

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：24601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791349
 研究課題名（和文） 人工多能性幹細胞（iPS細胞）を用いた培養系精神疾患モデルの確立
 研究課題名（英文） Establishment of in vitro research system for psychiatric disorders by using the iPS cell technology.
 研究代表者
 鳥塚 通弘（TORITSUKA MICHIIHIRO）
 奈良県立医科大学・医学部・助教
 研究者番号：20588529

研究成果の概要（和文）：本研究に対して同意能力がある統合失調症患者11名、および本研究の趣旨に賛同する健常対照者12名から参加の同意を得た。同意を得た全例の上腕内側部から皮膚生検を行い、皮膚線維芽細胞を培養し、保存した。このうち4名の線維芽細胞にエピソームプラスミドベクターを用いた方法でiPS細胞を樹立し、保存した。そのうち、患者・健常者各1名のサンプルを用いて解析した。iPS細胞の多能性細胞マーカーの発現や、神経幹細胞への分化誘導性に差は認めなかった。いずれのサンプルから誘導したニューロンも、数カ月の培養の後に電気生理学的解析を行うと、活動電位を連発する成熟したニューロンが得られた。

研究成果の概要（英文）：Eleven schizophrenia patients and 12 control subjects assented to this research project. The skin biopsy samples were obtained from upper arms, then human dermal fibroblast were cultured, expanded and stocked. Induced pluripotent stem cell lines were established from 4 of these samples by using the episomal plasmid vector system. The cell lines from one patient and one control subject were used for analysis. There was no difference between patient and control subject's iPS cell in expression pattern of stem cell markers and induction property of neural stem cell. Induced neurons from both patient and control subject generated multiple action potentials after a few months culture by electrophysiological analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：統合失調症、iPS細胞、抗精神病薬、細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

精神疾患は社会的に認知されているよりも生涯有病率が高く、発症後慢性に経過する疾患も多いため長期にわたって社会生活に支障をきたす。そのため、患者やその家族に

にとって多大な苦痛を伴うだけでなく、広範囲にわたる経済的損失によって全疾患中最大の社会的・経済的コストを要する。WHO（World Health Organization）の統計でも、

癌、循環器疾患と並んで社会的影響の大きい疾患として指摘されている。

主要な精神疾患の中でも、慢性的な経過をたどり、重篤な機能障害を引き起こす疾患に統合失調症がある。統合失調症は人口の約1%を占め、臨床的には幻覚・妄想などの陽性症状、自閉・無為といった陰性症状と認知機能障害によって特徴づけられる。その病因・病態については、疫学研究、遺伝学研究、死後脳研究や画像研究、動物モデルを用いた研究など幅広く行われているが、未だその解明には至っておらず、根治的な治療法の開発に向けた端緒も開けていないのが現状である。これまでのところ、複数の脆弱性遺伝子が複合的に作用して遺伝的基盤を形成し、環境要因とも相互作用しながら発病に至ると考えられている。死後脳研究からは、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の神経変性疾患で観察されるような顕著かつ特異的な病理学的所見は見出されておらず、より微細なレベルでの変化が病因と考えられているが、それらの所見が果たして本当に病因なのか、長期に渡る疾病経過・治療による変化なのかはわかっていない。このため、疾患モデルとして培養系モデルが有用と考えられるが、脳から検体を直接採取しての培養は倫理的観点から現実には不可能であり、低侵襲の培養系が必要である。

2006年に山中らが、成熟分化したマウスの体細胞を胚性幹細胞 (Embryonic Stem cell : ES細胞) と同等の未分化細胞にリプログラミングする iPS細胞 (induced Pluripotent Stem cell) の技術を発表した (Takahashi K. & Yamanaka S., Cell 126, 663-676, 2006)。翌年には同様の手法がヒトにおいても確立され (Takahashi K. et al., Cell 131, 861-872, 2007)、これまで不可能と考えられてきた自己由来の細胞による再生医療が現

実味をおびることとなった。加えて、同技術の応用により、前述の通り生検を行うことがほぼ不可能であった精神・神経疾患患者由来の神経細胞を作成することが原理的に可能となり、また神経細胞の分化発達・変性に重要な働きをする神経膠細胞への分化誘導も可能となった。

よって申請者はこの技術を応用し、健常者と統合失調症患者の生化学的・細胞生物学的な差異を解析することによりこの疾患の病態生理の解明に迫りたいと考えた。

2. 研究の目的

研究期間内の第1の目的として、誘導した神経系細胞を健常者由来のものと比較することによって、この疾患発症に至る生化学的・細胞生物学的基盤を解明する。第2の目的として、誘導した神経系細胞を用いた抗精神病薬の評価系を確立する。すでに予備的知見として、一部の抗精神病薬がマウスオリゴデンドロサイト前駆細胞での増殖や生存に影響を与えることを見出しているが、これをヒト細胞で行う。

3. 研究の方法

(1) 対象

奈良県立医科大学精神科に通院、入院中の統合失調症患者で、本研究に同意能力があり本研究に同意した患者、および本研究の趣旨に賛同する健常対照者を対象とする。

(2) 皮膚採取、iPS細胞樹立

精神科外来、或いは精神科病棟にて対象者の上腕内側部等より直径3mm程度のパンチバイオプシーを行う。得られた皮膚から線維芽細胞を培養し、保存する。線維芽細胞に、エピソーマルベクターを用いた方法 (Okita K.

et al., Nature Method 8(5): 409-12, 2011) で初期化因子を導入し、iPS 細胞を樹立する。一人当たり、数十の iPS 細胞株を作成し、保存する。

(3) 分化誘導

樹立した iPS 細胞株のうち、導入したプラスミド由来の外来遺伝子が残存していない株を qPCR で確認し、使用する。iPS 細胞を浮遊培養し、胚様体 (Embryoid Body) を形成させる。胚様体を砕いて神経幹細胞用の培地で浮遊培養し、神経幹細胞 (ニューロスフェア) を得る。成熟した神経幹細胞を砕いて接着培養し、神経細胞・グリア細胞を分化誘導する。

(4) 解析

①分化誘導した神経細胞・グリア細胞の組織学的な相違を患者及び健常者で比較する。また、それらの結果を死後脳解析による既報 (Hashimoto T. et al., Mol Psychiatry 13, 147-161, 2008 など) と比較検討する。分化解析は、western blot、realtime RT-PCR 及び免疫染色にて行う。

②分化誘導した神経細胞の機能について、パッチクランプ法を用いた電気生理学的手法により解析する。

③分化誘導した神経細胞・グリア細胞から mRNA を抽出し、マイクロアレイによって遺伝子発現の違いを調べる。

4. 研究成果

11 名の統合失調症患者および 12 名の健常対照者から、研究参加の同意を得た。同意を得た全例の上腕内側部からパンチバイオプシーを行ったが、特に合併症は生じなかった。得られた皮膚から皮膚線維芽細胞を培養し、

保存した。このうち 4 名の線維芽細胞を基に、上述の方法で iPS 細胞株を樹立し、保存した。作成した iPS 細胞のうち、患者・健常者各 1 名のサンプルを用いて、以後の解析を行った。各サンプルのプラスミドベクター由来遺伝子の発現量は図 1 の通りである。いずれにおいても、外来遺伝子の残存株は少数であった。

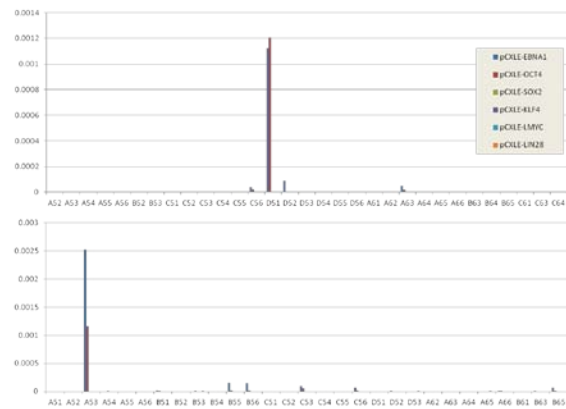


図 1: qPCR によるプラスミドベクターの残存確認
上段: 健常者、下段: 患者の各 iPS 細胞株 縦軸: 発現量、横軸: 株名

また、iPS 細胞の多能性細胞マーカーの発現を免疫染色で確認した (図 2)。患者・健常者間で差は認めなかった。

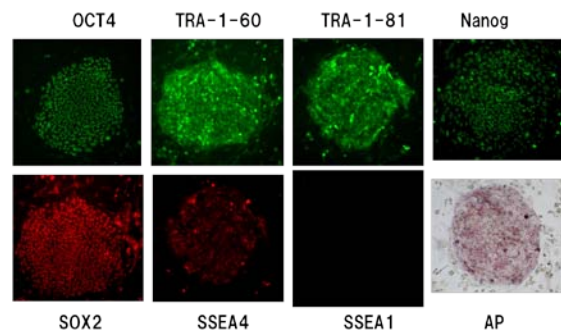


図 2: 免疫染色: 多能性細胞マーカー

次に、神経細胞への分化誘導を行った。神経幹細胞への分化誘導性に差は認めなかった。免疫染色を行うと、ヒト細胞核、神経幹細胞マーカーの発現が確認できた。誘導後 2-3 カ月培養すると、成熟ニューロンのマーカーである MAP2 の発現も確認できた (図 3)。

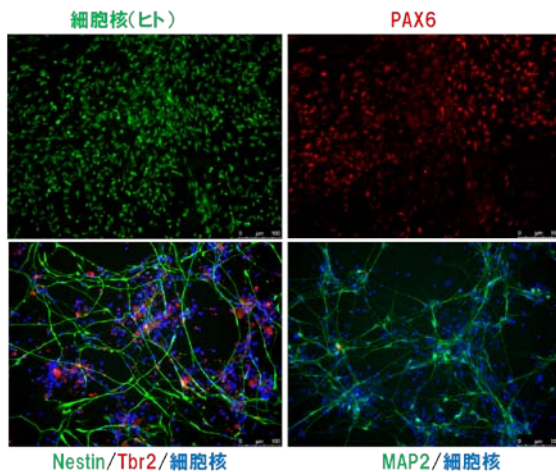


図3:免疫染色;神経幹細胞・神経細胞マーカー

さらに、これら分化誘導したニューロンの電気活動を、パッチクランプ法を用いて行った(図4)。

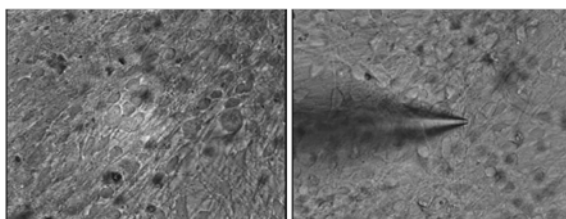


図4:パッチクランプ法

いずれのサンプルから誘導したニューロンも、培養1ヵ月では current-clamp でほぼ単発の活動電位を示し、シナプス形成の指標となる spontaneous post-synaptic current (自発性シナプス後電流) は認められなかった(図5)。

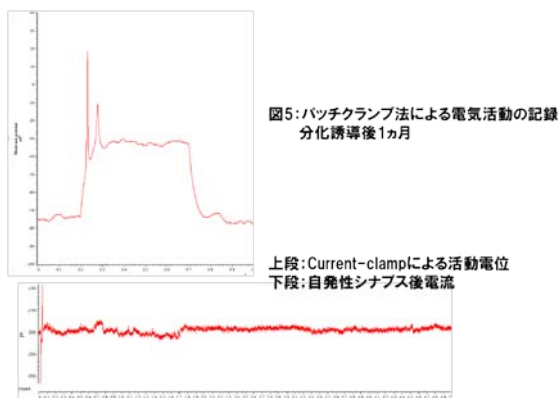


図5:パッチクランプ法による電気活動の記録
分化誘導後1ヵ月

上段: Current-clampによる活動電位
下段:自発性シナプス後電流

培養3ヵ月が経過するとニューロンは成熟した様相を呈し、current-clamp では連発する活動電位を示し、spontaneous post-synaptic current (自発性シナプス後電流) は興奮性・抑制性ニューロンの両者の入力を受けていると考えられる電流を示した(図6)。

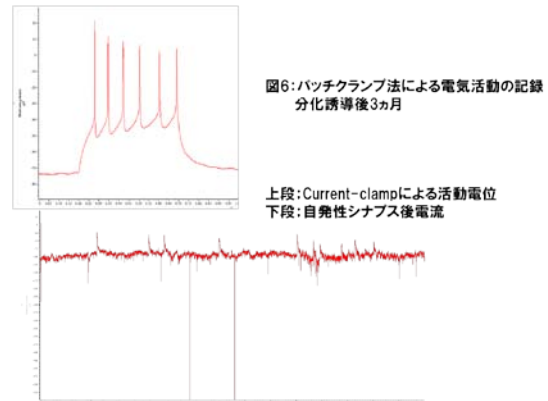


図6:パッチクランプ法による電気活動の記録
分化誘導後3ヵ月

上段: Current-clampによる活動電位
下段:自発性シナプス後電流

これまでの研究成果からは、患者・健常者間の差異を見出す指標はまだ得られていないが、今後さらに詳細な解析を加えて行きたいと考える。iPS細胞を用いた統合失調症研究は、国内・国外を併せても未だ数えるほどの報告にとどまっており、今後の研究の進展が期待されているところであるため、我々も邁進していきたい。

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)
無し。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥塚 通弘 (TORITSUKA MICHHIRO)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 20588529