

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650192

研究課題名(和文)人工多能性幹(iPS)細胞を用いた注意欠陥・多動性障害の生物モデルの構築

研究課題名(英文)Generation of biological models with AD / HD patients induced iPS cells

研究代表者

曾良 一郎(Sora, Ichiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40322713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：AD/HD患者から人工多能性幹細胞(iPS細胞)を作成するにあたり、適切な基準による患者の選定が重要となる。対象にはDSM-IVのAD/HD診断基準に合致し、併存障害が合併していない小児期あるいは成人期の患者とした。特に自閉症スペクトラム症候群との併存については、注意深く対象患者を選定した。健常人およびAD/HD患者からiPS細胞の作成を行った。AD/HDでのドーパミン神経系は腹側被蓋野から側座核や前頭葉皮質に投射する中脳皮質辺縁系が重要な役割を果たしていると考えられている。iPS細胞からの中脳皮質辺縁系と黒質線条体系ドーパミン神経を区別して分化誘導について取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：To generate Attention Deficit Hyperactivity Disorder (AD / HD) patients induced pluripotent stem cells (iPS cells), the selection of patients with appropriate diagnostic criteria are important. Diagnostic criteria of DSM-IV was used for AD / HD without comorbid disorders. Such as autism spectrum syndrome were carefully excluded for the subjects. We generated iPS cells from healthy individuals and AD / HD patients. Dopaminergic nervous system in the AD / HD which is considered to midbrain cortical limbic system that projects from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens and frontal cortex plays an important role. We have studied on the differentiation to distinguish the midbrain limbic dopaminergic neurons and the nigrostriatal dopaminergic ones induced from the iPS cells.

研究分野：精神医学

キーワード：モノアミン ドーパミン メチルフェニデート

1. 研究開始当初の背景

注意欠陥・多動性障害 (Attention Deficit Hyperactivity Disorder, AD/HD) は多動性、不注意、衝動性を症状の特徴とする発達障害の一つである。学童期での有病率は 3-7% と高率であり、教室での不適応の進行により治療・支援が必要となることが多い(齊藤・ADHD の診断・治療ガイドライン 2010)。AD/HD の主症状は幼児期から顕在化し、成人に達しても半数以上で診断基準を満たす症状を持ち続けている。AD/HD 患者には様々な併存障害があるため、その疾患概念や診断基準が不明確となっている。そのため AD/HD に特化した生物学的マーカーの開発が必要とされてきた。また、AD/HD は一卵性双生児間で 50-70% の高い一致率を示すなど、遺伝の影響が強いと言われている。実際、病因遺伝子の候補としてドーパミントランスポーター(DAT)などモノアミン神経伝達に関わる遺伝子多型が報告されているが、これら関連遺伝子が発症・病態にどのような関与するのかなどその機序には不明な部分が多い(曾良・分子精神医学 2009)。

精神疾患の重要な研究手法として死後脳解析があるが、AD/HD 患者の死後脳が得られないことが病態研究の進展を妨げている。最近、統合失調症 (Brennan et al. Science 2011) や自閉症圏患者(Marchetto et al. Cell 2010) から得られた iPS 細胞を用いた研究が報告され、患者由来の神経細胞の発達過程が解析され、病態解明や治療への応用が期待されている。

2. 研究の目的

注意欠陥・多動性障害 (AD/HD) は主に小児の精神疾患であることから死後脳を含めて神経組織を得られないことが病態解明の大きな妨げとなっていた。本研究ではセンダイウイルスベクターを用いて AD/HD 患者の白血球より従来より高い効率で人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) を作成する。AD/HD 患者由来の iPS 細胞から分化させた神経細胞を神経化学的、精神薬理学的解析を行う。メチルフェニデートなどの AD/HD 治療薬が患者由来と健常人由来のモノアミン神経細胞への作用の違いを検討する。AD/HD 患者由来の iPS 細胞は患者特有の遺伝的背景を持った生物モデルとして AD/HD 病態の特徴を捉え、薬効や副作用の評価を行う系としても実用可能であり、病態解明、創薬への手がかりとなる可能性が期待される。

3. 研究の方法

AD/HD 患者の白血球よりセンダイウイルス (SeV) ベクターに組み込まれた人工多能性幹細胞誘導遺伝子の導入により高効率に iPS 細胞を作成する。患者由来の iPS 細胞を神経細胞に分化誘導させ、神経細胞の発達過程や治療薬反応性について解析する。

iPS 細胞から分化誘導された神経細胞の樹状突起やスパイン密度を計測して発達過程

を解析する。分化誘導されたドーパミン神経のドーパミン放出・取り込み能を測定する。さらに網羅的な遺伝子発現解析を代表的 AD/HD 治療薬 (アンフェタミン、メチルフェニデート、アトモキセチン、グアンファシン) の存在・非存在下で比較検討する。

これらの iPS 細胞から分化誘導された神経細胞の特性と AD/HD 患者の遺伝子多型解析のプロフィールを対比させ、AD/HD 病態の特徴を捉え病態解明、創薬への手がかりを得る。

4. 研究成果

AD/HD 患者から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作成するにあたり、適切な基準による患者の選定が本研究の推進には重要となる。対象には DSM-IV の AD/HD 診断基準に合致し、併存障害が合併していない小児期あるいは成人期の患者とした。特に自閉症スペクトラム症候群との併存については、注意深く対象患者を選定した

健常人および AD/HD 患者から iPS 細胞の作成を行った。AD/HD でのドーパミン神経系は腹側被蓋野から側座核や前頭葉皮質に投射する中脳皮質辺縁系が重要な役割を果たしていると考えられている。情動・認知機能と運動調節機能と異なる機能を有する中脳皮質辺縁系と黒質線条体系のドーパミン神経がどのように形成されるのかについては十分に解明されていなかったことから、iPS 細胞からの中脳皮質辺縁系と黒質線条体系ドーパミン神経を区別して分化誘導について取り組んだ。

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)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Arime Y, Kasahara Y, Hall FS, Uhl GR, Sora I. Cortico-subcortical neuromodulation involved in the amelioration of prepulse inhibition deficits in dopamine transporter knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 37(11): 2522-2530 (2012)
2. Uchiumi O, Kasahara Y, Fukui A, Hall FS, Uhl GR, Sora I. Serotonergic involvement in the amelioration of behavioral abnormalities in dopamine transporter knockout mice by nicotine. *Neuropharmacology* 64(1): 348-356 (2013) 221.
3. Hall FS, Itokawa K, Schmitt A, Moessner R, Sora I, Lesch KP, Uhl GR. Decreased vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and dopamine transporter (DAT) function in knockout mice affects aging of dopaminergic systems. *Neuropharmacology* 76 PartA:146-155 (2014)
4. Ratta-Apha W, Hishimoto A, Mouri K,

- Shiroiwa K, Sasada T, Yoshida M, Okazaki S, Supriyanto I, Asano M, Ueno Y, Shirakawa O, Sora I. Haplotype analysis of the DISC1 Ser704Cys variant in Japanese suicide completers. *Psychiatry Res* 215(1):249-251 (2014)
5. Okazaki S, Watanabe Y, Hishimoto A, Sasada T, Mouri K, Shiroiwa K, Eguchi N, Ratta-Apha W, Otsuka I, Nunokawa A, Kaneko N, Shibuya M, Someya T, Shirakawa O, Sora I. Association analysis of putative cis-acting polymorphisms of interleukin-19 gene with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 50:151-156. (2014)
 6. Kudo T, Konno K, Uchigashima M, Yanagawa Y, Sora I, Minami M, Watanabe M. Eur J Neurosci. GABAergic neurons in the ventral tegmental area receive dual GABA/enkephalin-mediated inhibitory inputs from the bed nucleus of the stria terminalis. *Eur J Neurosci* 39:1796-1809. (2014)
 7. Watanabe Y, Hishimoto A, Shibuya M, Nunokawa A, Kaneko N, Igeta H, Egawa J, Mouri K, Sora I, Someya T. A rare MIR138-2 gene variation is associated with schizophrenia in a Japanese population. *Psychiatry Res* 215(3):801-802 (2014)
 8. Sakakibara Y, Kasahara Y, Hall FS, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR, Sora I. Developmental alterations in anxiety and cognitive behavior in serotonin transporter mutant mice. *Psychopharmacology* 231(21):4119-4133 (2014)
 9. Sasaki K, Sumiyoshi A, Nonaka H, Kasahara Y, Ikeda K, Hall FS, Uhl GR, Watanabe M, Kawashima R, Sora I. Specific regions display altered grey matter volume in μ -opioid receptor knockout mice: MRI voxel-based morphometry. *Br J Pharmacol* 172(2):654-667 (2015)
 10. Yu Z, Ono C, Aiba S, Kikuchi Y, Sora I, Matsuoka H, Tomita H. Therapeutic Concentration of Lithium Stimulates Complement C3 Production in Dendritic Cells and Microglia via GSK-3 Inhibition. *Glia* 63(2):257-270 (2015)
 11. Igari M, Shen H, Hagino Y, Fukushima S, Kasahara Y, Lesch K, Murphy D, George R Uhl, Ikeda K, Yaegashi N, Sora I. Attenuated methamphetamine-induced locomotor sensitization in serotonin transporter knockout mice is restored by serotonin 1B receptor antagonist treatment. *Behav Pharmacol* 26(1-2):167-179 (2015)
 12. Kasahara Y, Arime Y, F. Scott Hall, George R. Uhl, Sora I. Region-specific dendritic spine loss of pyramidal neurons in dopamine transporter knockout mice. *Curr Mol Med* in press
 13. Takamatsu Y, Hagino Y, Sato A, Takahashi T, Yukie S, Kubo Y, Mizuguchi M, George R. Uhl, Sora I, Ikeda K. Improvement of learning and increase in dopamine level in the frontal cortex by methylphenidate in mice lacking dopamine transporter. *Curr Mol Med* in press
- [学会発表](計 4件)
1. Kubo Y, Kasahara Y, Arime Y, Hall FS, Ikeda K, Uhl GR, Sora I. Age dependent drug responses in DAT KO mice as an animal model of ADHD. The Society for Neuroscience (SfN) 40th Annual Meeting. Washington DC, USA [2011/11/16]
 2. Takamatsu Y, Kubo Y, Nagasawa SY, Uhl GR, Sora I, Ikeda K. Critical period of inhibitory effect of methylphenidate on hyperactivity in dopamine transporter knockout mice. 3rd Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology, Peking [2013/9/11-14]
 3. Kubo Y, Kasahara Y, Arime Y, Hall FS, Takamatsu Y, Ikeda K, Uhl GR, Sora I, Tomita H. Differences in responsiveness between methamphetamine, nisoxetine and methylphenidate may reflect specific developmental characteristics in juvenile DAT KO mice. The Society for Neuroscience (SfN) 43th Annual Meeting. Washington DC, USA [2014/11/15-19]
 4. Kasahara Y, Arime Y, Hall FS, Uhl GR, Tomita H, Sora I. Region-specific dendritic spine loss of pyramidal neurons in dopamine transporter knockout mice. The Society for Neuroscience (SfN) 43th Annual Meeting. Washington DC, USA [2014/11/15-19]
- [図書](計 1件)
1. Moriya Y, Hall FS, Sora I. The role of serotonin in the effects of psychostimulant drugs: Behavioral studies of addiction-and abuse-related phenotypes. In: Hall FS (ed.) *Serotonin: Biosynthesis, Regulation and Health Implications*. New York: Nova Science Publishers. 189-210 (2013)
- [産業財産権]
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

曾良 一郎 (SORA, Ichiro)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40322713

(2)研究分担者

笠原 好之 (KASAHARA, Yoshiyuki)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20511835