

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860932

研究課題名(和文) 統合失調症患者由来iN細胞を用いたマイクロエンドフェノタイプの同定と病態解明

研究課題名(英文) Identification of micro-endophenotype of schizophrenia using human induced-neuronal (iN) cells

研究代表者

佐方 功明 (Sagata, Noriaki)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：00632308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：誘導性神経(iN)細胞はiPS由来神経細胞と比較して非常に短期間に解析可能な生きたヒトの神経細胞を得られるという点で注目を浴びた技術であったが、成人由来の線維芽細胞を用いるとiN細胞の作成効率が低下するという欠点があった。このiN細胞の誘導と培養の条件を工夫し、年齢を問わず幅広い年齢層からのiN細胞作成の方法の樹立に成功した。このiN細胞を用い、成人の統合失調症患者と健常者からそれぞれ作成したiN細胞を比較したところ、統合失調症患者の神経細胞特異的にmRNA発現レベルが約2倍に増加している遺伝子を発見した。

研究成果の概要(英文)：Induced-neuronal (iN) cells have attracted attention in that live human neuronal cells that are analyzable in a very short period can be obtained compared to iPS-derived neurons. There was a disadvantage on the efficiency of generating iN cells with using adult-derived fibroblasts. We successfully established a method of iN cell creation from a wide range of age regardless of age by devising the induction and culture conditions of this iN cell. By comparing iN cells derived from adult schizophrenia patients and healthy controls, we found a gene whose mRNA expression level is about 2-fold increased specifically in neurons of schizophrenic patients.

研究分野：分子精神医学

キーワード：統合失調症 iN細胞

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞(iPS細胞)の誕生によってヒトの体細胞からiPS細胞由来の神経幹細胞を作成し、これを分化させ、ヒト由来の生きた神経細胞の作成・解析が可能となった。しかし、iPS細胞の取扱いには大変な労力と熟練した技術が要求され、維持作業においても不用意な機械的刺激が予期せぬ分化を誘導してしまう危険性がある。また体細胞からiPS細胞を経て神経細胞へと分化させるには数か月を要する。

他方、直接転換法による誘導性神経細胞(induced Neuronal Cells: iN細胞)の作成技術が開発された(Vierbuchen et al., Nature 2010)。iN細胞は幹細胞のステージを経ないためiPS細胞と比較すると取扱いが容易であり、さらに線維芽細胞から神経細胞へ直接転換するため、2週間程度で目的の神経細胞を手に入れることが出来、精神疾患研究への応用が期待されていた。

ただしそのためには成人皮膚組織由来線維芽細胞を用いた高効率・高純度なiN細胞作成法を確立する必要がある。統合失調症は発症時期より多くが思春期以降の成人が対象となる。しかし実際に胎児由来の線維芽細胞からの神経細胞転換は比較的効率よく起こるものの新生児や成人由来の線維芽細胞では年齢に反比例して転換効率が落ち、神経突起を多岐に伸ばした成熟したiN細胞は少なく、大部分は未成熟なiN細胞となる。従って統合失調症患者由来のiN細胞作成には成人由来の皮膚組織由来線維芽細胞の直接転換に最適化した方法の開発が不可欠であった。

2. 研究の目的

アルツハイマー病患者由来iN細胞を用いた研究が報告されているが(Qiang et al., Cell 2011)、統合失調症を含む精神疾患での報告は皆無である。本研究では統合失調症患者由来iN細胞の解析による統合失調症の細胞レベルでの微小な表現型・マイクロエンドフェノタイプの同定を目指す。

ヒトの生きた神経細胞を手に入れることが実質不可能であったので代替的な研究が行われてきた。こうしたエンドフェノタイプは種を問わず再現されるため、間接的なアプローチとして実験動物の遺伝子と表現型に関するデータベースの構築が世界的にも進められ、精神疾患に対する我々の理解を深めてくれた。しかし動物の表現型とヒトの精神症状を相関させるには慎重な議論を要し、正しい解釈にはヒト由来試料を用いたマイクロエンドフェノタイプの同定が必要であると考えられる。iPS細胞の登場によりこの問題にも解決の糸口がもたらされたが、現実には培養の難しさや費用、目的の神経細胞を得

るまでに長い時間が必要だという問題点が残されている。

本研究では、ヒト由来の生きた神経細胞を短期間に作成出来るiN細胞を用い、統合失調症のマイクロエンドフェノタイプを同定し、今まで蓄積されてきたマクロエンドフェノタイプとの相関を探り、病態機序の解明に迫る。

3. 研究の方法

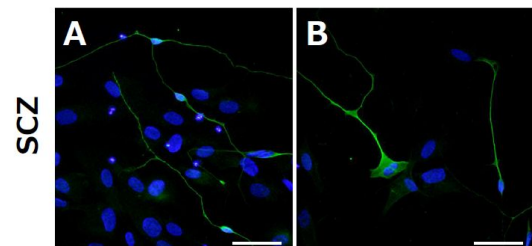
統合失調症患者および健常者の皮膚組織由来線維芽細胞よりヒト*ASCL1*、*MYT1L*、*POU3F2*の3因子導入によるグルタミン酸作動性iN細胞を作成する。同時に成人由来のiN細胞作成に最適化した直接転換法を模索する。

作成した統合失調症患者と健常者由来のiN細胞を比較し、樹状突起棘・神経軸索・成長円錐・シナプスなどの形態、神経伝達物質の合成、活動電位やミトコンドリア膜電位などの生理的機能、遺伝子発現プロファイル、代謝動態などに異常がないかを評価する。

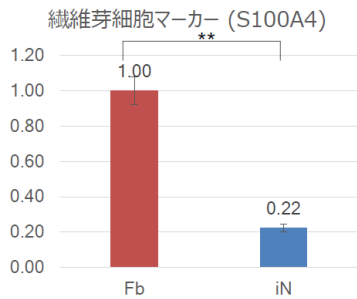
同時にGABA作動性iN細胞を樹立し、神経細胞のサブタイプごとに統合失調症におけるマイクロエンドフェノタイプの同定を行う。

4. 研究成果

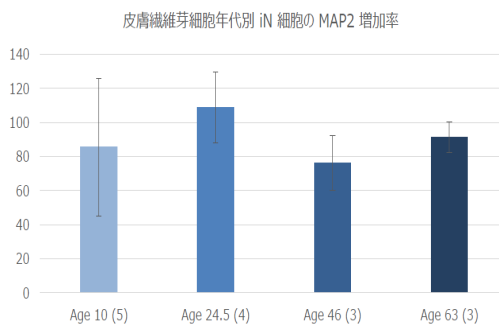
既存の方法で使用されている培地に加え、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤バルプロ酸や成長因子FGF2などを添加して、1-69歳の皮膚由来ファイブプロラスト20細胞株よりiN細胞を作成したところ19株において明らかに神経細胞によく似た細胞形態を認められた(立体的な球形細胞体と長く分枝した神経突起)。



さらにこれらのiN細胞では誘導前の線維芽細胞と比較してニューロンマーカーとして広く利用されているMAP2(微小管結合タンパク2)のmRNA発現量が約100倍への増加が認められた。また逆に元の線維芽細胞のマーカー遺伝子であるS100A4のmRNA発現量についてはiN細胞へ誘導することによって約1/5に減少したことから、線維芽細胞の細胞運命を脱し、神経細胞へと誘導されていることが裏付けられた。



さらに 15 株の iN 細胞を未成年・成人・中年・高齢者の 4 グループに分けて、その差を比較したところ年齢による MAP2 mRNA 発現量に有意な関連は認められなかったことから、対象の年齢にかかわらず同程度の効率で iN 細胞を作成できることが明らかになった。



細胞形態においては細胞体の大きさや神経突起の長さ、神経突起の分子の複雑さなどについては健常者の統合失調症患者由来の iN 細胞で明らかに違いが認められなかった。

また神経細胞の機能に関わる遺伝子の発現量についてリアルタイム PCR で比較検討した結果、多くの遺伝子については有意な差は認められなかったがただ一つの遺伝子について統合失調症患者由来の iN 細胞において mRNA 発現レベルが健常者の約 2 倍に増加していることを明らかにした。この遺伝子と統合失調症との関連については未だ知る限りいかなる報告もなされていない。

以降の結果をまとめた報告書の作成に際し、共著者より電気生理学的な検討も必須であると指摘を受け、ホールセルパッチクランプ法による活動電位などの特性を確認中である。

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 1 件)

Kato TA, Ohgidani M, Sagata N, Kanba S. Directly induced glial/neuronal cells from human peripheral tissues: A novel

translational research tool for neuropsychiatric disorders. *Advances in Neuroimmune Biology*, Vol.6, 95-105, 2016

〔学会発表〕(計 1 件)

Sagata N.

Directly induced-neuronal (iN) cells from human fibroblasts: A tool for translational research.

DFG-JSPS Symposium, 2014 年 6 月 30 日, ルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン (ドイツ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐方 功明 (SAGATA, Noriaki)
九州大学・医学研究院・学術研究員
研究者番号：00632308

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()