

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08015

研究課題名（和文）染色体22q11.2欠失がもたらす脳内ストレス脆弱性機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanism of stress vulnerability in the brain caused by chromosome 22q11.2 deletion

研究代表者

有岡 祐子 (Arioka, Yuko)

名古屋大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：10709497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：22q11.2欠失が引き起こす脳内分子機序の解明は、様々な精神神経疾患の発症機序解明への糸口となると考えられている。この課題に対して本研究は、22q11.2欠失患者iPS細胞を用いることで挑んだ。本研究結果により、22q11.2欠失患者のドーパミン神経細胞では、キナーゼタンパク質であるPERKの機能不全により、小胞体ストレス脆弱性や細胞骨格異常、小胞体とミトコンドリアの接触不良などが引き起こされることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

22q11.2欠失患者は様々な精神神経疾患の発症リスクを生涯にわたって抱える。本成果は、これまで知見に乏しかった22q11.2欠失患者のドーパミン神経細胞における新たな病態の解明に寄与するとともに、未だ明らかにされていない精神神経疾患の発症機序解明の一端にも貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Elucidation of the molecular mechanism in the brain due to 22q11.2 deletion is expected to provide clues to the pathogenesis of various neuropsychiatric disorders. In this study, we attempted to address this issue by using patient-derived iPS cells carrying 22q11.2 deletion. This study revealed that dysfunction of a kinase protein PERK in dopaminergic neurons from 22q11.2 deletion patients causes endoplasmic reticulum stress vulnerability, cytoskeletal abnormalities, and poor contact between endoplasmic reticulum and mitochondria.

研究分野：生物精神医学、細胞生物学

キーワード：22q11.2欠失 iPS細胞 ドーパミン神経細胞 PERK

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らのグループを含むゲノム研究の成果により、22q11.2 欠失が統合失調症 (SCZ) 発症の最大リスクゲノムバリエーションであるだけでなく、自閉スペクトラム症 (ASD) や知的能力障害等の発症リスクといった精神疾患横断的な発症リスクバリエーションでもあることが明らかとなっている(1)。加えて 22q11.2 欠失は若年性パーキンソン病やてんかんに罹患するリスクも高いことが報告されており(2)、22q11.2 欠失が引き起こす脳内異常が、幅広い精神神経疾患の発症要因となると予想される。

上述のとおり、22q11.2 欠失が引き起こす脳内分子機構の解明が様々な精神神経疾患の発症機序解明への糸口となると考えられ、国内外の研究者が取り組んでいる。例えば 22q11.2 欠失モデルマウスでは、オートファジーの異常と共に精神疾患関連の行動異常や PD 関連の運動障害が観察され、オートファジーを活性化すると回復する(3)。実際、PD(4)や、SCZ(5)の患者由来細胞を用いた解析により、オートファジーが病態に関与するとの証左がある。オートファジーの活性化は、小胞体 (ER) ストレス応答機構のひとつであることから、22q11.2 欠失により ER ストレスに対する耐性が低下していることが示唆される。

2. 研究の目的

上記の背景から、22q11.2 欠失患者の神経細胞では ER ストレス応答機構異常があるのか、それは ER ストレス脆弱性につながるのか、そして ER ストレス脆弱性による神経細胞死や機能不全が精神神経疾患発症の原因となるか、との問いが生まれた。そこで本研究の目的は、22q11.2 欠失患者 iPS 細胞を用いて、22q11.2 欠失が引き起こすヒト神経細胞の ER ストレス脆弱性機構を明らかにし、精神神経疾患の発症機構解明につなげることにした。特に、SCZ と PD 等、多くの精神神経疾患の病態に関与していると考えられているドーパミン神経細胞に着目した。

3. 研究の方法

(1) 倫理的配慮

すべての対象者から書面において本研究のインフォームドコンセントを取得した。名古屋大学医学部生命倫理審査委員会からの承認された計画に則り本研究を実施した (承認番号 2012-0184)。

(2) iPS 細胞の培養とドーパミン神経細胞への誘導

健常者 iPS 細胞は理研 BRC より入手した 201B7 (HPS0063、本研究では Control1) に加え、研究代表者有岡が樹立した健常者 3 例 (男性 1 例、女性 2 例、本研究では Control2、Control3、Control4) の計 4 例からの iPS 細胞とした。それぞれ 1 クローンずつを研究に使用した。22q11.2 欠失患者 iPS 細胞は 3 例 (男性 1 例、女性 2 例、本研究ではそれぞれ 22DS1、22DS2、22DS3) を対象とした。3 例とも 22q11.2 領域を 3Mbp ヘテロ欠失した患者である。22DS1 は知的能力障害、22DS2 は統合失調症と知的能力障害、22DS3 は知的能力障害、を呈し、それぞれの患者から樹立した 2 クローンずつの iPS 細胞を研究に使用した。ドーパミン神経細胞誘導法は研究代表者が独自に開発した高効率なドーパミン神経細胞誘導法(6) (特願 2017-82600, PCT/JP2018/15304 ドーパミン神経細胞の調製方法) を適用した。

(3) 質量分析とデータ処理

iPS 細胞から誘導したドーパミン神経細胞を 15mM Tris, 60 mM KCl, 15mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 250mM sucrose バッファーにて懸濁後、テンブロック型ホモジナイザーによって破碎した。遠心後、その上清 15 µg のタンパク質を還元・アルキル化さらにトリプシンで処理後に質量分析に使用した。機器は Orbitrap Fusion mass spectrometer (ThermoFisher 社) および UltiMate 3000 RSLCnano LC system (Dionex 社) を用いた。得られた生データは Proteome Discoverer 1.4 と MASCOT search engine にて処理した。健常者 3 例と患者 3 例で比較し、 $p < 0.05$ (t 検定、補正なし) かつ Fold Change > 10 であったタンパク質を 2 群で発現差があったタンパク質と定義した。

(4) 免疫染色およびウェスタンブロッティングで使用した一次抗体

免疫染色については、anti- α -tubulin (Sigma-Aldrich 社)、anti-TH (Millipore 社)、anti-MAP2 (Abcam 社)、anti-cleaved caspase3 (R&D systems 社)、anti-ATF4 (Abcam 社)、anti-calreticulin (Abcam 社)、anti-TOMM20 (Abcam 社) である。フィロポディアおよびラメリポディアなどの F-アクチンの染色はファロイジン (Cytoskeleton 社あるいは ThermoFisher 社) を用いた。ウェスタンブロッティングで使用した一次抗体は、anti-PERK (Cell Signaling Technology 社)、anti-phosphorylated PERK (ThermoFischer 社)、anti-eIF2 (Cell Signaling Technology 社)、anti-phosphorylated eIF2 (Cell Signaling Technology 社)、anti-ATF4 (Abcam 社)、anti-GADD34 (Proteintech 社)、anti-CHOP (Proteintech 社)、anti-ATF6 (Proteintech 社)、anti-GRP78 (NOVUS 社)、anti-IRE1 (Proteintech 社)、anti-phosphorylated IRE1 (NOVUS)、anti-actin-peroxidase (Sigma-Aldrich 社) である。

- (5) PERK 欠失および DGCR14 欠失 iPS 細胞の作製
PERK をコードする遺伝子のエクソン 3(NM_004836)を標的として、ゲノム編集 CRISPR/Cas9 によって PERK 欠失 iPS 細胞を作製した。同様にエクソン 4(NM_022719)を標的として DGCR14 欠失 iPS 細胞を作製した。
- (6) 薬剤処理
誘導して 23 日目にツニカマイシンを添加し、24 時間後の細胞生存率を測定した。Salubrinal、GSK2656157、CCT020312 は 23 日目に添加した。
- (7) 統計
2 群間の比較は Student's or Welch's t-test で実施した。3 群間の比較は Dunnett's test で実施した。P<0.05 を有意な差と定義した。

4. 研究成果

- (1) ドパミン神経細胞への誘導
健常者および 22q11.2DS 患者 iPS 細胞いずれにおいても高効率 (80%程度) に TH 陽性 (ドパミン神経細胞のマーカー) のドパミン神経細胞への誘導が可能であった。一方で、22q11.2DS 患者では III-tubulin 陽性の突起長の長さが有意に短く、MAP2 陽性の樹状突起数も有意に少なかった。
- (2) 22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞で変化するタンパク質
22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞で生じている分子変化を探索するため、半定量プロテオームを実施した。健常者に比べ、22q11.2DS 患者で発現差があったタンパク質は 272 (患者で増加 8, 低下 264) 同定された。KEGG パスウェイ解析の結果、この発現差があったタンパク質は「Protein processing in ER」のカテゴリに最も集積していた。本カテゴリは ER ストレス応答やタンパク質品質管理に関与する。つまり、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では、ER ストレスに対して脆弱性が生じていることが予想された。そこで、ツニカマイシン (ER ストレス誘発剤) を添加した際の細胞生存率を調べたところ、予想通り、22q11.2DS 患者では健常者に比べより低濃度でも細胞死が生じていた。アポトーシスマーカーである Cleaved Caspase-3 の染色結果でも同様の結果であった。
- (3) 22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では PERK タンパク質の顕著な発現低下
哺乳類における ER ストレス応答は主に 3 つのストレスセンサー PERK、IRE1、ATF6 によって制御されている。健常者と 22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞でこれらストレスセンサーの発現およびその下流シグナルをウエスタンブロッティングによって検証した。その結果、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では PERK の顕著な発現低下とその下流シグナルの活性低下が認められた。一方、分化する前の未分化な iPS 細胞では PERK の発現低下は認められなかった。
- (4) 22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞の表現型は PERK 機能不全に依存
PERK は小胞体ストレス応答に加え、F-アクチン骨格や ER-ミトコンドリア接触などに関与している。そこで、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では PERK の機能不全に依存してこれら表現型に異常が生じているのかを検証した。
まず、小胞体ストレス耐性の低さは (2) で認められていることから、これが PERK の機能不全によるものかを検証した。正常な場合、ツニカマイシンを添加すると PERK シグナルは活性化し、その下流である ATF4 の発現が増加する。しかし、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では、ツニカマイシンを添加しても ATF4 の発現が認められなかったことから、PERK シグナル依存的な小胞体ストレス応答が 22q11.2DS 患者では機能していないことが考えられた。さらに、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞に対し、PERK シグナルの活性化剤である Salubrinal を添加しておく、ツニカマイシンによる細胞死が改善されることも明らかとなった。また、ゲノム編集によって PERK を欠失させた細胞では 22q11.2DS 患者同様の小胞体ストレス低耐性が認められた。以上から、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞における小胞体ストレス耐性の低さは PERK の機能不全に起因すると考えられた。
次に、F-アクチン骨格について検証した。健常者に比べ、22q11.2DS 患者では、ラメリポディアが消失し、フィロポディアの異常伸長が認められた。22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞に PERK 活性剤である Salubrinal や CCT020312 を添加すると、健常者様の形態に改善した。逆に、健常者ドパミン神経細胞に PERK 阻害剤である GSK2656157 を添加すると 22q11.2DS 患者様の形態になった。さらに、PERK 欠失細胞でも 22q11.2DS 患者様にラメリポディアの消失とフィロポディアの異常伸長が認められた。以上から、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞における F-アクチン骨格異常は PERK 機能不全に起因すると考えられた。
最後に、ER-ミトコンドリア接触を免疫染色によって検証した。健常者に比べ、22q11.2DS 患者および PERK 欠失ドパミン神経細胞では、ER とミトコンドリアの共局在領域の低下が認められた。本表現型も、PERK の機能不全に起因すると考えられた。
- (5) 22q11.2 欠失領域遺伝子である DGCR14 が PERK の発現低下に寄与することが示唆
なぜ 22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では PERK の顕著な発現低下が生じるのか、そのメカニズムの一端解明に向け、半定量プロテオーム解析の結果に着目した。22q11.2DS 患者で発現差があったタンパク質が集積していたカテゴリのひとつに「Spliceosome」がある。22q11.2 欠失領域遺伝子のうち、Spliceosome に関与する遺伝子は DGCR14 であることから、

DGCR14 を PERK 発現低下に關与する候補遺伝子として着目した。まず、22q11.2DS 患者の遺伝子状態に近づけるため DGCR14 をノックダウンしたところ、PERK タンパク質の発現低下が認められた。さらに、DGCR14 ヘテロ欠失の iPS 細胞株を作製し、ドパミン神経細胞に誘導して PERK の発現を解析したところ、22q11.2DS 患者様の低下が認められた。以上から、DGCR14 が PERK の機能不全に寄与していることが考えられた。

(6) 本研究成果を科学誌に投稿

本研究に関する内容は *EBioMedicine* 63:103138. 2021 に掲載された(7)。

(7) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本成果は、これまで知見に乏しかった、22q11.2DS 患者のドパミン神経細胞における新たな病態解明に寄与すると考えられる。今後、より生体脳に近い解析を目指し、中脳オルガノイド技術を適用した解析を予定している。

<引用文献>

1. Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Shiino T, Yoshimi A, et al. High-resolution copy number variation analysis of schizophrenia in Japan. *Mol Psychiatry*. 2017;22(3):430-40.
2. Mok KY, Sheerin U, Simón-Sánchez J, Salaka A, Chester L, Escott-Price V, et al. Deletions at 22q11.2 in idiopathic Parkinson's disease: a combined analysis of genome-wide association data. *Lancet Neurol*. 2016;15(6):585-96.
3. Sumitomo A, Horike K, Hirai K, Butcher N, Boot E, Sakurai T, et al. A mouse model of 22q11.2 deletions: Molecular and behavioral signatures of Parkinson's disease and schizophrenia. *Sci Adv*. 2018;4(8):eaar6637.
4. Michel PP, Hirsch EC, Hunot S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*. 2016;90(4):675-91.
5. Merenlender-Wagner A, Malishkevich A, Shemer Z, Udawela M, Gibbons A, Scarr E, et al. Autophagy has a key role in the pathophysiology of schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2015;20(1):126-32.
6. Arioka Y, Shishido E, Kubo H, Kushima I, Yoshimi A, Kimura H, et al. Single-cell trajectory analysis of human homogenous neurons carrying a rare RELN variant. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):129.
7. Arioka Y, Shishido E, Kushima I, Suzuki T, Saito R, Aiba A, et al. Chromosome 22q11.2 deletion causes PERK-dependent vulnerability in dopaminergic neurons. *EBioMedicine*. 2021;63:103138.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Arioka Yuko, Shishido Emiko, Kushima Itaru, Suzuki Toshiaki, Saito Ryo, Aiba Atsu, Mori Daisuke, Ozaki Norio	4. 巻 63
2. 論文標題 Chromosome 22q11.2 deletion causes PERK-dependent vulnerability in dopaminergic neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 103138 ~ 103138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2020.103138	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有岡祐子
2. 発表標題 iPS 細胞でつくる精神疾患と知る精神疾患：早期病態に着目して
3. 学会等名 第12回自閉症学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有岡祐子
2. 発表標題 iPS細胞から精神疾患の病態解明を目指す取り組みと課題
3. 学会等名 第127回日本解剖学総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 有岡祐子
2. 発表標題 ゲノム情報とiPS細胞技術を活かした精神疾患の病態解明と創薬への応用
3. 学会等名 第43回 日本生物学的精神医学会第51回 日本神経精神薬理学会合同年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 有岡祐子、尾崎紀夫
2. 発表標題 染色体22q11.2欠失症候群患者ドパミン神経細胞ではキナーゼタンパク質PERK依存的脆弱性が生じる
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会・第42回日本生物学的精神医学会・第4回日本精神薬学会総会・学術集会 (NPBPPP 2020 合同年会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Arioka
2. 発表標題 Patient-derived iPS cells reveal the cellular pathophysiology of neuropsychiatric disorders
3. 学会等名 The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有岡祐子、久島周、尾崎紀夫
2. 発表標題 染色体22q11.2欠失患者iPS細胞由来の神経細胞はストレス応答機構に依存した脆弱性を有する
3. 学会等名 第41回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有岡祐子
2. 発表標題 精神神経疾患発症リスク変異である染色体22q11.2欠失と小胞体ストレス応答シグナル
3. 学会等名 第95回日本生化学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuko Arioka
2. 発表標題 PERK dysfunction as a molecular and cellular pathophysiology in the brain of patients with 22q11.2 deletion syndrome and its significance
3. 学会等名 Neuro 2022
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	東島 恵美子(穴戸恵美子) (Higashijima Emiko)	生理学研究所・システム脳科学研究領域・特別協力研究員	
	(40723101)	(63905)	

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