

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861037

研究課題名(和文)カルボニルストレスに注目した統合失調症における神経発達障害のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Effect of carbonyl stress on neural differentiation and development

研究代表者

豊島 学 (Toyoshima, Manabu)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：90582750

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)：本研究では、統合失調症の神経発達障害とカルボニルストレスとの関係を明らかにするため、カルボニルストレス性統合失調症患者由来のiPS細胞を用いて、神経分化効率の解析及び神経分化に影響を与えるAGEs(終末糖化産物)の同定を行った。解析の結果、患者由来のiPS細胞では、神経細胞の発達に関わるタンパク質のAGE化が亢進していること、ニューロスフィア(神経幹細胞の細胞塊)への分化効率が低下すること、カルボニルストレス阻害剤(ビタミンB6)を培養液に加えることで、ニューロスフィアへの分化効率が回復することが認められた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have focused on the relationship between carbonyl stress and abnormal neural differentiation and development in schizophrenic patient, examined the influence of advanced glycation end products (AGEs) on neural differentiation efficiencies by using iPS cells derived from the schizophrenia patients. Patients iPS cells showed specific AGEs compared to control iPSC. We have found that there is a specificity in proteins that preferentially react with AGEs. We differentiated iPS cells into neurospheres. Neural differentiation efficiencies were decreased in patients iPS cells. Inhibition of carbonyl stress allowed patients neurospheres to recover from decrease in neural differentiation efficiencies.

研究分野：医歯薬学

キーワード：統合失調症 カルボニルストレス 終末糖化産物 iPS細胞 神経発達 AGEs

1. 研究開始当初の背景

統合失調症の極めて有力な病因仮説として、「神経発達障害仮説」が知られている (Weinberger et al., 1987 等)。この仮説は、「胎生期～生後脳発達期にかけての神経発達障害が統合失調症の脆弱性を形成する」という説であるが、倫理的な問題からヒト由来サンプルを用いて直接的、かつ具体的にこの仮説を検証することはこれまでは不可能であった。しかし、近年開発された iPS 細胞の技術を用いることで、ヒト検体から iPS 細胞を樹立し、神経細胞を分化誘導することが可能になった。この技術を用いることにより、統合失調症患者の発達期の脳内においてどのような神経発生・発達障害が起きているか、実際に検証することが出来るようになった。既に、統合失調症患者由来 iPS 細胞を用いた解析が報告されており (Brennand et al., 2011)、統合失調症研究における iPS 細胞の有用性が証明されている。

カルボニルストレスは、生体内の糖、脂質、アミノ酸の酸化・還元、過酸化に由来する種々の反応性カルボニル化合物が非酵素的にタンパク質修飾を起こしている状態のことをいい、その結果、終末糖化産物 (Advanced Glycation End products: AGEs) が産生される (Fig. 1)。

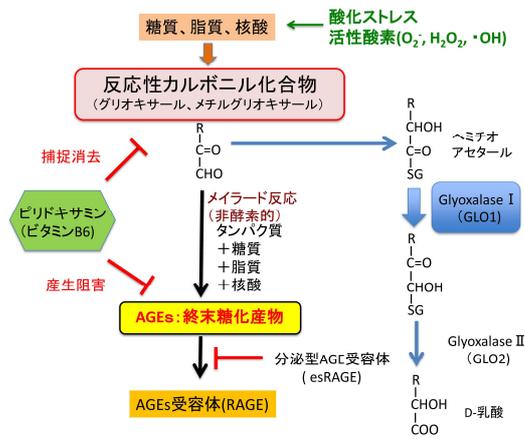


Fig. 1 カルボニルストレスの消去系

近年、およそ 2 割の統合失調症患者において、AGEs のひとつであるペントシジンの蓄積と AGEs を消去する働きをもつビタミン B6 の減少が起こっていることが報告され (Arai et al., 2010)、「カルボニルストレス性」の統合失調症という新しい統合失調症の概念が考えられるようになった。またこのカルボニルストレスには、GLO1 遺伝子 (Glyoxalase I をコードする: Glyoxalase I は、細胞にとって有毒な AGEs の前駆物質である反応性カルボニル化合物を、酵素的変換により除去する) の変異による機能低下が関連することが報告されている (Arai et al., 2010)。糖尿病などでもカルボニルストレスの亢進が見られるが、糖尿病患者において統合失調症の発症率は増加しない。しかし、糖尿病の母

体から生まれた子供(胎児期にカルボニルストレスを受けた状態)では、統合失調症の発症率が 7 倍に増加することが報告されている (Van Iliushout and Voruganti, 2007)。

2. 研究の目的

上記の背景から、カルボニルストレス性統合失調症患者における病因仮説として「胎生期から生後脳発達期にかけて、カルボニルストレスによる神経発達障害がおこり、統合失調症の発症脆弱性を形成する」との作業仮説を構築するに至った。本研究では、カルボニルストレス性統合失調症患者由来の iPS 細胞を用いて本仮説を検証し、統合失調症の神経発達障害とカルボニルストレスとの関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) iPS 細胞の培養と神経分化

本研究では、GLO1 遺伝子のフレームシフト変異 (365 番目のシトシンの欠失) により、カルボニルストレスが亢進した統合失調症患者由来の iPS 細胞 (SA001)、GLO1 遺伝子に変異を持たない統合失調症患者由来の iPS 細胞 (KO001)、健常者由来 iPS 細胞 (WD39) を用いた。患者由来 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞は、iPS 細胞用培地で培養した。iPS 細胞からの神経分化誘導は、シングルセル化した iPS 細胞を LIF、FGF2 を加えた神経幹細胞用培地で浮遊培養することで、神経分化を誘導し、Neurosphere (神経幹細胞/神経前駆細胞の凝集塊) を作製した。

(2) 抗 AGEs 抗体を用いた疾患特異的な AGEs の同定

患者由来 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞及び、分化誘導によって作製した Neurosphere に対して、抗 AGEs 抗体 (抗 AGE-1 抗体、抗 AGE-3 抗体、抗 AGE-4 抗体、抗 CML (N-ε-(Carboxymethyl) lysine) 抗体) を用いた Western blotting を行い、疾患特異的に AGE 化しているタンパク質を検出した。特異的な AGE 化タンパク質は、質量分析器及び免疫沈降法による解析により同定を行った。

(3) 神経分化におけるカルボニルストレスの影響

カルボニルストレス阻害薬を加えた培養液で、患者由来 iPS 細胞と健常者由来 iPS 細胞を 6 日間培養した後、分化誘導によって Neurosphere を作製し、分化効率と神経幹細胞マーカー (SOX1) の発現量を解析した。カルボニルストレス阻害薬としては、AGEs 形成阻害薬 (アミノグアニジン: 100 μM、ビタミン B6: 200 μM) と AGE-RAGE 阻害薬 (α-リポ酸: 100 μM) を用いた。

本研究は、理化学研究所及び研究参加施設の倫理委員会の承認を得て被験者には十分な説明と文書による同意を得て実施した。

4. 研究成果

(1) カルボニルストレス性統合失調症患者由来 iPS 細胞・Neurosphere における AGEs の変化

健常者由来 iPS 細胞(WD39)及び患者由来 iPS 細胞(SA001, KO001)を用いて *GLO1* の発現解析を行った。その結果、*GLO1* 遺伝子のフレームシフト変異を持つ患者由来 iPS 細胞(SA001)において *GLO1* 遺伝子の mRNA の発現量が半減していた(Fig.2)。

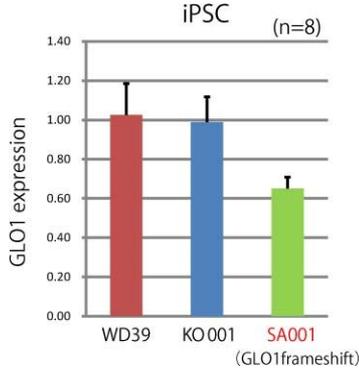


Fig. 2 *GLO1* 遺伝子の発現量

GLO1 遺伝子の発現量の低下は、フレームシフトより生じた不完全な *GLO1* の mRNA が NMD によって分解されたためと考えられる。

GLO1 遺伝子の発現量の低下はカルボニルストレスの亢進に繋がることが報告されている。そこで、iPS 細胞、Neurosphere において疾患特異的に変化する AGEs が存在するのか調べるために、AGE-1、AGE-3、AGE-4、CML に対する抗体を用いて Western blotting を行った。その結果、抗 CML 抗体による Western blotting において、*GLO1* 遺伝子のフレームシフト変異を持つ患者由来の iPS 細胞(SA001)では 55 kDa の CML 化タンパク質(Fig.3)、Neurosphere では 35 kDa の CML 化タンパク質(Fig.3)が増加していた。これらの結果から、*GLO1* 遺伝子のフレームシフト変異を持つ患者由来 iPS 細胞(SA001)では、*GLO1* 遺伝子の発現量の低下により、カルボニルストレスが亢進し、特定の CML 化タンパク質が増加すると考えられる。

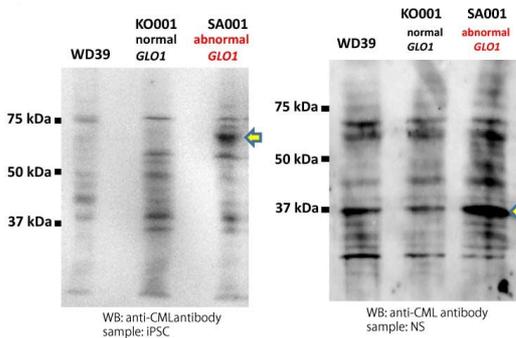


Fig. 3 CML 化タンパク質の検出

(2) カルボニルストレス性統合失調症患者由来 iPS 細胞で特異的に増加する AGE の同定

GLO1 遺伝子のフレームシフト変異を持つ患者由来 iPS 細胞(SA001)において、特異的に CML 化している 55 kDa のタンパク質について、質量分析及び免疫沈降法により同定を行った。その結果、神経細胞の突起伸長に関わるタンパク質(Protein X)であった(Fig.4)。

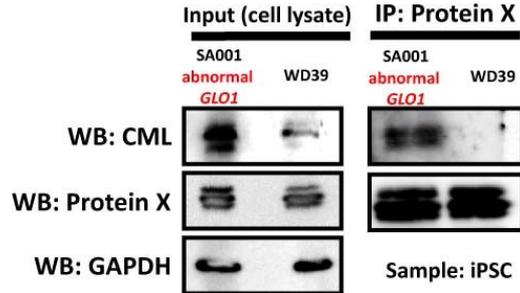


Fig. 4 免疫沈降による Protein X の同定

(3) カルボニルストレス性統合失調症患者由来 iPS 細胞における神経分化の異常

カルボニルストレスが神経分化に影響を与えるか調べるために、健常者由来 iPS 細胞(WD39)及び患者由来 iPS 細胞(SA001, KO001)から分化誘導によって Neurosphere を作製した。その結果、*GLO1* 遺伝子のフレームシフト変異を持つ患者由来 iPS 細胞(SA001)は、健常者由来 iPS 細胞(WD39)と比較して Neurosphere への分化効率が 60%低下し(Fig.5)、*SOX1* 遺伝子の mRNA の発現量が 90%低下した(Fig.6)。

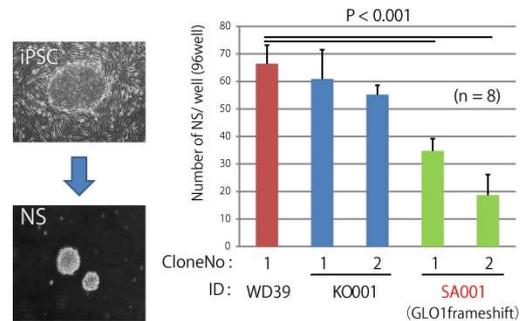


Fig. 5 iPS 細胞からの神経分化

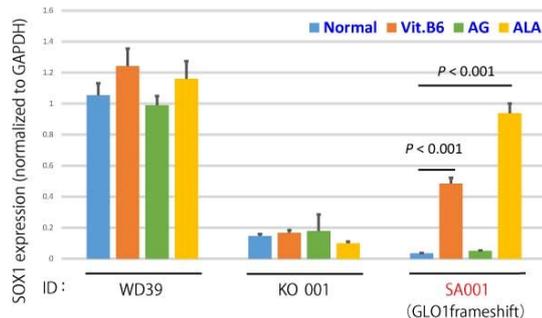


Fig. 6 *SOX1* 遺伝子の発現量

iPS 細胞の培養時にカルボニルストレス阻害剤を加え、その後 Neurosphere への分化誘導を行った。その結果、GLO1 遺伝子のフレームシフト変異を持つ患者由来 iPS 細胞 (SA001)において、ビタミン B6(ピリドキサミン)と α -リポ酸を加えた場合 SOX1 遺伝子の mRNA の発現量が大きく上昇した(Fig.6)。

更に、Neurosphere への分化効率は、ビタミン B6(ピリドキサミン)を加えた場合、1.5 倍の上昇が見られた(Fig.7)。一方、 α -リポ酸を加えた場合は、Neurosphere への分化効率に変化は無かった(Fig.8)。

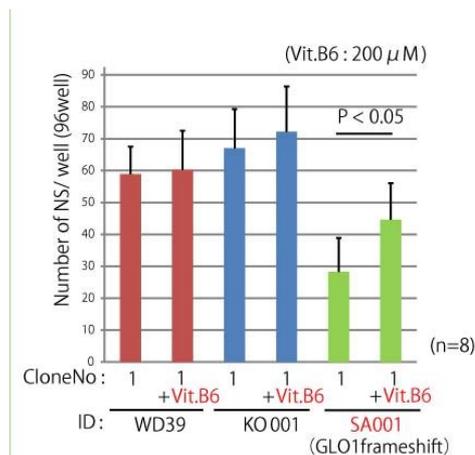


Fig. 7 ビタミン B6 添加の効果

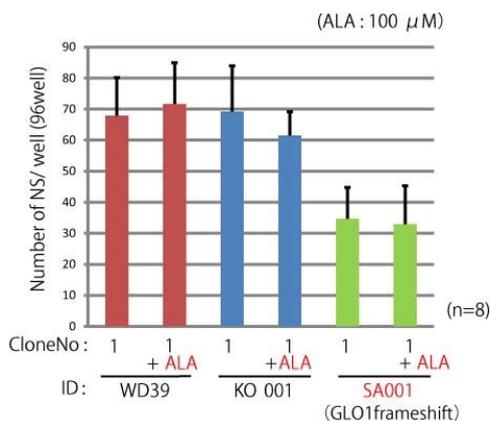


Fig. 8 α -リポ酸添加の効果

これらのことから、カルボニルストレス性統合失調症の iPS 細胞や Neurosphere においては、神経発達に関わるタンパク質が AGE 化することで機能低下し、神経幹細胞や神経前駆細胞への分化・発達に影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Balan S, Iwayama Y, Toyota T, Toyoshima M, Maekawa M, Yoshikawa T. 22q11.2 deletion carriers and schizophrenia associated novel variants. Br J Psychiatry 204: 398-399, 2014.
doi: 10.1192/bjp.bp.113.138420. 査読あり

Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T. Utility of Scalp Hair Follicles as a Novel Source of Biomarker Genes for Psychiatric Illnesses. Biological Psychiatry 3223:00570-00578, 2014.
doi:10.1016/j.biopsych.2014.07.025. 査読あり

Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, Akamatsu W, Ueda J, Nemoto-Miyauchi T, Sunaga F, Toritsuka M, Ikawa D, Kakita A, Kato M, Kasai K, Kishimoto T, Nawa H, Okano H, Yoshikawa T, Kato T, Iwamoto K. Increased I1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. Neuron 81:306-313, 2014.
doi:10.1016/j.neuron.2013.10.053. 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

豊島学、「統合失調症特殊例の神経発達・神経分化における分子病態解析」第 10 回日本統合失調症学会、2015 年 3 月 27 日-28 日、都市センターホテル(東京都・千代田区)

豊島学、「統合失調症の神経発達障害における miRNA の発現変化の影響」第 41 回日本脳科学学会、2014 年 11 月 22 日-23 日、福井県県民ホール(福井県・福井市)

豊島学、「iPS 細胞を用いた統合失調症特殊例の分子病態解析」第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会 合同シンポジウム、2014 年 11 月 20 日-22 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋)

豊島学、「miRNA の発現変化による神経細胞分化への影響」第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会 合同年会、2014 年 9 月 29 日-10 月 1 日、奈良県文化会館(奈良県・奈良市)

豊島学、「疾患由来 iPS 細胞を用いたカルボニルストレス性統合失調症の病因解明」第 9 回日本統合失調症学会、2014 年 3 月 14 日-15 日、京都テルサ(京都府・京都市)

豊島学、「カルボニルストレスが関与する統合失調症の病因解明」、新学術マイクロ精神病態若手交流研究会、2014年2月13日-14日、ホテル磯部ガーデン(群馬県・安中市)

豊島学、「iPS細胞を用いたカルボニルストレス性統合失調症の病因解析」、第46回精神神経系薬物治療報告会、2013年12月6日、千里ライフサイエンスセンタービル(大阪府・豊中市)

豊島学、「Effect of carbonyl stress on neural differentiation and development」、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ、2013年8月29日-9月1日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

豊島学、「統合失調症を併発した22q11.2欠失症候群患者由来のiPS細胞を用いたトランスクリプトーム解析」、第36回日本神経科学大会、2013年6月20日-23日、京都国際会議場(京都府・京都市)

豊島学、「transcriptome analysis of human induced pluripotent stem cells from 22q11.2 deletion syndrome patients with schizophrenia」、第6回MCCS-Asiaシンポジウム、2013年6月19日、京都国際会議場(京都府・京都市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

豊島 学(TOYOSHIMA, Manabu)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：90582750

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし