の結果は、これまで考えられてきたシナプス仮説と照らし合わせると、一部逆の結果である。今後さらに解析を進め、結果の意義について考察していきたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. 鳥塚通弘、岸本年史

iPS細胞の活用による精神科診療の変化の可能性

精神科 30(3), 245-249, 2017

〔学会発表〕(計5件)

1. 鳥塚通弘 「ヒト細胞リソースを用いた精神疾患研究」

若手研究者育成プログラム奨励賞受賞者講演

第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会、神戸、2018

2. 鳥塚通弘 「iPS細胞を用いた統合失調症双子不一致症例の解析」シンポジウム27

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、札幌、2017

3. 鳥塚通弘 「ヒト細胞リソースを用いた精神疾患研究」若手研究者育成プログラム奨励賞

受賞者講演

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、札幌、2017

4. Michihiro Toritsuka

The cellular analysis of schizophrenia by using iPSC-derived neurons

WFSBP 2016 @ Lima, Symposium 4: Multimodal Studies of Excitatory and Inhibitory Signaling Balance in Schizophrenia and Autism.

5. 鳥塚通弘 a, 牧之段学 a, 芳野浩樹 a, 濱野 岩佐香里 a, 山室和彦 a, 赤松和土 b, 岡田洋平 b,d, 紀本創兵 a, 井川大輔 a, 橋本和典 a, 深見伸一 a, 山下泰徳 a, 今村明 c, 西原浩司 c, 小澤寛樹 c, 岡崎祐土 c, 岡野栄之 b, 岸本年史 a

a: 奈良県立医科大学精神医学講座 b: 慶應義塾大学医学部生理学教室

c: 長崎大学医学部精神神経科学教室 d: 愛知医科大学医学部神経内科学講座

iPS細胞由来神経細胞を用いた統合失調症双子不一致症例の解析

第17回 ORIGIN 神経科学研究会 2016、福井

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：芳野 浩樹

ローマ字氏名：Hiroki YOSHINO

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10347560

(2)研究協力者

研究協力者氏名：牧之段 学

ローマ字氏名：Manabu MAKINODAN