

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16672

研究課題名（和文）細胞内カルシウム動態に着目した双極性障害病態モデルiPS細胞の作成

研究課題名（英文）Bipolar disorder iPS cell model focused on intracellular calcium dynamics

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）：双極性障害の病態研究を目的として、双極性障害の多発する家族の患者からiPS細胞を作成し、培養室で神経細胞に分化させた。細胞内カルシウムイオン濃度をイメージングする手法を行った結果、双極性障害患者由来の神経細胞は健康者に比べて神経活動の頻度が亢進していた。今回は技術的な問題や新型コロナウイルス感染症の影響が重なり、研究期間内に神経活動の長期間の解析ができなかったが、今後は電気的な手法での解析も組みあわせ、双極性障害患者由来の神経細胞の神経活動の詳細を明らかにしていく。また双極性障害iPS細胞をリソースとして共同研究に活用できるよう、国際誌に公開した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

双極性障害の原因や病態生理はほぼ不明で、病態解明や治療薬開発の手がかりとなるツールも乏しい。そこでiPS細胞を培養室で神経細胞などの脳を構成する細胞に分化させ、患者の生きた細胞による病態研究が期待されている。しかし、双極性障害患者のiPS細胞由来神経細胞がどのような異常を示すかはまだよくわかっていない。本研究では、双極性障害の患者から作成した神経細胞は健康者に比べて神経活動の頻度の亢進を示した。この細胞は双極性障害の貴重な細胞モデルとして、将来的に病態研究や治療薬開発に貢献する可能性がある。本研究は双極性障害病態研究の基盤形成の一段階として、大きな意義をもつ。

研究成果の概要（英文）：To clarify the pathophysiology of bipolar disorder, iPS cells were generated from patients from families with multiple bipolar disorders and differentiated into neurons in vitro. Calcium imaging demonstrated that the frequency of neuronal activity was increased in neurons derived from bipolar disorder patients compared to healthy controls. Due to technical problems and the effects of the COVID-19, long-term analysis was unable to complete in the research period. In the future, we will apply electrical techniques as well as calcium imaging to elucidate in detail the neuronal activity in neurons derived from bipolar disorder patients. In addition, bipolar disorder iPS cells were published in an international journal as a resource for future collaboration.

研究分野：精神医学、細胞生物学、神経科学

キーワード：双極性障害 iPS細胞 うつ病 病態生理 カルシウムイメージング リプログラミング 疾患モデル 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

双極性障害（そううつ病）は人口の1~4%が罹患する精神疾患であるが、原因や病態生理はほぼ不明であり、本質的な治療法は未だない。疫学研究から双極性障害に遺伝要因の関与が大きいことがわかっているが、単一遺伝子疾患ではなく、原因遺伝子はみつかっておらず、多数の遺伝変異に環境要因が発症に絡み合う複雑疾患と考えられている。特定の遺伝子のノックアウトマウスによる動物モデルアプローチは確立されておらず、また患者の死後脳による研究もされているが、死後であることから得られる情報は限定されている。したがって病態解明や治療薬開発の手がかりとなるツールが乏しい状況にある。そこで研究を補完するアプローチとして、患者由来 iPS 細胞が期待されている。iPS 細胞は培養室で神経細胞やグリア細胞などの脳を構成する細胞に誘導させ、生きた状態で解析することができるため、患者由来 iPS 細胞を用いれば、患者のゲノムをもつ細胞による病態研究が実現できる。

しかし、双極性障害 iPS 細胞研究において細胞表現型は未だ確定していない。先駆的な研究として Merten らは双極性障害患者の iPS 細胞から分化誘導した神経細胞で電気生理学的解析を行い、健常者に比べ神経細胞が興奮しやすく自発性活動電位が多いことを発表した (Merten ら, Nature, 2015)。その後、同研究グループは同様の結果を再現し (Stern ら, Mol Psychiatry, 2018; Santos ら, Mol Psychiatry, 2021)、現在電気的な易興奮性は双極性障害の細胞表現型の一つと考えられている。しかしながら、Merten らは神経細胞を長期培養した条件では逆に神経細胞の興奮性の低下を報告しており、最近の他研究グループによる研究も双極性障害 iPS 細胞由来大脳皮質スフェロイドの長期培養条件では神経興奮性が低かった (Osete ら, Mol Psychiatry 2023)。そこで本研究では双極性障害患者由来の神経細胞は成熟度や培養条件により興奮性が変化する可能性を考えた。実際、双極性障害患者は臨床的に、躁うつ病の周期性や、セロトニン系抗うつ薬による躁の誘発性という特徴を示す。したがって、双極性障害患者由来神経細胞の神経活動の継時的な変化に注目すれば、健常者に見られない興奮性の異常が見出される可能性を考えた。

2. 研究の目的

双極性障害患者 iPS 細胞由来神経細胞の細胞表現型を明らかにするため、(1) 細胞内 Ca^{2+} イメージングにより双極性障害 iPS 細胞由来神経細胞の自発発火頻度を検討すること (2) 長期培養による自発発火頻度の継時変化やセロトニンなどの神経伝達物質への反応性を検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 双極性障害・反復性うつ病多発家系由来 iPS 細胞の使用

双極性障害は遺伝的異質性が高く、これまでの孤発例を用いた iPS 研究では分子病態の特定が困難と考えた。そこで、我々は強い遺伝要因を共有する多発家系患者に注目し、沖縄県での調査から双極性障害と反復性うつ病の多発家系を見出した (Takamatsu ら, J Affect Disord, 2022)。再現性のある明瞭な細胞表現型の観察を期待し、本研究では多発家系内患者 3 名の iPS 細胞を使用した。コントロールに家系外健常者 3 名の iPS 細胞を用いた。体細胞から iPS 細胞へのリプログラミング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、研究代表者の研究室で培養と品質管理を行なった。本研究はヒト試料・情報を対象と

する研究であり「ヘルシンキ宣言」、および我が国の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、琉球大学の人を対象とする生命科学・医学系研究倫理審査委員会の承認を得て、インフォームドコンセントを得るための説明は、文書を用いて口頭で適切かつ十分に行い、署名により研究協力の同意を受けた。

(2) Ngn2 レンチウイルスベクターと低分子化合物を用いた神経細胞へのリプログラミング

先行研究(Zhang ら, Neuron, 2013; Nehme ら, Cell Rep, 2018)を基に、レンチウイルスベクターを用いた Ngn2 遺伝子の導入と低分子化合物 (SB4531542, LDN193189, XAV939)による dual SMAD と WNT の阻害を行い、ヒト iPS 細胞を神経細胞にリプログラミングする条件を検討した。

(3) 神経細胞の細胞内 Ca²⁺イメージング (Ca²⁺指示薬 Fluo4-AM の添加/Ca²⁺指示蛋白質 JGCaMP7 恒常的発現 iPS 細胞の作成)

はじめに Ca²⁺指示薬 Fluo4-AM を用いて、培養 29 日～30 日目の双極性障害 iPS 細胞由来神経細胞の自発的神経活動を解析した。続いて、長期培養しながら自発的神経活動をモニターする Ca²⁺指示蛋白質 JGCaMP7 恒常的発現 iPS 細胞を作成するため、JGCaMP7 をベクターに搭載し CRISPR/Cas9 を用いてヒト iPS 細胞ゲノムの AAVS 座位に JGCaMP7 を挿入する実験を行なった。

4. 研究成果

(1) 双極性障害・反復性うつ病多発家系由来 iPS 細胞の樹立

双極性障害・反復性うつ病多発家系の患者の iPS 細胞を樹立し、染色体検査、免疫染色、リアルタイム PCR などにより未分化性と三胚葉分化能を確認した。家系内患者 3 名から 1 名あたり 2 ラインの iPS 細胞の品質チェックを行い、すぐに使える状態で凍結保存した。貴重な双極性障害家系由来 iPS 細胞のリソースとして学術誌に投稿し公開した (図 1) (Takamatsu ら, Stem Cell Res, 2022)。

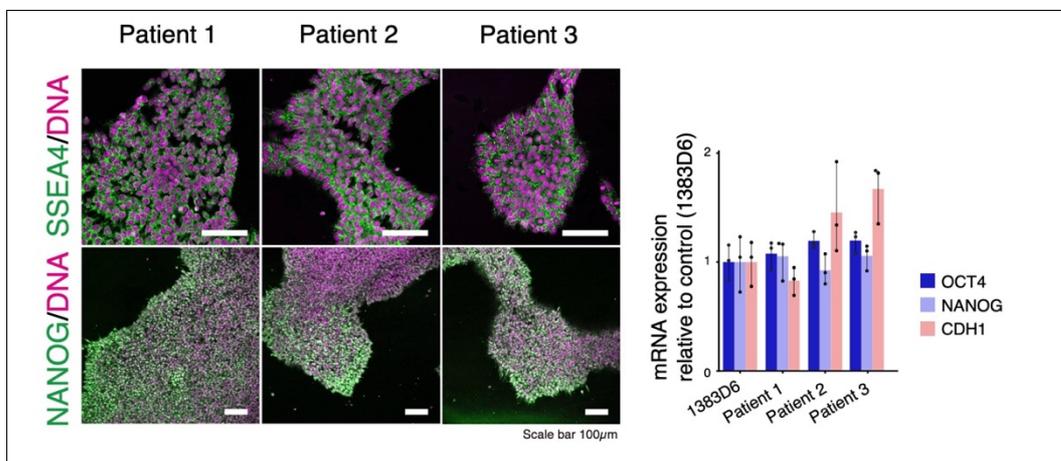


図 1 双極性障害・反復性うつ病多発家系の患者 3 名の iPS 細胞 (Takamatsu ら, Stem Cell Res, 2022 より改編)

(2) 神経細胞へのリプログラミング方法の確立

Ngn2 レンチウイルスベクターと低分子化合物を用いた方法を繰り返し検討し、最終的に iPS 細胞から神経細胞を安定して作成できる方法に至った。培養 30 日目に Fluo-4AM による Ca²⁺イメージングで神経細胞の同期的神経活動を観察できた。免疫細胞染色で樹状突起とシナプスを見ることができた (図 2)。またリアルタイム PCR で NMDA 型グルタミン酸受容体やセロトニン受容体の発現が確認され、神経伝達物質への反応性の検証に利用できると思われた。

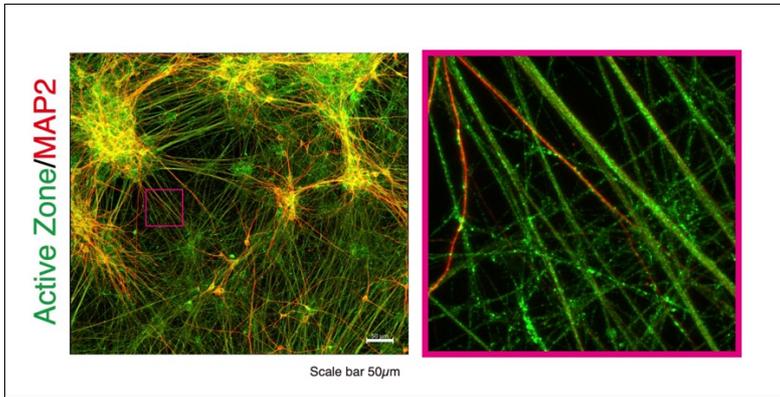


図2 作成した神経細胞の形態(撮影:沖縄科学技術大学院大学イメージングセクション甲本真也博士との共同研究)

(3) 双極性障害・反復性うつ病多発家系患者由来神経細胞の Ca^{2+} イメージング

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 CO_2 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3)。

(この内容は研究代表者の若手研究 課題番号 18K15521 と重複して行なった。)

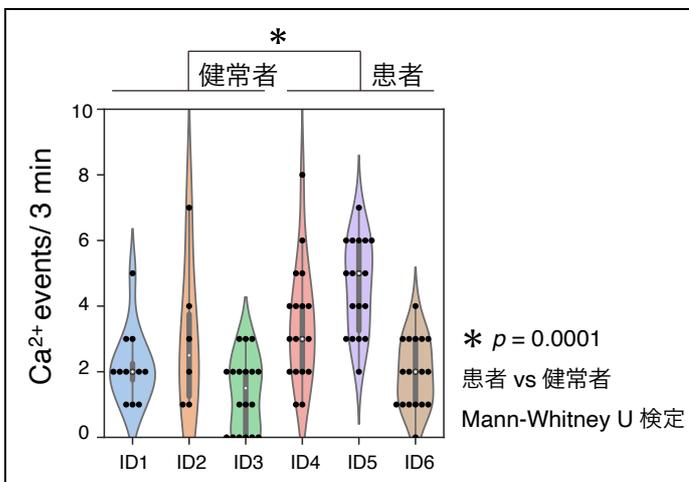


図3 自発神経活動下におけるカルシウムスパイクの頻度

Fluo4-AM による培養 29 日～30 日目の Ca^{2+} イメージングで双極性障害と健常者の神経細胞に違いが見られたため、続いて長期培養をしながら経時的にイメージングする実験に進んだ。ヒト iPS 細胞への JGCaMP7 をノックインするため、CRISPR/Cas9 でヒトゲノム AAVS1 座位に JGCaMP7 を挿入するドナーベクターを構築した。続いて、AAVS1 座位 gRNA と Cas9 の発現ベクター、および JGCaMP7 のドナーベクターをヒト iPS 細胞にエレクトロポレーションでコトランスフェクションしたが、導入効率が低く、研究期間内に JGCaMP7 をノックインしたクローンを作成できなかった。予備実験で EGFP のノックインは成功しており、本実験のインサート長が長かったことと、使用したエレクトロポレーション機器が旧式であったことが原因と考察した。また新型コロナウイルス感染症の影響で研究活動が縮小し、計画通りに進展できなかった。

本研究の成果をまとめると、(1)稀な双極性障害・反復性うつ病多発家系由来 iPS 細胞を樹立し、すぐに使用できる状態に整備した。(2) Ngn2 レンチウイルスベクターと低分子化合物を用いた神経細胞リプログラミングを確立した。(3)培養 29~30 日目の Ca^{2+} イメージングで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。これらから強い遺伝的要因の共有が想定される多発家系患者の iPS 細胞が明瞭な細胞表現型を示す可能性が示された。遺伝的異質性が高い双極性障害において、本研究の家系由来 iPS 細胞は分子病態の特定に向けた有用なリソースになるかもしれない。

今後は、ベクター構造の修正と新しい機器の借用などにより課題を解決し、双極性障害 iPS 細胞に jGCaMP7 をロックインする。その後は神経細胞分化誘導を行い、長期培養下で Ca^{2+} イメージングを行う。一方、研究期間中にも、培養しながらの神経活動のモニターは多電極アレイが一般的になりつつあり、経時的な観察を目的とするなら今後は多電極アレイの使用を行いたい。多電極アレイは高額で国内では使用できる研究施設が少なく、研究代表者の環境にはない。しかし本研究の Ca^{2+} イメージングは有望な結果を示しており、これをもとに多電極アレイを使用する施設と共同研究を進めたい。ただ本研究の目指した jGCaMP7 を用いた手法は G タンパク質共役型受容体などを介した細胞内 Ca^{2+} シグナリングを標的とするなどの電気活動以外の利点も多く、今後も作成をすすめる。

参考文献

- Mertens, J., et al., Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature*, 2015. 527(7576): 95-9.
- Nehme, R., et al., Combining NGN2 Programming with Developmental Patterning Generates Human Excitatory Neurons with NMDAR-Mediated Synaptic Transmission. *Cell Rep*, 2018. 23(8): 2509-2523.
- Osete, J.R., et al., Transcriptional and functional effects of lithium in bipolar disorder iPSC-derived cortical spheroids. *Mol Psychiatry*, 2023.
- Santos, R., et al., Deficient LEF1 expression is associated with lithium resistance and hyperexcitability in neurons derived from bipolar disorder patients. *Mol Psychiatry*, 2021. 26(6): 2440-2456.
- Stern, S., et al., Neurons derived from patients with bipolar disorder divide into intrinsically different sub-populations of neurons, predicting the patients' responsiveness to lithium. *Mol Psychiatry*, 2018. 23(6): 1453-1465.
- 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*, 2022. 310: 96-105.
- Takamatsu, G., et al., Generation of four iPSC lines from a family harboring a 1p36-35 haplotype linked with bipolar disorder and recurrent depressive disorder: Three-generation patients and a healthy sibling. *Stem Cell Res*, 2022. 64: 102915.

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 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 -

1. 著者名 Takamatsu Gakuya, Manome Yoko, Lee Jun-Seok, Toyama Kanako, Hayakawa Tomoko, Hara-Miyauchi Chikako, Hasegawa-Ogawa Minami, Katagiri Chiaki, Kondo Tsuyoshi, James Okano Hiroataka, Matsushita Masayuki	4. 巻 64
2. 論文標題 Generation of four iPSC lines from a family harboring a 1p36-35 haplotype linked with bipolar disorder and recurrent depressive disorder: Three-generation patients and a healthy sibling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102915 ~ 102915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2022.102915	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高松岳矢、馬目陽子、Dimitar Dimitrov、當山奏子、李俊錫、早川朋子、長谷川実奈美、柳久美子、小金淵佳江、要匡、木村亮介、高橋智幸、近藤毅、岡野ジェイムス洋尚、松下正之
2. 発表標題 双極性障害患者由来神経細胞のin vitro カルシウムイメージング
3. 学会等名 第43回沖縄精神神経学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高松岳矢、馬目陽子、ディミトロフディミタ、小金淵佳江、當山奏子、李俊錫、柳久美子、長谷川実奈美、早川朋子、近藤毅、高橋智幸、要匡、岡野ジェイムス洋尚、木村亮介、松下正之
2. 発表標題 双極性障害家系iPSニューロンの表現型と原因変異の探索
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高松岳矢、馬目陽子、小金淵佳江、Dimitar Dimitrov、當山奏子、李俊錫、柳久美子、長谷川実奈美、早川朋子、近藤毅、高橋智幸、要匡、岡野ジェイムス洋尚、木村亮介、松下正之
2. 発表標題 双極性障害家系iPSニューロンの表現型と原因変異の探索
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高松岳矢、馬目陽子、柳久美子、小金淵佳江、當山奏子、李俊錫、Dimitar Dimitrov、早川朋子、長谷川実奈美、高橋智幸、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 From families to candidate genes in psychiatry: Down-regulation of a mitochondrial gene in a bipolar disorder pedigree
3. 学会等名 BPCNP4学会合同年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高松岳矢、馬目陽子、柳久美子、小金淵佳江、當山奏子、李俊錫、長谷川実奈美、服部功太郎、功刀浩、近藤毅、岡野ジェイムス洋尚、木村亮介、要匡、松下正之
2. 発表標題 双極性障害の病態メカニズムの探索：ハプロタイプフェージングとRNAシーケンスによるミトコンドリア代謝制御遺伝子Xの発現異常の発見
3. 学会等名 第72回西日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高松岳矢, 馬目陽子, 柳久美子, 小金淵佳江, 當山奏子, 李俊錫, 長谷川実奈美, 服部功太郎, 功刀浩, 近藤毅, 岡野ジェイムス洋尚, 木村亮介, 要匡, 松下正之
2. 発表標題 双極性障害家系ハプロタイプにおけるミトコンドリア代謝制御遺伝子Xの発現低下
3. 学会等名 第48回日本脳科学会(招待講演)
4. 発表年 2021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, Dimitar Dimitrov, 長谷川実奈美, 早川朋子, 服部功太郎, 功刀浩, 近藤毅, 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 Down-regulation of a mitochondrial gene in the affected haplotype of bipolar disorder family: Allele-specific expression analysis using iPSC-derived neurons
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/CJK第1回国際会議
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
---------------------------	-----------------------	----

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