

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08025

研究課題名(和文) マクロファージとヒトiPSニューロン共培養系による統合失調症・ASD病態解析

研究課題名(英文) Pathophysiological analysis of schizophrenia and ASD by using the co-culture system of macrophages and hiPSC-derived neurons.

研究代表者

鳥塚 通弘 (Toritsuka, Michihiro)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20588529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症と自閉スペクトラム症(ASD)の病態仮説にシナプス仮説が提唱され、両疾患に免疫系の関与が注目されていることから、免疫細胞がシナプス形成に与える影響を調べることで病態解明につながるのではないかと考えた。免疫細胞として我々のグループでASDの重症度とサイトカイン発現に相関を認めた末梢のマクロファージを用い、ヒトiPS細胞由来神経細胞と共培養して調べた。結果はASD者のM1/M2いずれのマクロファージも、健常対象者と比較して強い影響を神経細胞にもたらした。この分子病態を解明することで疾患の病態解明に近づき、またこれを指標とした薬剤スクリーニングにつなげたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージは貪食能を有するのみならず、サイトカインや栄養因子を分泌する機能を持ち、マイクログリアと同様に神経細胞・グリア細胞の増殖・生存やシナプス形成に関わることがわかってきている。患者生体脳からマイクログリアを得ることはほぼ不可能であるため、簡便に採取可能な末梢マクロファージを中心に解析しバイオマーカーとなりうる指標を見出すことで、安価に多数のサンプルを解析し病態解明と創薬の可能性に踏み込める点に本研究の意義がある。実際にASD群での違いが見いだせたことは有意義である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathology of schizophrenia and autism spectrum disorder, we tried to investigate the effect of immune cells on synapse formation of neurons, because the synaptic hypothesis has been proposed for the pathological hypothesis of both disorders. Peripheral macrophages, of which cytokine expression was correlated with the severity of ASD, were used as immune cells and co-cultured with human iPS cell-derived neurons. The results is that both M1/M2 macrophages of patients with ASD had a greater impact on neurons compared to typically developed control group. We would like to approach the elucidation of disease pathophysiology and to establish the drug screening system by investigating further molecular pathways.

研究分野：精神医学

キーワード：ヒトiPS細胞 マクロファージ ASD 統合失調症

1. 研究開始当初の背景

精神疾患の多くはその病因が未解明であるが、様々な研究から、遺伝要因と環境要因の相互作用によって発病に至ると考えられている。精神疾患の多くに共通する病因・病態の基盤が想定されているが、その中でも特に統合失調症と自閉スペクトラム症（以下 ASD）は、遺伝子研究から共通する遺伝子負因が報告されている（Gandal et al, Science 2018, Kushima et al, Cell Reports 2018）。さらには、病因たりうる遺伝負因のみならず、病態仮説としても、両者にシナプス仮説が提唱されている（Pezzes et al, Nature Neuroscience 2011）。両疾患はその臨床像を異にし、例えば発症年齢は統合失調症が思春期以降であるのに対して、ASD は典型的には3歳以前の発達における特徴によって診断され、また臨床症候学的にも、一部表現型が類似している様に捉えられることもあるが、根本的には異なる疾患であるにも関わらず、共通の遺伝子負因を持ち、病態にも共通点があるということは大変興味深い。しかし、シナプス仮説においては、統合失調症は思春期のプルーンングが過剰になり結果としてシナプス数が少ないと想定されているのに対して、ASD では発達期から、もしくはプルーンングの時期を過ぎててもシナプス数が多いと想定されており、病態としてのシナプスの異常の方向性は異なることが示唆されている（Pezzes et al, Nature Neuroscience 2011）。近年のマウスを用いた研究から、発達期には補体成分 C1q によってタグ付けされたシナプスをマイクログリアが認識してプルーンングすることが示された（Stevens, Cell, 2007 ; Paolicelli, Science 2011）。補体は生体防御に不可欠な液性免疫系であり、マイクログリアは末梢におけるマクロファージと同様の機能を持った中枢神経における免疫細胞であることから、免疫系の異常によってシナプスの発達が影響を受けると考えられる。加えて、免疫系と脳の関係については、血液脳関門を構成するアストロサイトや血管内皮細胞は末梢血中のサイトカインに反応し血液脳関門の機能を変化させたり、末梢血中の免疫細胞は血液脳関門を通過できる、といった報告が相次いでいる（Corraliza 2014、Varatharaj et al, 2016）ことから、炎症反応によって末梢血中のサイトカインがマイクログリアの活性を変化させていたり、末梢の単核球やマクロファージが脳内に侵入しマイクログリア様に作用し、病理の主体を担っている可能性がある（Herz et al, Immunity 2017）。さらに、貪食作用のみならずマイクログリアが分泌するサイトカインが神経細胞の樹状突起を退縮させる可能性も近年示された（Nie et al, Neuron 2018）。実際に両疾患における免疫異常の報告は増えており（Knuesel I et al, NatRevNeurol 2014）、遺伝子研究や死後脳研究において、統合失調症のリスク要因として補体因子や（Sekar et al, Nature 2016）、ASD のリスク要因としてマイクログリアが同定されている（Gandal et al, Science 2018）。また、我々のグループでは、中枢のみならず末梢血単核球における炎症性サイトカインと ASD 患者の臨床症状の重症度に相関がある（Makinodan et al, NeurochemInt 2017）という知見を得ている。免疫系の細胞の働きは環境要因の影響を受ける要素が大きいと考えられることから、免疫系の異常の違いがシナプス形成の異常の違いをもたらし、疾患の違いを生んでいるのではないかという仮説を立てることができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、統合失調症・ASD 患者由来の免疫系細胞がヒト iPS 細胞から分化誘導した神経細胞（以下、iPS ニューロンと称する）に対して与える影響を比較検討し、両疾患の病因・病態の解明に迫ることである。

3. 研究の方法

(1) 対象：

当院に通院、入院中で DSM-5(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition)の診断基準を満たす統合失調症・ASD 患者と、年齢・性別を一致させた健常者を対象とする。各種検査（WAIS、PANSS、ADOS-2 等）を施行し、臨床的指標を評価する。

(2) 細胞培養系の構築：

中枢神経における免疫細胞はマイクログリアであるが、患者生体脳からマイクログリアを得ることはほぼ不可能であるため、採血にて末梢血単核球を得て、同細胞から誘導したマクロファージを用いて研究を進める。マクロファージは貪食能を有するのみならず、サイトカインや栄養因子を分泌する機能を持ち、マイクログリアと同様に神経・グリア細胞の増殖・生存やシナプス形成に関わることがわかっている。マクロファージについては、分離キットを用いて炎症惹起型の M1 と組織修復型の M2 に分けて培養する。

iPS ニューロンは、既に樹立済みの健常者の iPS 細胞から分化誘導する。誘導方法については、共同研究機関である慶應義塾大学医学部生理学教室・岡野栄之研究室から技術供与を受け、興奮性・抑制性ニューロンを別々に高い純度で分化誘導できる。先に分化誘導した iPS ニューロンを

一定期間培養し、その上に M1/M2 に誘導したマクロファージを加え共培養し、神経細胞に与える影響を調べる。

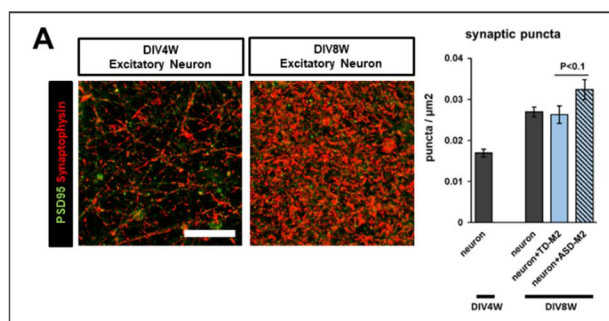
(3) 神経細胞への影響の解析：

培養神経細胞におけるシナプス形成については、免疫細胞染色法、qRT-PCR 法、ウェスタンブロット法にて解析する。さらに電気生理学的解析を行い、機能的変化も調べる。シナプス形成に關与する栄養因子・補体関連因子・受容体 (BDNF, C1q, C3, C3R など)、炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF-、IL-17A)、抗炎症性サイトカイン (IL-10、IL-4、TGF-) の発現を qRT-PCR 法、ELISA 法等で測定し、M1/M2 マクロファージが与える影響を群間で比較する。差が認められた遺伝子についてはゲノム解析も行う。これらから得られた細胞の表現型を指標にして、治療効果のある薬剤を培養系で検索する。

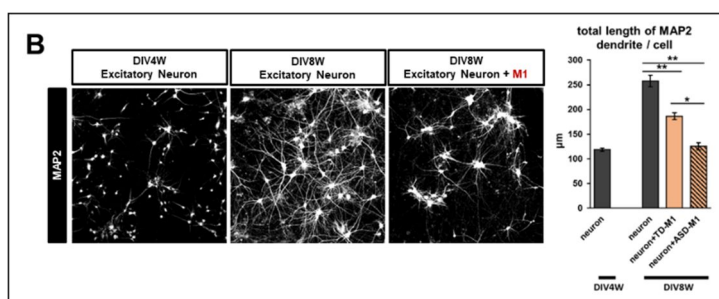
4. 研究成果

患者群としてまず ASD 患者、および健常対象者それぞれ 5 名の研究参加を得た。解析の終了した各群 3 名の結果を示す。iPS ニューロンは 2 名の健常者由来 iPS 細胞株を 1 株ずつ用い、興奮性ニューロンを用いた。

神経細胞のシナプス形成については、組織修復型の M2 マイクログリアが促進することが知られているが、健常者由来 M2 マクロファージと神経細胞の共培養では、神経細胞単体の培養と比較して有意なシナプス形成の増加を認めなかった。一方、ASD 患者由来 M2 マクロファージとの共培養では、統計学的には傾向にとどまるが、シナプス形成の増加を認めた(図 A)。仮説で想定したほどの顕著な差は認められなかったが、今後、解析サンプル数を増やして検証したい。群間で違いを認める要因としては、シナプス形成を促進する効果のある神経栄養因子 (BDNF など) の産生や、不要なシナプスを刈り取るマクロファージの貪食能が異なっていることが考えられるため、これらも検討中である。



次に、M1 マクロファージの影響を調べた。培養中の神経細胞は、培養期間に従って MAP2 陽性樹状突起の伸長が認められるが、M1 マクロファージとの共培養ではこの樹状突起の伸長が減退する。さらに、この減退効果が健常者に比べ ASD 患者群で強く、MAP2 陽性樹状突起が有意に短いという結果になった(図 B)。この事象には、古屋敷らが Social defeat モデルのマウスで示した様に (Neuron 2018)、マクロファージが産生するサイトカインが影響していると考えられ、その同定を進めている。



今後は解析症例数を増やして上記結果の検討を進める。対象者は、詳細な臨床所見や画像データが既に取得できており、それらと細胞病理の所見との相関も解析する。統合失調症群にまでは手が回らなかったが、ASD の病態解明に向けて有用な知見を見出したい。

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 0件）

1. 著者名 Toritsuka M, Yoshino H, Makinodan M, Ikawa D, Kimoto S, Yamamuro K, Okamura K, Akamatsu W, Okada Y, Matsumoto T, Hashimoto K, Ogawa Y, Saito Y, Watanabe K, Aoki C, Takada R, Fukami S, Hamano-Iwasa K, Okano H, Kishimoto T.	4. 巻 150
2. 論文標題 Developmental dysregulation of excitatory-to-inhibitory GABA-polarity switch may underlie schizophrenia pathology: A monozygotic-twin discordant case analysis in human iPS cell-derived neurons.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuint.2021.105179.	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鳥塚通弘
2. 発表標題 ヒト細胞リソースを用いた精神疾患研究
3. 学会等名 NPBPPP2020合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥塚通弘
2. 発表標題 精神科医が実践する ウェットな精神医学研究アプローチ
3. 学会等名 NPBPPP2020合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥塚通弘
2. 発表標題 ヒト細胞リソースを用いた精神疾患研究
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 鳥塚通弘
2. 発表標題 ヒト細胞リソースを用いた精神疾患研究
3. 学会等名 第42回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2021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	芳野 浩樹 (Yoshino Hiroki) (10347560)	奈良県立医科大学・医学部・研究員 (24601)	

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