

iPS 細胞を用いた培養・移植実験系による一卵性双生児統合失調症不一致例解析

鳥塚通弘, 芳野浩樹, 牧之段学, 岸本年史

奈良県立医科大学 精神医学講座

【研究の背景】

統合失調症は人口の約 1%を占める精神疾患であり、疫学研究、遺伝学研究、死後脳研究や画像研究、動物モデルを用いた研究など幅広く行われている。これまでのところ、複数の脆弱性遺伝子が複合的に作用して遺伝的基盤を形成し、環境要因とも相互作用しながら発病に至ると考えられているが、未だその病因・病態の解明には至っていない。例えば死後脳研究からは、統合失調症患者の大脳皮質前頭前野の錐体細胞樹状突起におけるシナプスが健常者に比して少ないことが報告されているが、発達期の形成不全なのかシナップスプルーニングが亢進しているのかを確かめた研究は無い。その一因として、倫理的な制約により、細胞培養系を用いた研究が行えないことが挙げられる。しかし、2006 年に中山伸弥氏が開発した iPS 細胞の技術を用いることで、実際にヒト神経細胞の解析が可能となつたため、本研究課題の遂行に至った。

【目的】

統合失調症患者由来の iPS 細胞から作製した神経細胞を用いて、培養系に加え、マウス脳内への移植実験による生体内での細胞動態についても解析を行い、統合失調症の細胞病態の解明を目指す。

【方法】

(i) 対象および iPS 細胞の樹立

統合失調症は症候群がベースの疾患単位と考えられるため、比較する上で適切な症例・対照が必要であり、年齢・性別をマッチさせた健常者のみでなく、一卵性双生児不一致症例ペアサンプルを用いて研究を行う。書面にて同意を得た対象者の上腕内側部等から、局所麻酔下に皮膚生検を行う。得られた皮膚から線維芽細胞を培養し、エピソーマルプラスミドベクターをエレクトロポレーションで導入し iPS 細胞を樹立する。

(ii) 培養系における解析

iPS 細胞から神経細胞の分化誘導法に関しては、ニューロスフェア法で行う。iPS 細胞から浮遊培養にてニューロスフェアを誘導し、接着させ神経細胞に分化させる。免疫染色法による組織学的解析、マイクロアレイや qRT-PCR 法による遺伝子発現解析、パッチクランプ法による電気生理学的解析を継時的に行う。

(iii) マウス脳内への移植実験

培養系で観察された現象が生体内でも観察され得るかを確かめるため、GFP で標識したヒト神経幹細胞を免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) の脳内に移植し、1-2 ヶ月後に屠殺し解析する。

【結果】

統合失調症一卵性双生児不一致症例 1 ペアと健常者 1 名のサンプルを用いて iPS 細胞株を樹立し、以後の解析を行つた。

①iPS 細胞の誘導性に群間で差は無かった。iPS 細胞の多能性細胞マーカーの発現を免疫染色法で確認したが、群間で差は認めなかった。

②iPS 細胞からニューロスフェアへの分化誘導性に差は認めず、ニューロスフェアを接着培養した後の PAX6 陽性/Nestin 陽性細胞の増殖にも差は無かった。接着培養後の細胞は、そのほとんどが vGlut1 陽性で大脳皮質の Layer marker 陽性の細胞であった。

③接着培養後、シナプス前蛋白質である Synapsin I の発現を qRT-PCR 法で継時的に測定したところ、その発現パターンに群間で有意差を認めた(Two-way ANOVA, F(2, 103) , p<0.05)。

④接着培養後 1 ヶ月、3 ヶ月の時点でのシナプス蛋白質の発現を免疫染色法で確認したところ、3ヶ月時点でのシナプス前蛋白質である Synaptophysin の発現量が、健常者と比較して双生児由来神経細胞で有意に低かった(p<0.05、Tukey-HSD)。

⑤パッチクランプ法による電気生理学的解析を接着培養後 1 ヶ月、3 ヶ月の時点で行ったところ、細胞の発火数、閾値、振幅などの性質に差は無かった。シナプス機能を反映すると考えられる自発性シナプス後電流(sPSC)の頻度、振幅についても有意差は認めなかった。

【考 察】

今回、我々の培養系で認められた結果は、統合失調症のシナプス仮説を一部支持する結果である。今後はさらにサンプルを加え、解析を進めたい。移植実験については、マウス脳内での細胞の生着・分布に課題を残し十分な解析に至っていないが、これも研究を進め、統合失調症の病因となりうる差異を同定したい。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の推進に伴い、統合失調症の細胞病態が解明されれば、新たな治療ターゲットや新たな観点からの創薬につながる可能性があり、その臨床的意義は大きい。

謝 辞

本研究は、慶應義塾大学医学部生理学教室(岡野栄之研究室)、長崎大学医歯薬学総合研究科精神神経学、奈良県立医科大学第一生理学教室との共同研究で行った。この場をお借りして改めて御礼申し上げます。