

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15561

研究課題名(和文)精神疾患由来幹細胞からの中脳皮質辺縁系ドーパミン神経(A10)の解析

研究課題名(英文)Analysis of mesolimbic dopaminergic neuron (A10) induced from patients of mental disorders

研究代表者

曾良 一郎 (Sora, Ichiro)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：40322713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：黒質線条体系ドーパミン神経細胞(A9)及び中脳皮質辺縁系ドーパミン神経(A10)の分化・誘導に関わる因子のSDIA(Stromal cell Derived Inducing Activity)法を用いて検討した。SDIA法による継代培養にてドーパミン神経細胞による分化・誘導を様々な期間で検討した結果、約3週間にてOtx2とSox6が発現することを見いだした。Otx2とSox6が重複して発現している細胞は認められなかった。SDIA法によるドーパミン神経細胞による培養は約3週間にて黒質線条体系ドーパミン神経細胞(A9)と中脳皮質辺縁系ドーパミン神経(A10)に分化・誘導されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Factors related to the differentiation and induction of the nigrostriatal dopamine neuron (A9) and the mesolimbic dopamine neuron (A10) were analyzed with SDIA (Stromal cell Derived Inducing Activity) method. As a result of examining differentiation and induction to dopaminergic neurons with SDIA method in various periods, it was found that Otx 2 and Sox 6 are expressed in about 3 weeks. Cells in which Otx 2 and Sox 6 are overlappingly expressed were not observed. Culture with dopamine neurons by SDIA method was thought to differentiate into and induce the nigrostriatal dopamine neuron (A9) and the mesolimbic dopamine neuron (A10) in about 3 weeks.

研究分野：精神医学

キーワード：Otx2 Sox6

### 1. 研究開始当初の背景

黒質線条体系ドーパミン神経は、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) を含む幹細胞からの分化・誘導法が活発に試みられ、精力的にパーキンソン病の再生医療が目指されている。一方、情動・認知機能を担う中脳皮質辺縁系のドーパミン神経系は運動調節機能を担う黒質線条体系と異なる神経活動の動態を示すが、十分に取組まれているとは言い難い。

パーキンソン病の再生医療が目指された理由の一つが、ドーパミン神経の *in vitro* での解析は実験動物の胎児脳の段階から得られた初代神経培養が用いられるが、十分量の採取に限界があり、発生時期と場所に依じた特異性に由来する可塑性からの限界も加わり、実験動物の胎児由来初代神経培養によるドーパミン神経の解析の大きな律速段階であった。しかし、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞からドーパミン神経を分化・誘導することにより、実験に必要な量だけではなく、発生時期と場所に依じた特異性のあるドーパミン神経を得ることが可能となり、ドーパミン神経伝達に関わる疾患のみならず、報酬回路等の脳科学研究への貢献も期待できると思われる。

抗精神病薬が例外なくドーパミン D2 受容体の拮抗作用を有することはよく知られている。ドーパミン D2 受容体は黒質線条体系、中脳皮質辺縁系ドーパミン神経伝達の両者に関わっているが、抗精神病薬の二つのドーパミン神経伝達への制御の違いについて十分に明らかにされているとは言い難い。ドーパミン神経を黒質線条体系と中脳皮質辺縁系と区別して分化・誘導することが可能になれば、抗精神病薬の二つのドーパミン神経伝達への制御の違いをより明確に解明することが期待できる。

### 2. 研究の目的

統合失調症や注意欠陥・多動性障害 (AD/HD) 等の精神疾患の病態に関わるドーパミン神経系は腹側被蓋野から側座核や前頭葉皮質に投射している。統合失調症やAD/HD等の精神疾患の病態に関わるドーパミン神経系は中脳皮質辺縁系(A10)が障害されるが、神経疾患であるパーキンソン病では黒質から線条体に投射するドーパミン神経(A9)が変性している。

黒質線条体系と中脳皮質辺縁系ドーパミン神経は、ドーパミントランスポーターを始めとして、モノアミン神経に関わる分子の発現が異なり、黒質線条体系での細胞外ドーパミン濃度の半減期が0.075秒に対して、中脳皮質辺縁系では5秒と緩やかな神経活動の動態を示す。そこでドーパミン神経伝達の障害が想定されている精神疾患の病態解明には、黒質線条体系と中脳皮質辺縁系ドーパミン神経を区別し検討することが重要と思われる。

本研究課題では、異なる転写制御因子を指標として多能性幹細胞から中脳皮質辺縁系(A10)と黒質線条体系ドーパミン神経(A9)を区別して分化・誘導させる方法を確立し、精神疾患における二つのドーパミン神経伝達の制御の違いを解明し、病態解明・創薬への貢献を目的とした。

### 3. 研究の方法

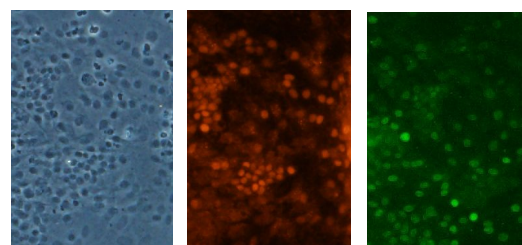
黒質線条体系ドーパミン神経細胞(A9)及び中脳皮質辺縁系ドーパミン神経(A10)の分化・誘導に関わる因子の検討の比較対象としてマウス胚性幹(Embryonic Stem, ES)細胞からドーパミン神経細胞を高効率に作成することができるSDIA (Stromal cell Derived Inducing Activity) 法を用い、マウス由来のフィーダー細胞であるPA6細胞とES細胞の共培養によるドーパミン神経細胞の作成を行った。

最近、二つのドーパミン神経の分化誘導に関わる転写制御因子が見いだされ、Sox6は黒質線条体系ドーパミン神経の起始核である黒質緻密部に選択的に発現し、Otx2は中脳皮質辺縁系ドーパミン神経の起始核である腹側被蓋野に選択的に発現することが明らかとなったことから (Panman L, et al. Cell Rep 2014)、二つのドーパミン神経の分化・誘導はSox6、Otx2を指標として検証した。

### 4. 研究成果

本研究においては最終的にはiPS細胞を用いた解析を行う予定であるが、ヒトiPS細胞の増殖は遅く、得られる細胞数はある程度限定的である。そのため、中脳皮質辺縁系ドーパミン神経細胞への分化誘導の条件の予備検討をまずマウスES細胞で行い、その上でヒトiPS細胞を用いた検討を行う方針に変更した。

ドーパミン神経は、神経管の最腹側のfloor plate細胞と呼ばれるオーガナイザー細胞から産生されることが知られている。ES細胞から神経細胞への分化誘導法としては、このfloor plate細胞の形成時期にSonic hedgehog(SHH)あるいはWnt/cateninシグナルを活性化させることにより腹頭側に分化させ中脳皮質辺縁系ドーパミン神経が誘導される。



分化細胞                      分化細胞での Otx2 発現                      分化細胞での Sox6 発現

図 1

SDIA 法による継代培養にてドーパミン神経細胞による分化・誘導を様々な期間で検討した結果、約3週間にてOtx2とSox6による免疫染色を行ったところOtx2とSox6が発現することを見いだした。Otx2とSox6が重複して発現している細胞は認められなかった(図1)。

転写制御因子であるOtx2とSox6は、Sox6は黒質線条体系ドーパミン神経(A9)の起始核である黒質緻密部に選択的に発現し、Otx2は中脳皮質辺縁系ドーパミン神経(A10)の起始核である腹側被蓋野に選択的に発現することが報告されていることから、SDIA法によるドーパミン神経細胞による培養は約3週間にて黒質線条体系ドーパミン神経細胞(A9)と中脳皮質辺縁系ドーパミン神経(A10)に分化・誘導されると考えられた。

ES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞から分化誘導されるドーパミン神経は、神経疾患であるパーキンソン病の再生医療を目指して、従来は黒質から線条体に投射する黒質線条体系ドーパミン神経を得ることが目標とされてきた。しかし、統合失調症を始めとする多くの精神疾患におけるドーパミン神経伝達は黒質線条体系ではなく、中脳皮質辺縁系のドーパミン神経伝達の障害が想定されている。

多能性幹細胞からドーパミン神経への分化誘導は、現在のところ黒質線条体系ドーパミン神経の作成方法は確立されている(Arenas, et al. Development 2015)。しかしながら、黒質線条体系ドーパミン神経は、精神疾患の病態解明には十分な解析対象とはなり得ないと思われる。

中脳皮質辺縁系と黒質線条体系ドーパミン神経を区別して分化・誘導させる方法を確立することにより、精神疾患における二つのドーパミン神経伝達の制御の違いを解明し、病態解明・創薬への貢献が期待できる。

## 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 12件)

1. Watanabe Y, Nunokawa A, Shibuya M, Ikeda M, Hishimoto A, Kondo K, Egawa J, Kaneko N, Muratake T, Saito T, Okazaki S, Shimasaki A, Igeta H, Inoue E, Hoya S, Sugai T, Sora I, Iwata N, Someya T. Rare truncating variations and risk of schizophrenia: Whole-exome sequencing in three families with affected siblings and a three-stage follow-up study in a Japanese population. **Psychiatry Res.**235:13-18(2016)
2. Okazaki S, Boku S, Otsuka I, Mouri K, Aoyama S, Shiroya K, Sora I, Fujita A, Shirai Y, Shirakawa O, Kokai M, Hishimoto A. The cell cycle-related genes as biomarkers for schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 70:85-91(2016)
3. Eguchi N, Hishimoto A, Sora I, Mori M. Slow synaptic transmission mediates by TRPV1 channels in CA3 interneurons of the hippocampus. **Neurosci Lett.** 616:170-6(2016)
4. Yamaki N, Hishimoto A, Otsuka I, Sasada T, Boku S, Saito T, Yasuda Y, Yamamori H, Ikeda M, Ikeda M, Sora I, Iwata N, Hashimoto R. Optimizing Outcomes in Clozapine Rechallenge Following Neutropenia Using Human Leukocyte Antigen Typing: A Case Report. **Psychiatry Clin Neurosci.**71(4):289-290(2017)
5. Ide S, Takahashi T, Takamatsu Y, Uhl GR, Niki H, Sora I, Ikeda K. Distinct Roles of Opioid and Dopamine Systems in Lateral Hypothalamic Intracranial Self-Stimulation. **Int J Neuropsychopharmacol.** 20(5):403-409(2017)
6. Shimmyo N, Hishimoto A, Otsuka I, Okazaki S, Boku S, Mouri K, Horai T, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I. Association study of MIF promoter polymorphisms with suicide completers in the Japanese population. **Neuropsychiatr Dis Treat.** 13:899-908(2017)
7. Hoya S, Watanabe Y, Hishimoto A, Nunokawa A, Inoue E, Igeta H, Otsuka I, Shibuya M, Egawa J, Sora I, Someya T. Rare FBXO18 variations and risk of schizophrenia: Whole-exome sequencing in two parent-affected offspring trios followed by resequencing and case-control studies. **Psychiatry Clin Neurosci.** 71(8):562-568(2017)
8. Otsuka I, Izumi T, Boku S, Kimura A, Zhang Y, Mouri K, Okazaki S, Shiroya K, Takahashi M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I, Hishimoto A. Aberrant telomere length and mitochondrial DNA copy number in suicide completers. **Sci Rep.** 7(1):3176 (2017)
9. Hoya S, Watanabe Y, Hishimoto A, Nunokawa A, Kaneko N, Muratake T, Shinmyo N, Otsuka I, Okuda S, Inoue E, Igeta H, Shibuya M, Egawa J, Orime N, Sora I, Someya T. Rare PDCD11 variations are not associated with risk of schizophrenia in Japan. **Psychiatry Clin Neurosci.** 71(11):780-788 (2017)
10. Okazaki S, Hishimoto A, Otsuka I, Watanabe Y, Numata S, Boku S, Shimmyo N, Kinoshita M, Inoue E,

Ohmori T, Someya T, Sora I. Increased serum levels and promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor in schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 83:33-41 (2018)

11. Eguchi N, Sora I, Muguruma K. Self-organizing cortex generated from human iPSCs with combination of FGF2 and ambient oxygen. **Biochem Biophys Res Commun**. 498(4):729-735 (2018)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Sumiyoshi C, Takaki M, Okahisa Y, Sato T, Sora I, Harvey Philip D, Nuechterlein K, Subotnik K, Sumiyoshi T. The goals for better work outcome in Japanese patients with schizophrenia: cut-off performances on measures of functional outcomes. The 5th Biennial Schizophrenia International Research Society Conference. Firenze, Italy[2016/4/2-6]
2. Ikeda K, Nishizawa D, Fukuda K, Hayashida M, Higuchi S, Sugimura H, Sora I. Genetic polymorphisms commonly associated with sensitivity to addictive substances. CINP 30th World Congress. Seoul, Korea[2016/7/3-5]
3. Moriya Y, Kasahara Y, Hagino Y, Scott H F, Hen R, Ikeda K, Uhl GR, Sora I. Methamphetamine induced changes of monoamine neurotransmission in 5-HT1B KO mice. CINP 30th World Congress. Seoul, Korea[2016/7/3-5]
4. Moriya Y, Kasahara Y, Scott H F, Uhl GR, Ikeda K, Sora I. The effects of chronic stress on alcohol consumption in  $\mu$ -opioid receptor knockout mice. International Narcotics Research Conference (INRC) 2017, Chicago, USA [2017/7/9-14]
5. 曾良一郎. モノアミン神経伝達とAD/HD 第58回日本小児神経学会学術集会 : ランチョンセミナー6 東京 [2016/6/3]
6. 曾良一郎. 衝動制御障害とドパミン系. Plenary Lecture5, 第11回パーキンソン病・運動障害疾患コンgres 東京[2017/10/26]

〔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〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾良 一郎 (SORA, Ichiro)  
神戸大学・医学研究科・教授  
研究者番号 : 40322713

(2) 研究分担者

毛利 健太郎 (MOURI, Kentaro)  
神戸大学・保健管理センター・助教  
研究者番号 : 00642125

菱本 明豊 (HISHIMOTO, Akitoyo)  
神戸大学・医学研究科・准教授  
研究者番号 : 50529526

朴 秀賢 (BOKU, Shuken)  
神戸大学・医学研究科・講師  
研究者番号 : 60455665

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者