

Title	統合失調症における新規「神経 - 骨・間葉系ネットワーク不全」仮説の検証
Sub Title	Verification of new schizophrenia hypothesis 'the bone/mesenchyme to brain concept'
Author	西原, 浩司 (Nishihara, Kōji )
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究は、統合失調症の病態に骨・間葉系組織の異常が関わっているという新規仮説の検証を目的とした。それらの組織の由来となる間葉系細胞の機能異常があるという作業仮説を立て、統合失調症患者由来iPS細胞から間葉系幹細胞・神経堤細胞 (MSC/NCC) を分化誘導した。黄地ら (2014) の方法により、2名の患者由来iPS細胞から、骨・軟骨・脂肪に分化可能なLNGFR(+)THY-1(+)共陽性細胞を樹立作製することに成功した。1クローンについては分化効率が有意に低かった。今後、クローン数を増やし、患者群特異的な表現型を探索していく予定である。</p> <p>The purpose of this research is to test hypothesis that bone and mesenchymal tissue dysfunctions are associated with pathology of schizophrenia. We formed the working hypothesis that the function of mesenchymal stem cells/neural crest cells (MSC/NCCs), those progenies are bone and lipid, is abnormal in schizophrenia, and generate MSC/NCCs from patient-derived iPSCs. We successfully generated LNFGR(+ )THY-1(+ ) cells from 2 clones of schizophrenia-iPSCs, which could differentiate into bone, cartilage and lipid. One of these clones had significantly poor differentiation potential. Hereafter, we will generate more clones of MSC/NCCs and search new patient-specific phenotypes of schizophrenia.</p>
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K19782 研究分野：精神神経領域
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19782seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K19782seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和元年9月17日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19782

研究課題名(和文)統合失調症における新規「神経-骨・間葉系ネットワーク不全」仮説の検証

研究課題名(英文)Verification of new schizophrenia hypothesis 'the bone/mesenchyme to brain concept'

研究代表者

西原 浩司(Nishihara, Koji)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：90404277

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、統合失調症の病態に骨・間葉系組織の異常が関わっているという新規仮説の検証を目的とした。それらの組織の由来となる間葉系細胞の機能異常があるという作業仮説を立て、統合失調症患者由来iPS細胞から間葉系幹細胞・神経堤細胞(MSC/NCC)を分化誘導した。黄地ら(2014)の方法により、2名の患者由来iPS細胞から、骨・軟骨・脂肪に分化可能なLNFR(+)/THY-1(+)共陽性細胞を樹立作製することに成功した。1クローンについては分化効率が有意に低かった。今後、クローン数を増やし、患者群特異的な表現型を探索していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の統合失調症研究は、その殆どが脳神経系のみに着目した解析であったが、本研究は、骨系統の細胞と精神神経系との関連を検証する、他に類を見ない研究である。

iPS細胞技術を応用することによって、近年まで入手解析が困難であった患者由来の骨・間葉系細胞を樹立作製する本研究により、統合失調症においてこれまで全く着目されてこなかった神経系以外の重要な鍵となる表現型を抽出できる。骨・間葉系細胞における新規表現型が全く新しい治療法につながることで、統合失調症研究は大きく前進し、世界に強いインパクトを与えられるものと考えられる。

研究成果の概要(英文):The purpose of this research is to test hypothesis that bone and mesenchymal tissue dysfunctions are associated with pathology of schizophrenia. We formed the working hypothesis that the function of mesenchymal stem cells/neural crest cells (MSC/NCCs), those progenies are bone and lipid, is abnormal in schizophrenia, and generate MSC/NCCs from patient-derived iPSCs. We successfully generated LNFR(+)/THY-1(+) cells from 2 clones of schizophrenia-iPSCs, which could differentiate into bone, cartilage and lipid. One of these clones had significantly poor differentiation potential. Hereafter, we will generate more clones of MSC/NCCs and search new patient-specific phenotypes of schizophrenia.

研究分野：精神神経領域

キーワード：統合失調症 iPS細胞 間葉系幹細胞 神経堤細胞

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、多彩な精神症状や認知機能障害など重篤な後遺症を残しうる予後不良の精神疾患であり、発症メカニズムは未解明の部分が多い。生涯有病率が約 1%と高頻度ながら、寛解率は 30%程度に過ぎず (AlAqeel, 2012)、革新的な治療に向けた病態解明が強く期待されている。

これまで、統合失調症は他の精神疾患と同様に「脳神経系の疾患」と見なされ、その動物モデル研究あるいは *in vitro* 患者由来細胞研究のほとんどが、神経系細胞のみに着目した解析であった (Brennand, 2011 など)。しかし、統合失調症患者を健常対照群と比較すると、奇妙なことに (1)慢性関節リウマチなど骨破壊性疾患への罹患率は大幅に低く (Sellgren, 2014; Euesden, 2015)、関節リウマチや骨代謝にも関与する炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) - 17 は統合失調症の初発あるいは増悪時に低下するという報告がある (Borovcanin, 2012)。 (2)また、統合失調症患者において、骨粗鬆症のリスクとなる抗精神病薬投与下においても骨吸収率は有意に少なく (Okita, 2014)、また骨折受傷後の回復速度が速いという症例発表も散見されている (竹田, 2014)。さらに、 (3)我々の臨床研究では、統合失調症患者で頭蓋顔面の骨格における微小奇形が有意に多く認められた (Waldrop scale で評価。第 100 回日本精神神経学会, 2004 年で発表)。そこで本研究の予備実験として、 (4)我々が新規に樹立した統合失調症患者由来の iPS 細胞から胚様体を形成し病理解析したところ、興味深いことに骨成分が著明に多く形成され、一方で脂肪成分は少なかった。これらの知見から、統合失調症は精神疾患でありながらも、骨系統の細胞・組織に何らかの異常があるのではないかと考えた。

近年、複数の組織・臓器間の相互作用が、恒常性や疾患発症に大きく関与することが明らかになってきた。「神経と骨」については、軸索伸長などに関わる神経細胞由来のセマフォリン (Sema) 3A が全身の骨量を制御していることが報告され (Fukuda, 2013)、ようやくその神経-骨組織間ネットワークの存在が示されつつあるが、精神神経疾患において骨組織の動態を詳細に解析した報告は全くない現状である。

## 2. 研究の目的

本研究では、iPS 細胞技術 (Takahashi, 2006) を応用し、まず統合失調症患者細胞から骨あるいはその由来となる間葉系細胞を作製して解析を行い、神経系以外の新たな表現型を探索することを第 1 の目的とした。さらに、組織間ネットワークの観点から、これらの骨 (系統) 細胞と神経細胞の相互作用について解析を行い、統合失調症の病態解明や新規の治療ターゲットの探索に寄与することを第 2 の目的とした。

まず、統合失調症患者由来の骨 (系統) 細胞を作製し、その機能や神経との相互作用を解析し、新規の表現型を探索する。骨組織は、骨芽細胞 (骨形成) と破骨細胞 (骨吸収) の均衡の上でつくられる。発生学的には未解明の部分が多いものの、その由来は部位によって異なり、頭蓋顔面の骨は神経堤細胞、それ以外の骨は間葉系幹細胞に由来するとされている。最近、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化において、統合失調症発症の候補遺伝子の一つである *Neuregulin1* が関与するという報告もあり (Jullien, 2012)、終末分化した骨細胞のみならず、その由来となる神経堤細胞や間葉系幹細胞の動態を知ること、病態解明の糸口になる期待は非常に大きい。

そこで、まず統合失調症患者由来 iPS 細胞から、骨細胞の由来となる神経堤細胞/間葉系幹細胞、さらに骨芽細胞を系統的に作製して性状を解析し、特に前者に関しては骨への分化誘導効率を定量する。次に、これらの細胞の遺伝子発現プロファイルに関して、健常者群との比較を行う。また、前述のように炎症性サイトカインを介した病態も考えられことから、分泌される炎症性サイトカインのパターンを解析する。最後に、神経-骨ネットワークを模倣しうる共培養系を新たに構築し、骨組織あるいは間葉系幹細胞/神経堤細胞が神経細胞に与える影響を検討することとした。

## 3. 研究の方法

統合失調症患者において、骨組織あるいはその由来となる神経堤細胞・間葉系幹細胞にどのような異常が見られるか、また神経細胞へどのような影響を及ぼし得るかを検討する。統合失調症発症の代表的な候補遺伝子である 22q11 染色体領域に変異を持つ患者由来 iPS 細胞から骨およびその由来細胞を系統的に分化誘導させ、その機能および遺伝子発現、サイトカインなどのプロファイルをそれぞれ健常対照群と比較する。さらに、これらの細胞を用いて、神経-骨の組織間ネットワークを簡易に模倣した神経細胞との共培養系を構築し、骨系統細胞が神経細胞におよぼす影響を解析することを計画した。

### (1) 統合失調症患者および健常者由来 iPS 細胞から間葉系細胞の作製

22q11 染色体領域に変異を持つ統合失調症患者あるいは健常者由来 iPS 細胞から、神経堤細胞、間葉系幹細胞、骨芽細胞をそれぞれ作出する。

#### 間葉系幹細胞/神経堤細胞の誘導

iPS 細胞から神経堤細胞を誘導し、それより間葉系幹細胞、骨芽細胞と順次作製する。分化

誘導は、黄地ら（2014）のプロトコールに準じて作製する。まず iPS 細胞をフィーダーフリー化した後、浮遊培養で neuroepithelial cells を作製し、day4 で接着培養する。Day10-12 で細胞を回収した後、フローサイトメトリーを用いて LNGFR(+)/THY-1(+) 共陽性の細胞をソーティングし、神経堤様細胞を得る（図1）。健全対照群の iPS 由来間葉系幹細胞はすでに作製済。

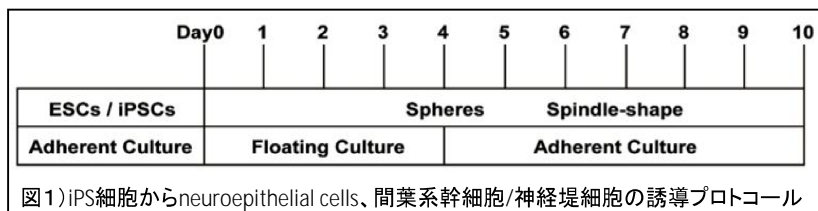


図1) iPS細胞からneuroepithelial cells、間葉系幹細胞/神経堤細胞の誘導プロトコール

骨芽細胞の作製： 得られた間葉系幹細胞を、デキサメサゾン、グリセロリン酸、アスコルビン酸入りα-MEM 培地で約 7~10 日培養し、骨芽細胞を誘導する（Mica, 2013; Fukuda, 2014 のプロトコールに準ずる）。

(2) 患者/健全対照群の骨形成効率の比較 (2) 以降は患者群と健全対照群細胞の比較

(1) で作製した間葉系幹細胞を、の骨芽細胞誘導培地へ置換し、7~10 日で骨細胞への誘導効率を比較する。フォンコッサ染色、AP 染色、定量 PCR などを経時的定量を行う。

(3) 患者由来骨（系統）細胞の遺伝子発現、サイトカイン分泌のプロファイルに関する検討

(1) で作出した間葉系幹細胞/神経堤細胞、骨芽細胞を回収して DNA マイクロアレイ解析を行い、特に炎症・シグナル伝達・傍分泌物質・骨関連遺伝子に着目して網羅的な遺伝子発現パターンを疾患群と健全対照群で比較する。また、傍分泌による他組織への影響も考えられるため、上記細胞からそれぞれ培養上清を採取し、ELISA 法によるサイトカインアッセイを行い、疾患群と対照群で比較する。

(4) 神経細胞との共培養系による、骨（系統）細胞が神経系に与える影響の解析

骨系統細胞が神経細胞にどのような影響を与えるかについて、骨系統細胞の傍分泌による神経細胞の影響を見られる共培養系を構築する。神経細胞は、iPS 細胞からニューロスフェア法を用いて作製する。7~10 日の共培養後の神経細胞を抽出し、形態および電気生理学的変化、神経特異的遺伝子群の mRNA において、患者群あるいは対照群の骨（系統）細胞との共培養による変化を解析する。

4. 研究成果

上記の方法により、22q11欠損を伴う統合失調症患者2名から作出したiPS細胞をフィーダーフリー化し（図2）、それを浮遊培養により neuroepithelial sphere とした後、それを接着培養させると、敷石状に接着・移動する細胞群を獲得できた（図3）。この雑多な細胞群から LNGFR(+) Thy-1(+) 共陽性細胞をFACSソーティングした（図4）。1クローンについては、収量が著しく少なかったため、接着培養の時期を改変するなど作出法の改変を要した。この細胞を分化誘導したところ、骨・軟骨・脂肪への分化が確認され（図5）、MSC/NCC様細胞の一群であることを確認した。これにより、安定的に統合失調症患者由来iPS細胞よりMSC/NCCを作出できる系を構築した。

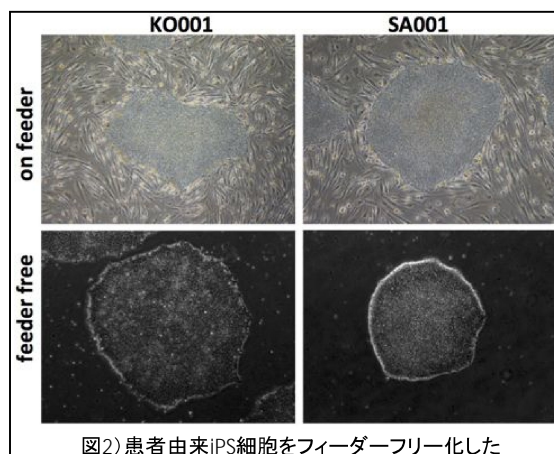


図2) 患者由来iPS細胞をフィーダーフリー化した

現状では残念ながら、患者群由来のMSC/NCC作製がn=2にとどまったが、今後n=3以上の患者群および健全群のMSC/NCCを追加で作出した後、遺伝子発現解析を行い、統合失調症患者群においてMSC/NCC関連遺伝子の発現パターンが健全者群とどのように異なるかを検討する。これを端緒として、統合失調症患者由来MSC/NCCの分化指向性の異常などを検証する予定である。統合失調症患者では、痩せ型体質が多い(クレッチマー)など古くより身体的素因を指摘されており、近年ようやく糖代謝

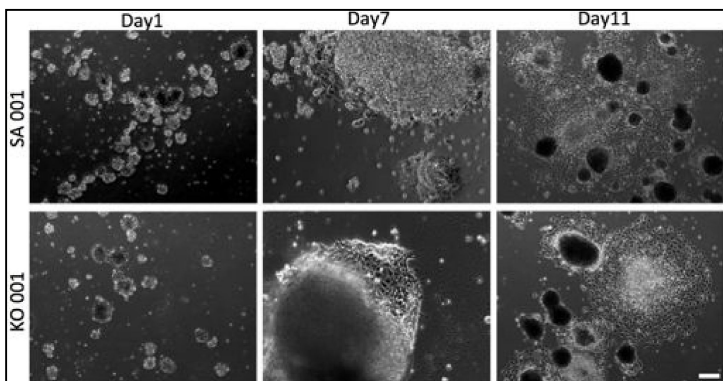


図3) 患者由来iPS細胞から間葉系幹細胞/神経堤細胞の誘導



異常との関連などが指摘され始めたが (Sally, 2005)、従来の研究は殆どが脳神経系のみに着目した解析であった。本研究は、研究代表者が患者由来 iPS 細胞から作製した胚様体の著明な骨形成に着想を得て、組織間ネットワークの観点から、骨系統の細胞と神経系さらには精神疾患との関連を検証する、他に類を見ない全く新規の研究である。

高次脳機能の障害である統合失調症研究において、動物モデルあるいは *in vitro* の患者由来細胞で「精神症状」を再現することは非常に困難である。そこで、精神疾患の病態解明においては、脳神経系の解析の枠を超えて、あらゆる表現型の知見を蓄積し組み合わせることが、統合失調症の病態という難解なパズルを解く鍵になると思われる。本研究では、iPS 細胞技術を応用することによって、近年まで入手解析が困難であった患者由来の骨・間葉系細胞および神経細胞を作製し組み合わせること

で、重要な鍵となる表現型を抽出できるものと確信する。

本研究の今後の推進によって、骨・間葉系細胞のような「身体」が「精神・神経」に作用することを明らかにすることは、統合失調症研究を大きく前進させ、世界に強いインパクトを与えられるものと考えられる。最後に、身体的な側面から病態の一端を明らかにすることによって、「脳のよくわからない病気」という病める方々の背負うスティグマが少しでも軽くなることに寄与したい。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

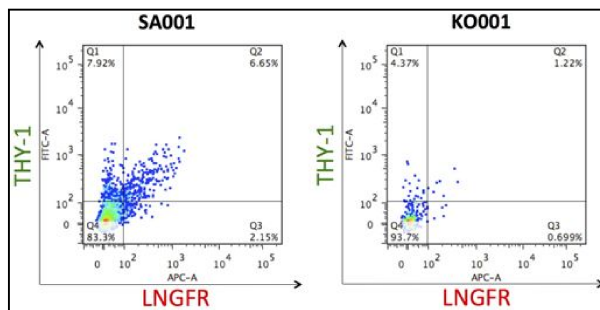


図4) 患者iPS細胞由来のLNGFR/THY-1共陽性細胞をFACSで抽出

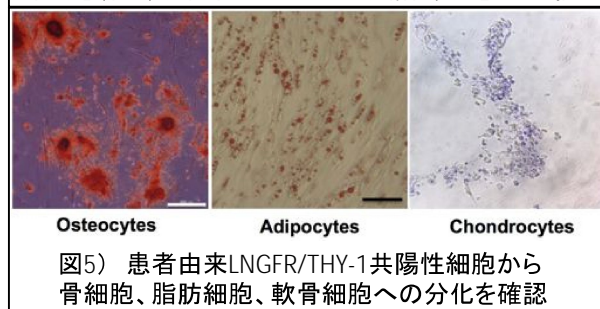


図5) 患者由来LNGFR/THY-1共陽性細胞から骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化を確認