

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15521

研究課題名（和文）多発家系iPS細胞による双極性障害細胞モデルの開発と原因変異の探索

研究課題名（英文）Generation of bipolar-disorder induced pluripotent stem cell model from a multiplex pedigree and investigation of causal variants

研究代表者

高松 岳矢（Takamatsu, Gakuya）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：90801431

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：将来的に病態研究や治療薬開発のツールになることを目的に、双極性障害（躁うつ病）患者からiPS細胞を作成し、双極性障害の特徴をもつ「疾患モデル細胞」を開発を目指す研究である。双極性障害が多く見られる家族の患者に協力をいただき、細胞を作成した。また双極性障害の発症に影響する遺伝変異も探索した。

研究成果(1)双極性障害患者から作成したiPS細胞を、実験的に神経細胞に変化させると、健常者に比べて神経活動が活発だった。双極性障害のモデル細胞として妥当と考えられた。(2)1番染色体のSPOCD1遺伝子を発症に影響を与える可能性がある候補遺伝子とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

双極性障害の原因はほとんどわかっていない。そのようななか、本研究では、目標である原因変異の明らかな双極性障害疾患モデルiPS細胞の確立に向けて、期待できる成果を得ることができた。疾患モデルiPS細胞が作成されれば、神経細胞の易興奮性の分子機序の解明や本質的な病態生理に基づく創薬、双極性障害動物モデルの作成など、これまでのボトルネックが解消され、多方面に展望が開ける。疾患モデルiPS細胞の確立に向けて、今後さらに研究を積み重ねていく必要がある。

研究成果の概要（英文）：Patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) with genetic variations having large effects on the development of neuropsychiatric diseases are expected to be cellular disease models. To establish bipolar disorder iPSC model, we focused on rare familial cases with potential high-risk genetic factors and we performed comprehensive genetic analysis and cellular phenotype analysis of patient iPSC-derived neurons.

In summary, we identified SPOCD1, a candidate gene which have the potential to contribute to bipolar disorder and depression in a multiplex pedigree. Moreover, iPSCs from affected individuals of the pedigree were differentiated into excitatory neurons. The neurons from the affected individuals showed higher frequency of the calcium transient compared with neurons from healthy controls. Our results would be promising to the cellular model of bipolar disorder for various applications.

研究分野：精神医学、細胞生物学、ゲノム医学、神経科学

キーワード：双極性障害 iPS細胞 ゲノム医学 病態生理 カルシウムイメージング 連鎖解析 疾患モデル 神経細胞

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 双極性障害は人口の約1~4%が罹患する精神疾患であるが、分子病態はほとんどわかっておらず、病態解明の手がかりも乏しい。一般に遺伝性の高い複雑疾患では、発症に強い影響力をもつ稀なゲノム要因をもつ患者の iPS 細胞を疾患モデルとする手法は合理的なアプローチである。しかしながら、双極性障害の発症に強い影響力をもつゲノム要因は未だ同定されず、強い原因変異をもつ疾患 iPS 細胞モデルはなかった。

(2) そのような状況のなか、我々は2013年に沖縄県で双極性障害と反復性うつ病の多発する大規模家系を見出し、この家系内で1番染色体短腕領域(1p36-35)が疾患に連鎖することを発見した。これは双極性障害と反復性うつ病の発症に強い影響力をもつ潜在的なゲノム要因と考えられた。また過去の連鎖解析研究で1p36-35領域と双極性障害やうつ病の間に、有意あるいはnominalな連鎖の報告があり、この領域に疾患と関連する遺伝要因が存在している可能性が考えられた。

(3) 双極性障害患者の iPS 細胞を用いた病態研究では2015年にMertensら(Merten et al., 2015)が分化誘導神経細胞の易興奮性を発表し、この分野に大きなインパクトを与えた。研究の次段階は分子機序解明であり、そのために原因変異の明らかな双極性障害疾患モデル iPS 細胞の確立が望まれた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、双極性障害の病態研究に有用な、原因変異の明らかな双極性障害疾患モデル iPS 細胞の確立である。双極性障害と反復性うつ病の多発する家系の原因変異を探索し、並行して家系内患者の iPS 細胞から神経細胞を分化誘導し細胞表現型を見出すことを目指した。

3. 研究の方法

(1) 家系内の罹患者と非罹患者のゲノムを全ゲノムあるいは全エクソンシーケンスし、罹患者が共通して保有する1p36-35の連鎖領域内のハプロタイプを決定する。ハプロタイプにあるゲノム変異のうち、アミノ酸が非同義変異となりマイナーアレル頻度(MAF)が低いものをピックアップし検討する。(これらの遺伝学的解析は本研究課題以外の公的研究費も使用した。)

(2) 研究開始前に樹立した家系内患者、家系内健常者、家系外健常者の iPS 細胞を使用する。iPS 細胞を神経細胞に分化誘導し、神経細胞の自発的興奮をFluo4-AMによるカルシウムイメージングで評価する。なお、iPS 細胞の樹立は共同研究を行なっている東京慈恵会医科大学 再生医学研究部で一貫した手法で行われた。

4. 研究成果

(1) 1p36-35 疾患ハプロタイプの決定と候補遺伝子 SPOCD1 変異の発見

双極性障害と反復性うつ病の多発する家系から、3世代8名の患者と8名の非罹患者の血液検体の提供を受けてゲノム解析を行った。全ての研究計画は琉球大学の倫理審査委員会で承認され、参加者からインフォームドコンセントを得て実施した。2つのトリオを構成する5名の全ゲノムシーケンスを標準ヒトゲノム配列にアライメントし、一塩基置換(SNV)と挿入・欠失を1p36.11-1p34.3の範囲でフェージングし、家系内患者が共有する6.7Mbのハプロタイプを決定した。最終的に6,713,222塩基対のうち74サイトを除いたほとんどのサイトの相を決めることができ

た。このハプロタイプに何らかの疾患の原因となる変異が隠れていると考え、変異をフィルタリングすると、アミノ酸置換を起こし、MAF が 1%未満である 3 つの SNV、rs74896528-T (SES2 遺伝子)、rs200858617-A (SDC3 遺伝子)、rs201246409-G (SPOCD1 遺伝子) が見つかった。さらに SPOCD1 遺伝子はコード領域に rs201246409-G とともに rs35252813-A と rs35533335-A をもち、ハプロタイプ上に 3 つのミスセンス変異が同時に存在し (表 1)、その三つ組の頻度は世界的に極めて稀だった (頻度 0.0004, 1000GP database)。

dbSNP ID	Chr	Pos	REF	ALT	function	gene	AA change
rs201246409	1	32280802	C	G	exonic	SPOCD1	A45P
rs35533335	1	32280369	G	A	exonic	SPOCD1	P189L
rs35252813	1	32256590	G	A	exonic	SPOCD1	P1076S

表 1. 家系内患者が共有していた SPOCD1 の 3 ミスセンス変異 (Takamatsu et al., 2022 より)

SES2、SDC3、SPOCD1 はこれまでのゲノムワイド関連解析研究 (GWAS) で報告のない遺伝子であったが、SPOCD1 の機能的パートナーである PIWIL4 (Zoch et al., 2020) は英国のうつ病 GWEIS (genome-wide by environment interaction study) で最も強い関連を示した遺伝子であった (Arnau-Soler et al., 2019, $p = 4.95 \times 10^{-9}$)。PIWIL4 は SPOCD1 依存的に精巣における piRNA の制御を行い、LINE1 などのトランスポゾンのサイレンシングに関わっている。PIWIL と SPOCD1 の脳での機能は未知であるが、トランスポゾンの発現調節などを介して精神疾患に影響する可能性はあるかもしれない。

また本研究課題とは別に、国立精神神経医療研究センター 疾患第 3 部と共同で、精神疾患患者検体の SPOCD1 rs201246409-G アレル保有率を調べたところ、一般人口での極めて低いアレル頻度 (MAF= 0.0008, ToMMo 8.3KJP) に比して、88 名の双極性障害 I 型患者から 1 名のヘテロ接合体が見つかった。また、その患者は rs201246409-G、rs35252813-A、rs35533335-A の三つ組アレルを保有した。ただし低いアレル頻度に対してサンプル数が足りず、統計学的に関連性を結論できなかつた。

以上のことから、今回我々が家系ハプロタイプから発見した SPOCD1 変異は双極性障害とうつ病に影響する候補遺伝変異と考えられ、今後さらなる検討を行うこととした。なお 1p36-35 疾患ハプロタイプの非コード領域、特に転写調節に関わる領域の探索も必要であり、新たに研究を開始した。

(2) 家系内患者 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞のカルシウムイメージング

これまで述べてきた双極性障害と反復性うつ病の多発する家系の患者の iPS 細胞を用いて、神経細胞に分化したときの表現型を調べた。本研究課題以前に末梢血の T 細胞から樹立した iPS 細胞を用いた。

研究計画では低分子化合物を用いた dual SMAD 阻害により神経細胞を分化誘導する手法であったが、実際に行うと我々の実験環境では誘導効率が低く、培養毎に細胞状態のばらつきが大きかったことから分化誘導方法を変更した。様々な試行錯誤を経て、Ngn2 遺伝子をレンチウイルスで導入し、ドキシサイクリンでその発現を誘導するとともに、培養初期に低分子化合物で dual

SMAD 阻害を行う Nehme らの方法 (Nehme et al., 2018) をもとに、細部を最適化した分化誘導プロトコルを作成した。この方法で、培養 30 日目にカルシウムイメージングで細胞の同期発火が観察でき、免疫染色でシナプスや神経突起マーカーのシグナルを見ることができた (図 1)。

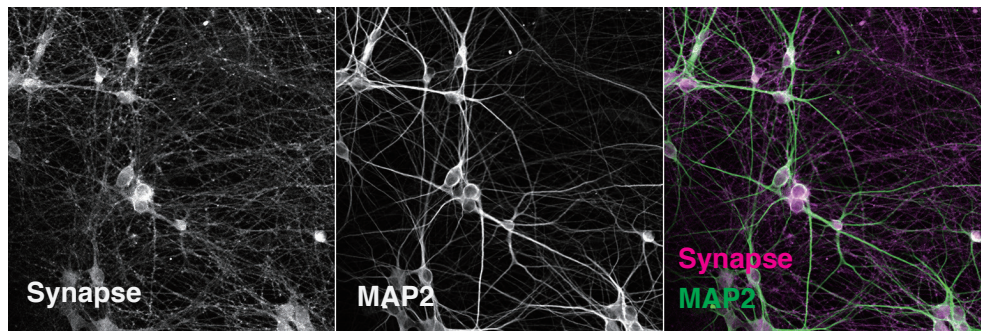


図 1. ヒト iPS 細胞から分化誘導した神経細胞の免疫染色 (Synapse は抗 Active Zone 抗体)

家系内患者 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞と、家系外の健常者コントロールの神経細胞を培養し、培養 29 日~30 日目に Fluo4-AM に反応させ、倒立型蛍光顕微鏡で自発活動下でのカルシウムトランジェントを撮影した。観察環境を安定させるため、ステージに恒温 CO₂ チャンバーを設置した顕微鏡を用いた。サンプルは患者 3 名、健常者 3 名からそれぞれ 1 ラインずつ iPS 細胞を用い、各ライン 2~5 回反復して培養し、データを収集した。その結果、健常者由来神経細胞に比べて、患者由来神経細胞はカルシウムスパイクの頻度が有意に多かった (図 2)。

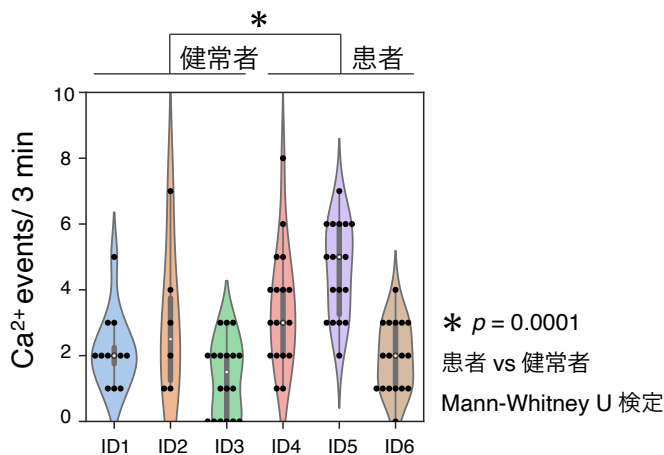


図 2. iPS 細胞由来神経細胞のカルシウムイメージング結果

家系内患者 iPS 細胞で観察した自発神経活動の亢進は、2015 年に Mertens らが報告した双極性障害の易興奮性と類似した結果と言えた。先行研究は低分子化合物を用いた分化誘導方法であり、今回のレンチウイルスを用いたリプログラミングで表現型が見られるのであれば、疾患モデル細胞として有用性が高いと思われる。今後、1 名あたり複数の iPS 細胞ラインを解析し、再現性を確認する。

まとめると、本研究により 1p36-35 に配列の決定された疾患ハプロタイプをもつ疾患 iPS 細胞の作成を行った。候補遺伝子として SPOCD1 の変異を明らかにした。また分化誘導神経細胞の表現型として高い自発発火頻度を観察した。今後は解析 iPS ラインを増やし、表現型を確実にすることと、SPOCD1 と病態との関係を検討していく。目的である、原因変異の明らかな双極性障害疾患モデル iPS 細胞の確立に向けて、期待できる成果を得ることができた。疾患モデル iPS 細胞

が作成されれば、神経細胞の易興奮性の分子機序の解明や本質的な病態生理に基づく創薬、双極性障害動物モデルの作成など、これまでのボトルネックが解消され、多方面に展望が開ける。今後もさらに研究を積み重ねていく必要がある。

参考文献

Arnau-Soler, A. et al. Genome-wide by environment interaction studies of depressive symptoms and psychosocial stress in UK Biobank and Generation Scotland. *Transl Psychiatry* 9, 14, doi:10.1038/s41398-018-0360-y (2019).

Mertens, J. et al. Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature* 527, 95-99, doi:10.1038/nature15526 (2015).

Nehme, R. et al. Combining NGN2 Programming with Developmental Patterning Generates Human Excitatory Neurons with NMDAR-Mediated Synaptic Transmission. *Cell Rep* 23, 2509-2523, doi:10.1016/j.celrep.2018.04.066 (2018).

Takamatsu, G. et al. Haplotype phasing of a bipolar disorder pedigree revealed rare multiple mutations of SPOCD1 gene in the 1p36-35 susceptibility locus. *J Affect Disord* 310, 96-105, doi:10.1016/j.jad.2022.04.150 (2022).

Zoch, A. et al. SPOCD1 is an essential executor of piRNA-directed de novo DNA methylation. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-2557-5 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takamatsu Gakuya, Yanagi Kumiko, Koganebuchi Kae, Yoshida Fuyuko, Lee Jun-Seok, Toyama Kanako, Hattori Kotaro, Katagiri Chiaki, Kondo Tsuyoshi, Kunugi Hiroshi, Kimura Ryosuke, Kaname Tadashi, Matsushita Masayuki	4. 巻 310
2. 論文標題 Haplotype phasing of a bipolar disorder pedigree revealed rare multiple mutations of SPOCD1 gene in the 1p36-35 susceptibility locus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Affective Disorders	6. 最初と最後の頁 96 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jad.2022.04.150	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 高松 岳矢、柳 久美子、馬目 陽子、李 俊錫、當山 奏子、Dimitar Dimitrov、原(宮内) 央子、長谷川 実奈美、小金淵 佳江、早川 朋子、服部 功太郎、功刀 浩、近藤 毅、高橋 智幸、要 匡、木村 亮介、岡野ジェイムス洋尚、松下 正之
2. 発表標題 双極性障害モデル細胞の開発：沖縄県の疾患多発家系を用いた疾患ゲノムとiPS細胞の統合アプローチ
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高松 岳矢、柳 久美子、馬目 陽子、李 俊錫、當山 奏子、Dimitar Dimitrov、原(宮内) 央子、長谷川 実奈美、小金淵 佳江、早川 朋子、服部 功太郎、功刀 浩、近藤 毅、木村 亮介、高橋 智幸、岡野 ジェイムス洋尚、要 匡、松下 正之
2. 発表標題 特定の遺伝要因をもつ双極性障害iPSモデル細胞の開発の試み
3. 学会等名 第116回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高松岳矢、柳久美子、馬目陽子、小金淵佳江、李俊錫、當山奏子、佐藤万仁、Dimitar Dimitrov、原（宮内）央子、長谷川実奈美、早川朋子、近藤毅、服部功太郎、功刀浩、高橋智幸、岡野ジェイムス洋尚、木村亮介、要匡、松下正之
2. 発表標題 双極性障害・反復性うつ病多発家系の強い遺伝要因の探索：家系例のゲノムシーケンスと疾患iPS細胞の統合アプローチ
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会年会・42回日本生物学的精神医学会年会・第4回日本精神薬学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高松岳矢、柳久美子、馬目陽子、小金淵佳江、李俊錫、當山奏子、原(宮内)央子、長谷川実奈美、近藤毅、要匡、岡野ジェイムス洋尚、木村亮介、松下正之
2. 発表標題 多発家系iPS細胞とアレル特異的発現解析による双極性障害の病態研究
3. 学会等名 第42回沖縄精神神経学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 GAKUYA TAKAMATSU, KUMIKO YANAGI, JUN-SEOK LEE, YOKO MANOME, CHIKAKO HARA-MIYAUCHI, KAE KOGANEBUCHI, KOTARO HATTORI, MINAMI HASEGAWA, MUTSUMI ISA, DIMITAR DIMITROV, TOMOKO HAYAKAWA, TSUYOSHI KONDO, TOMOYUKI TAKAHASHI, HIROSHI KUNUGI, HIROTAKA JAMES OKANO, RYOSUKE KIMURA, TADASHI KANAME, MASAYUKI MATSUSHITA
2. 発表標題 Development of induced pluripotent stem cell model of bipolar disorder derived from an Okinawan pedigree with a potential genetic component
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (49th annual meeting of Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高松岳矢、柳久美子、馬目陽子、小金淵佳江、李俊錫、當山奏子、伊佐睦美、服部功太郎、早川朋子、原(宮内)央子、長谷川実奈美、Dimitar Dimirov、高橋智幸、功刀浩、近藤毅、木村亮介、要匡、岡野ジェイムス洋尚、松下正之
2. 発表標題 強い遺伝要因をもつ双極性障害iPSモデル細胞の開発の試み
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高松岳矢、柳久美子、馬目陽子、小金淵佳江、李俊錫、當山奏子、服部功太郎、早川朋子、原(宮内)央子、長谷川実奈美、功刀浩、近藤毅、木村亮介、要匡、岡野ジェイムス洋尚、松下正之
2. 発表標題 双極性障害多発家系による病態モデル細胞の開発の試み：家系例のゲノムシーケンスと疾患iPS細胞の統合アプローチ
3. 学会等名 第70回西日本生理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高松岳矢、李俊錫、Dimitar Dimitrov、馬目陽子、當山奏子、原(宮内)央子、長谷川実奈美、早川朋子、柳久美子、小金淵佳江、服部功太郎、功刀浩、近藤毅、木村亮介、要匡、高橋智幸、岡野ジェームス洋尚、松下正之
2. 発表標題 双極性障害多発家系 iPS細胞の分化誘導神経細胞の検討
3. 学会等名 第41回沖縄精神神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高松 岳矢、柳 久美子、馬目 陽子、李 俊錫、當山 奏子、Dimitar Dimitrov、原(宮内) 央子、長谷川 実奈美、小金淵 佳江、早川 朋子、服部 功太郎、功刀 浩、近藤 毅、高橋 智幸、要 匡、木村 亮介、岡野ジェームス洋尚、松下 正之
2. 発表標題 双極性障害モデル細胞の開発：沖縄県の疾患多発家系を用いた疾患ゲノムとiPS細胞の統合アプローチ
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高松 岳矢、柳 久美子、馬目 陽子、李 俊錫、當山 奏子、Dimitar Dimitrov、原(宮内) 央子、長谷川 実奈美、小金淵 佳江、早川 朋子、服部 功太郎、功刀 浩、近藤 毅、木村 亮介、高橋 智幸、岡野 ジェームス洋尚、要 匡、松下 正之
2. 発表標題 特定の遺伝要因をもつ双極性障害 iPSモデル細胞の開発の試み
3. 学会等名 第116回日本精神神経学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Gakuya Takamatsu, Tadashi Kaname, Kumiko Yanagi, Chikako Hara-Miyauchi, Yoko Manome, Tomoko Hayakawa, Tsuyoshi Kondo, Hiroataka James Okano, Masayuki Matsushita
2. 発表標題 Development of cellular disease models of bipolar disorder and schizophrenia: Pedigree-based induced pluripotent stem cell studies in the Ryukyu Islands
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (WFSBP 2018 KOBE) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gakuya Takamatsu, Jun-Seok Lee, Ayano Harata, Tadashi Kaname, Kumiko Yanagi, Chikako Hara-Miyauchi, Yoko Manome, Tomoko Hayakawa, Tsuyoshi Kondo, Hiroataka James Okano, Masayuki Matsushita
2. 発表標題 沖縄県の精神疾患多発家系を用いた双極性障害・統合失調症細胞モデルの開発：疾患iPS細胞とゲノム解析を融合したアプローチ
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学学会大会 合同年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高松岳矢
2. 発表標題 双極性障害多発家系の強い遺伝要因の探索
3. 学会等名 第45回日本脳科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高松岳矢、柳久美子、小金淵佳江、李俊錫、原田綾乃、伊佐睦美、服部功太郎、功刀浩、近藤毅、木村亮介、要匡、松下正之
2. 発表標題 沖縄県の双極性障害多発家系を用いた疾患関連ゲノム変異の探索
3. 学会等名 第40回沖縄精神神経学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------