164　脳と心臓双方の視点から捉える統合失調症の病態	有岡　祐子

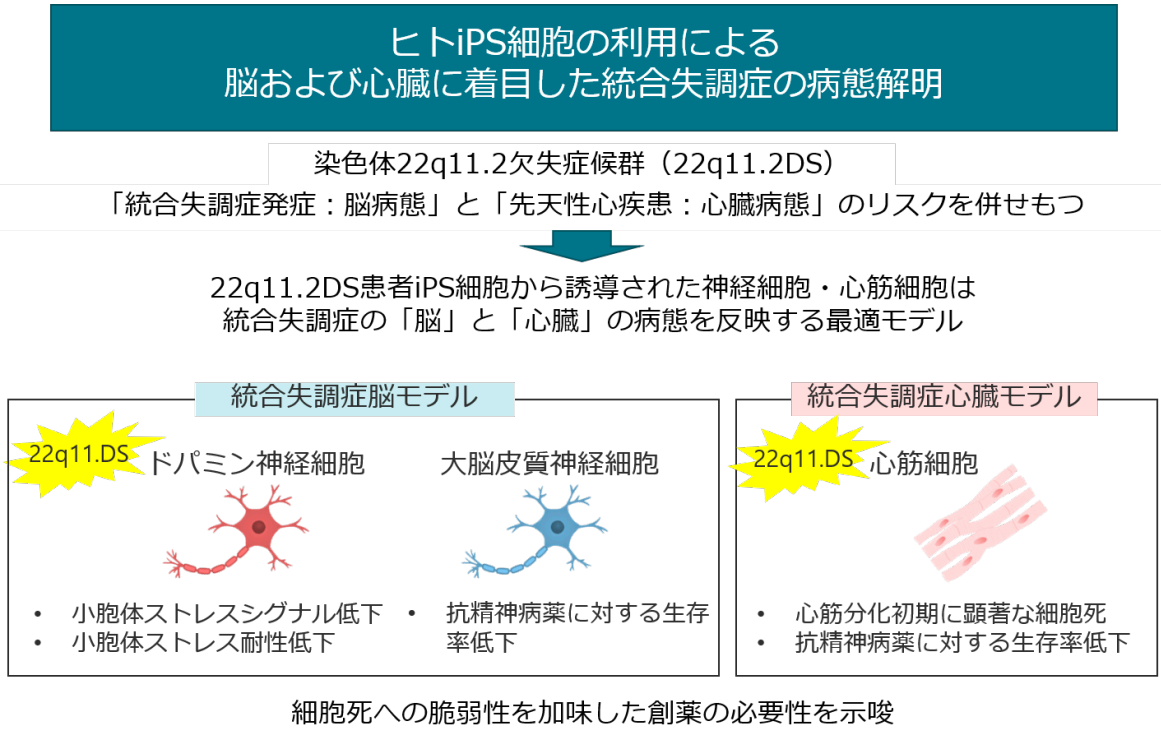
【目的】統合失調症患者数は日本だけでも約 80 万人で、そのうち約 19 万人が入院を余儀なくされている。病態に基づく根本的治療法の開発が望まれているが、統合失調症の病態は未だ不明である。統合失調症は、精神症状の基盤となる脳病態に加えて心臓にも病態があると予想され、脳と心臓の両者の病態を解明することが、効果に優れ副作用の少ない治療薬開発を進める上でも不可欠と考える。

そこで本研究では、iPS 細胞を用いて、1. 統合失調症の脳と心臓の病態を反映した疾患ヒトモデルを作製し、2. 脳と心臓双方の視点から統合失調症の病態解明・創薬への応用、を目的とする。特に統合失調症の発症リスクであり、心疾患ももたらす染色体 22q11.2 欠失症候群（22q11.2DS）患者由来 iPS 細胞を用いる。

【方法】健常者 iPS 細胞および 22q11.2DS 患者 iPS 細胞から神経細胞（ドパミン神経細胞と大脳皮質神経細胞）および心筋細胞を分化誘導した。それぞれを統合失調症脳モデル、統合失調症心臓モデルとし、健常者細胞と比較して分子・表現型系解析を行った。また、神経細胞と心筋細胞について、抗精神病薬に対する反応性を比較した。

【結果】半定量プロテオーム解析の結果、22q11.2DS 神経細胞では小胞体ストレス関連パスウェイの異常が認められ、実際、小胞体ストレスに対する耐性が低下していた。また、22q11.DS 心筋細胞では分化初期段階における顕著な細胞死が認められた。さらに、22q11.DS 患者細胞（神経細胞と心筋細胞）は健常者細胞（神経細胞と心筋細胞）よりも抗精神病薬のひとつであるクロザピンに対する細胞生存率が低値であった。以上は、22q11.2DS 患者細胞では、脳と心臓双方において、細胞死に対する顕著な脆弱性が存在していることを示唆する。本成果は、脳と心臓、という新たなアプローチによる統合失調症の病態解明、および創薬へ寄与することが期待される。

研究概要



164. 脳と心臓双方の視点から捉える統合失調症の病態

有岡　祐子

*名古屋大学 医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター

Key words：染色体 22q11.2 欠失，統合失調症，脳，心臓，iPS 細胞

緒　言

統合失調症患者数は日本だけでも約 80 万人で、そのうち約 19 万人が入院を余儀なくされている。病態に基づく根本的治療法の開発が望まれているが、統合失調症の病態は未だ不明である。我々の研究グループを含む世界各国のゲノム解析研究により、統合失調症の発症に関わるゲノム変異が次々と同定されてきた［1］。その中でも特に、染色体 22q11.2 欠失は統合失調症発症の最大リスクゲノム変異（オッズ比 50 以上）として同定されている。つまり、染色体 22q11.2 欠失に着目することで統合失調症の病態解明への糸口が見つかる可能性が高い。

一方で、統合失調症には別の臨床的課題がある。統合失調症患者では心疾患の合併率及び心臓死の頻度が高く、その一因として抗精神病薬の副作用も推定される。また、統合失調症の発症に強く関与するゲノム変異には、染色体 22q11.2 欠失をはじめとして、染色体 3q29 欠失、CACNA1C 変異など、先天性心疾患も同時に引き起こすものが多い。以上から統合失調症は、精神症状の基盤となる脳病態に加えて心臓にも病態があると予想され、脳と心臓の両者の病態を解明することが、効果に優れ副作用の少ない治療薬開発を進める上でも不可欠と考える。

近年、精神疾患の病態解明に向け、患者由来 iPS 細胞を用いた研究がさかんにおこなわれている。iPS 細胞は元となった患者の遺伝的性質を反映しており、これまでに我々も精神疾患患者から iPS 細胞を樹立し、病態解析や創薬スクリーニング系の構築を進めてきた［2～6］。患者由来 iPS 細胞を用いることで、精神疾患の病態を反映した疾患ヒトモデルの構築が可能である。

そこで本研究では、iPS 細胞を用いて、1. 統合失調症の脳と心臓の病態を反映した疾患ヒトモデルを作製し、2. 脳と心臓双方の視点から統合失調症の病態解明・創薬への応用、を目指す。特に脳と心臓双方に脆弱性をもたらす染色体 22q11.2 欠失症候群（22q11.2DS）患者由来 iPS 細胞を用いる。22q11.2DS 患者 iPS 細胞から誘導した神経細胞（ドパミン神経細胞と大脳皮質神経細胞）と心筋細胞をそれぞれ統合失調症脳モデル、統合失調症心臓モデルとし、健常者細胞と比較して表現型系解析を行った。22q11.2DS 神経細胞では小胞体ストレスに対する脆弱性が顕著であり、22q11.DS 心筋細胞では分化初期段階における細胞死が認められた。また、創薬スクリーニングへの応用を目指し、神経細胞と心筋細胞について、統合失調症の治療薬である抗精神病薬に対する反応性を比較したところ、22q11.2DS 患者細胞では健常者細胞よりも抗精神病薬に対する細胞生存率が低値であった。以上の知見は、22q11.2DS 患者細胞では、脳と心臓双方において、細胞死に対する顕著な脆弱性が存在していることを示唆する。

方　法

1.　対象 iPS 細胞

健常者 4 例（Control 1、Control 2、Control 3、Control 4）、22q11.2DS 患者 3 例（22DS1、22DS2、22DS3）から樹立した iPS 細胞を用いた。健常者については、Control 1 は理研 BRC から分与された 201B7［7］、Control 2 は 41 歳男性［3，5］、Control 3 は 30 歳女性［2，3］、Control 4 は 65 歳女性［2］とした。22q11.2DS 患者については、22DS1 は 23 歳男性、22DS2 は 42 歳女性、22DS3 は 23 歳女性で、3 例とも典型的な 3.0 Mbp の 22q11.2 ヘテロ欠失を有した。Control1 以外は、末梢血リンパ球よりエピソーマルベクターによって iPS 細胞を樹立した。22q11.2 欠失はアレイ CGH（アジレント社製）によって同定した。iPS 細胞の樹立および解析については、名古屋大学医学部

*現在の所属：名古屋大学 医学部附属病院 先端医療開発部 先端医療・臨床研究支援センター

生命倫理委員会によって承認を受けた（承認番号 2012-0184）。

2. 神経細胞・心筋細胞への分化誘導

ドパミン神経細胞および大脳皮質神経細胞への誘導はそれぞれ既報に準じて実施した［5, 8］。心筋細胞への誘導は市販のキットを用いた（Stem RD 社、Psdif-Cardio Cardiomyocyte Differentiation Kit）。

3. 質量分析を用いた半定量プロテオーム解析

タンパク質抽出はテンブロック型ホモジナイザーによる破砕抽出とした。抽出したタンパク質（15 μg）を還元・アルキル化後、トリプシンを用いた酵素消化を行い、液体クロマトグラフィー-質量分析（LC-MS）によって解析した。生データに対し、Proteome Discoverer 1.4（Thermo Fischer 社）と MASCOT search engine version 2.6.0（Matrix Science 社）によってデータ処理を行い、タンパク質を同定した。

4. 細胞免疫染色

細胞を 4% PFA で固定後、0.3% TritonX-100 と 1% BSA により透過・ブロッキング処理をした。1 次抗体 4℃で一晩反応後、それぞれ適切な蛍光標識 2 次抗体で室温 1 時間反応させた。1 次抗体は βⅢ-tubulin 抗体（T8660、Sigma-Aldrich 社）、tyrosine hydroxylase（TH）抗体（AB152、Millipore 社）、NeuN 抗体（24307、CST 社）を使用した。

5. ウエスタンブロッティング

1 次抗体は PERK 抗体（5683、Cell Signaling Technology 社）、ATF6 抗体（24169-1-AP、Proteintech 社）、IRE1（27528-1-AP、Proteintech 社）を用いた。2 次抗体は anti-mouse or anti-rabblit horseradish-peroxidase-conjugated antibodies（GE Healthcare 社）を用いた。内部コントロールは β-actin-peroxidase 抗体（A3854、Sigma-Aldrich 社）を用いた。定量は ImageJ を利用した。

6. 薬剤

小胞体ストレス誘導にはツニカマイシン（Sigma-Aldrich 社）を用いた。抗精神病薬としてクロザピンおよびチオリダジン（いずれも Sigma-Aldrich 社より購入）を使用した。細胞生存率の測定試薬には CellTiter96 Aqueous One Solution（Promega 社）を用いて、測定感度以下の数値はすべて 0 とした。

7. タイムラプス撮像と解析

タイムラプス撮像およびその解析は IncuCyte（Essen Bioscience 社）によって行った。

8. 統計解析

二群間の比較は Student の t 検定あるいは Welch の t 検定を適用した。P 値が 0.05 以下のものを有意とした。

結果および考察

1. ドパミン神経細胞への誘導と解析

健常者（Control1、Control2、Control3）および 22q11.2DS 患者 iPS 細胞（22DS1、22DS2、22DS3）をドパミン神経細胞へと誘導し、その分化過程を解析した。すべての iPS 細胞において、同様に TH（ドパミン神経細胞のマーカー）陽性の細胞への分化が可能であった。しかし、22q11.2DS 患者群においては、βⅢ-tubulin 陽性の神経突起長の有意な短縮が認められた。タイムラプス撮像による経時的な突起伸長変化を解析した結果からも、22q11.2DS 患者群の突起伸長異常が認められた。22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では neuritogenesis の異常が存在することが示唆された。

次に、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞における分子病態を明らかにするため、健常者 3 例（Control1、Control2、Control3）の iPS 細胞由来ドパミン神経細胞と 22q11.2DS 患者 3 例（22DS1、22DS2、22DS3）の iPS 細胞由来ドパミン神経細胞を対象として、質量分析による半定量プロテオーム比較解析を行った。健常者群に比べ、22q11.2DS 患者群で発現差が 10 倍以上、かつ $P<0.05$ であったタンパク質は 272 個（発現低下 264 個、発現増加 8 個）同定された。この 272 個のタンパク質について KEGG パスウェイ解析を行ったところ、最も有意に集積していたパスウェイは“Protein processing in endoplasmic reticulum”であった。このパスウェイは小胞体ストレスやタンパク質のクオリティコントロールに関与することから、22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では小胞体ストレスに

対する反応異常が推測された。

上記推測を検証するため、健常者ドパミン神経細胞および 22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞の小胞体ストレスに対する反応性を小胞体ストレス誘導時の生存率によって調べた。小胞体ストレス誘導にはツニカマイシン（1、4、10 μg/ml）を用いた。健常者ドパミン神経細胞では、4 μg/ml 濃度のツニカマイシンから細胞死が認められはじめるのに対し、22q11.2DS 患者では 1 μg/ml から顕著な細胞死が認められた。22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞では、小胞体ストレスに対する抵抗性が低下していることが明らかとなった。

哺乳類における小胞体ストレスの主要センサーとして、PERK、ATF6、IRE1 の 3 つのタンパク質が知られている。22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞ではこれらセンサーの異常が生じているのではないかと予想した。そこで、これら 3 つのストレスセンサーの発現量をウエスタンブロッティングで解析した。健常者群と 22q11.2DS 患者群で最も顕著な差があったのが PERK で、22q11.2DS 患者群では健常者の 28.3%（$p = 4.72\times10^{-5}$、t 検定）の発現量になっていた。ATF6 も 22q11.2DS 患者群で健常者群の 46.9%の発現量に低下していた（$p = 1.89\times10^{-3}$、t 検定）。一方で、IRE1 については、両群で発現差は認められなかった（$p = 0.117$、t 検定）。このことから、特に PERK が 22q11.2DS 患者ドパミン神経細胞の病態に関与していることが示唆された。

PERK は神経回路形成に必要な F-アクチン動態に関与していることが近年報告されている。神経細胞における PERK の発現低下が、精神疾患の病態理解のヒントになる可能性が考えられた。

2. 心筋細胞への誘導

健常者および 22q11.2DS 患者 iPS 細胞を心筋細胞へと誘導した。誘導開始時の細胞密度が～70%コンフルエントの場合、健常者 iPS 細胞からは誘導 1 週間から拍動する心筋細胞が分化誘導できた（図 1A）。しかし、22q11.2DS 患者 iPS 細胞では、心筋誘導直後（1 日目）に顕著な細胞死が認められ、その後の誘導が不可能であった（図 1B）。これでは 22q11.2DS 患者心筋細胞での解析が不可であるため、誘導開始時の細胞密度の検討を行った。誘導開始時の細胞密度が 90%以上コンフルエントである場合は 22q11.2DS 患者群においても拍動する心筋細胞の獲得が可能であった。これらの結果は、22q11.2DS 患者心筋細胞では、分化初期の段階から脆弱性が存在することを示唆した。22q11.2DS 患者において先天心疾患へ依存率が高いという臨床表現型を反映している結果と考えられた。つまり、患者の生体表現型を反映する *in vitro* 心臓モデルになりうると期待された。今後、22q11.DS 患者心筋細胞について分子病態解析を行い、心臓の視点からみた統合失調症の病態解明につなげる予定である。

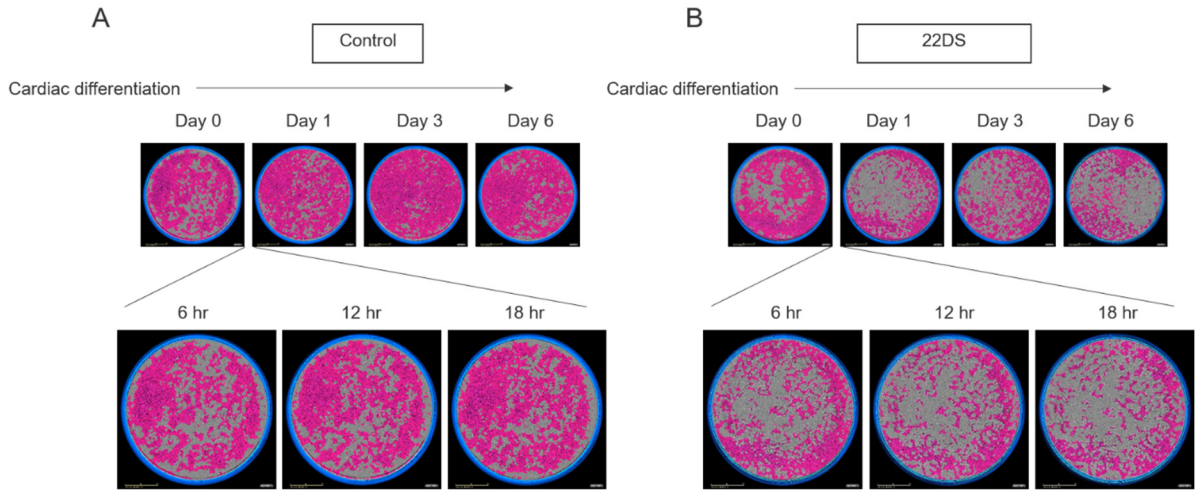


図 1. 22q11.2DS 患者群では心筋分化初期の細胞死が顕著（ピンク：細胞存在領域）

A） 健常者（Control2）iPS 細胞からの心筋誘導過程における細胞数変化。

B） 22q11.2DS 患者（22DS2）iPS 細胞からの心筋誘導過程における細胞数変化。

3. 神経細胞と心筋細胞の抗精神病薬に対する反応性

創薬スクリーニングへの応用も加味すると、短期で分化誘導可能な系が好ましい。その場合、誘導に 1 か月ほどかかる項目 1 のドパミン神経細胞系はあまり適していない。そこで、転写因子 Neurogenin2 の強制発現による大脳皮質神経細胞の誘導を試みた［8］。この誘導法ではわずか 1 週間で iPS 細胞から成熟神経細胞マーカー NeuN 陽性細胞を獲得することができた。健常者と同様に、22q11.2DS 患者 iPS 細胞からも大脳皮質神経細胞の誘導が可能であった。

次に、これら大脳皮質神経細胞が抗精神病薬に対してどのような反応を示すのかを調べた。心筋細胞との比較も考慮し、抗精神病薬は、心循環系の副作用が懸念されるクロザピン（心筋炎誘発）とチオリダジン（心筋伝導系障害）とした。クロザピンでは、健常者群（Control 2、Control 3、Control 4）、22q11.2DS 患者群（22DS2）共に 50 μM 以上で細胞死が認められる。しかし、50 μM 濃度の場合、健常者群では生存率が 40～80%であるのに対し、22q11.2DS 患者群では生存率が 20%以下と影響がより顕著であった（図 2A）。チオリダジンでは健常者群と 22q11.2DS 患者群共に 20 μM 以上から細胞死が認められたが、その反応性は健常者間でもばらつきが大きかった。さらなる検討が必要である。

最後に、心筋細胞が抗精神病薬に対してどのような反応を示すのかを調べた。神経細胞での結果を踏まえ、クロザピンでの検討を行った。健常者心筋細胞（Control 2、Control 3、Control 4）では 100 μM においてもほとんど細胞死が認められなかったのに対し、22q11.2DS 患者群（22DS1、22DS2）では 50 μM から細胞死が認められた（図 2B）。抗精神病薬に対する脆弱性が *in vitro* において見出された。本知見は精神疾患の治療薬開発にあたり重要参考所見となりうる。

今回、細胞死でのみの評価となったが、今後はカルシウム動態、電気生理学解析を行い、抗精神病薬に対する両群の差異を明らかにする予定である。

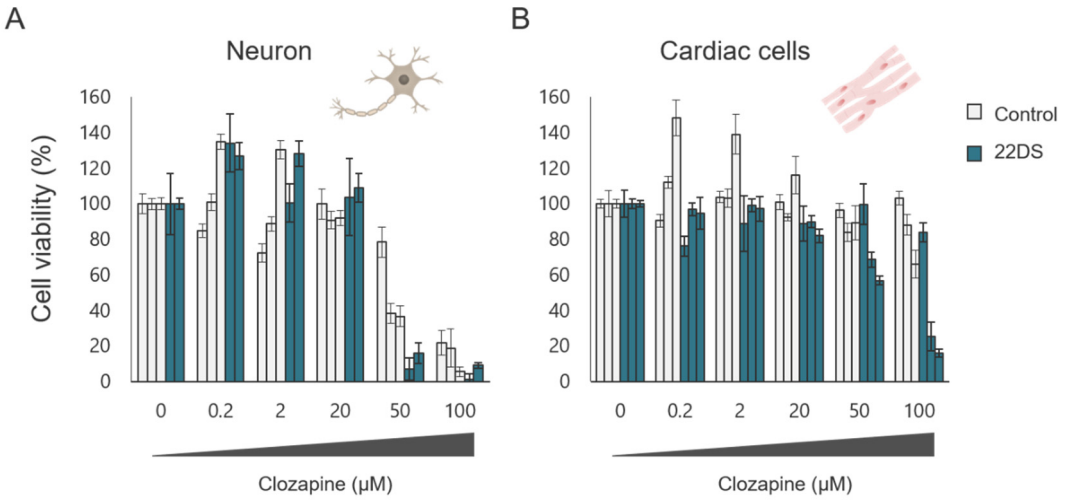


図 2. 神経細胞・心筋細胞とクロザピンに対する生存率比較

A） 大脳皮質神経細胞。

B） 心筋細胞。

本研究全体を通し、22q11.2DS 患者神経細胞と心筋細胞で共に細胞死への脆弱性が認められた。最近我々は、ゲノム解析と脳オルガノイド技術を併用することで、統合失調症の発症に細胞死が関与している可能性を報告している［3］。統合失調症の病態解明および創薬にあたり、細胞死への脆弱性を加味する必要性が考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院医学系研究科精神医学分野の尾崎紀夫氏、久島周氏、森大輔氏である。

文　献

1) Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Shiino T, Yoshimi A, Kimura H, Takasaki Y, Wang C, Xing J, Ishizuka K, Oya-Ito T, Nakamura Y, Arioka Y, Maeda T, Yamamoto M, Yoshida M, Noma H, Hamada S, Morikawa M, Uno Y, Okada T, Iidaka T, Iritani S, Yamamoto T, Miyashita M, Kobori A, Arai M, Itokawa M, Cheng MC, Chuang YA, Chen CH, Suzuki M, Takahashi T, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Watanabe Y, Nunokawa A, Someya T, Ikeda M, Toyota T, Yoshikawa T, Numata S, Ohmori T, Kunimoto S, Mori D, Iwata N, Ozaki N. High-resolution Copy Number Variation Analysis of Schizophrenia in Japan. Mol Psychiatry. 2017 Mar; 22(3):430-440. doi: 10.1038/mp.2016.88. Epub 2016 May 31. PMID: 27240532

2) Arioka Y, Shishido E, Kushima I, Mori D, Ozaki N. Cell body shape and directional movement stability in human-induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic neurons. Sci Rep. 2020 Apr 2;10(1):5820. doi: 10.1038/s41598-020-62598-4. PMID: 32242061

3) Arioka Y, Hirata A, Kushima I, Aleksic B, Mori D, Ozaki N. Characterization of a schizophrenia patient with a rare RELN deletion by combining genomic and patient-derived cell analyses. Schizophr Res. 2019 Dec 14:S0920-9964(19)30473-6. doi: 10.1016/j.schres.2019.10.038. Online ahead of print. PMID: 31848032

4) Arioka Y, Kushima I, Mori D, Ozaki N. Three lines of induced pluripotent stem cells derived from a 15q11.2-q13.1 duplication syndrome patient. Stem Cell Res. 2018 Aug;31:240-243. doi: 10.1016/j.scr.2018.08.004. Epub 2018 Aug 10. PMID: 30144654

5) Arioka Y, Shishido E, Kubo H, Kushima I, Yoshimi A, Kimura H, Ishizuka K, Aleksic B, Maeda T, Ishikawa M, Kuzumaki N, Okano H, Mori D, Ozaki N. Single-cell Trajectory Analysis of Human Homogenous Neurons Carrying a Rare RELN Variant. Transl Psychiatry. 2018 Jul 19;8(1):129. doi: 10.1038/s41398-018-0177-8. PMID: 30022058

6) Arioka Y, Kushima I, Kubo H, Mori D, Ozaki N. Induced pluripotent stem cells derived from a schizophrenia patient with ASTN2 deletion. Stem Cell Res. 2018 Jul;30:81-84. doi: 10.1016/j.scr.2018.05.013. Epub 2018 May 19. PMID: 29803967

7) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019. PMID: 18035408

8) Imamura K, Sahara N, Kanaan NM, Tsukita K, Kondo T, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Kawakami K, Hotta A, Yawata S, Watanabe D, Hasegawa M, Trojanowski JQ, Lee VM, Suhara T, Higuchi M, Inoue H. Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons. Sci Rep. 2016 Oct 10;6:34904. doi: 10.1038/srep34904. PMID: 27721502