

公益財団法人 先進医薬研究振興財団  
平成26年度「特定研究助成」

## 研究成果報告書

1. 主任研究者氏名	尾崎 紀夫
2. 研究施設名 所属 職位	名古屋大学 大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻 脳神経病態制御学講座 精神医学分野 教授
3. 研究期間	平成 27年 1月 1日 ~ 平成 28年 12月 31日
4. 研究テーマ名	22q11.2欠失症候群における精神・循環器・免疫系疾患の分子病態解明
5. 研究成果の概要	
<p>染色体異常の一つである 22q11.2 欠失は、精神疾患、先天性心疾患、免疫不全等の多臓器の病態をベースにして多様な臨床症状を呈する。本研究では、日本人統合失調症 (SCZ) のゲノムコピー数変異 (CNV) 解析において同定済みの 22q11.2 欠失を有する SCZ 患者から人工多能性幹 (iPS) 細胞を樹立し、神経、心筋細胞に分化させ、多方面から対照細胞と比較することを目的とした。さらに、22q11.2 欠失症様モデルマウスの作製・解析結果とともに末梢血臨床検体での検証とあわせ、分子病態を解明し、治療法の開発に繋げることを目標とした。これまでに得られた成果と今後の方針を以下に列挙する。</p> <p><b>①CNV 解析</b></p> <p>SCZ 患者 1847 名を対象にアレイ CGH を用いて CNV 解析を実施し、22q11.2 欠失を 11 名で同定した。このうち、3Mb タイプは 10 名、1.5Mb タイプは 1 名であった。</p> <p><b>②22q11.2 欠失患者の臨床表現型解析</b></p> <p>口唇口蓋裂等で愛知学院大学歯学部に通院中の 22q11.2 欠失 (FISH で確認) 患者 8 名を対象にアレイ CGH で欠失の詳細な解析と臨床表現型について検討した。その結果、8 名全員で <i>de novo</i> の 3Mb 欠失を同定した。表現型については、口唇口蓋裂を 5 名、先天性心疾患を 7 名で認めた。また知的能力に関しては、境界知能を 2 名、中等度知的能力障害を 2 名で認めた。本患者は名大病院でフォローアップし、精神障害との関連性を検討する予定である。</p>	

### ③22q11.2 欠失のゲノム不安定性に関する検討

統合失調症の病態にゲノム不安定性の関与が示唆され、22q11.2 欠失患者のリンパ芽球細胞で DNA 損傷の修復能力低下が報告されている。そこで、22q11.2 欠失患者 7 名のリンパ芽球に放射線を照射し、生じた二重鎖切断の修復を評価した。その結果、22q11.2 欠失を持たない患者あるいは健常者のリンパ芽球と比較して、二重鎖切断を反映する gH2AX の数の増加は認めなかった。

### ④ヒト 22q11.2 欠失症モデルマウスの作製

22q11.2 欠失症候群の分子病態を個体レベルで解明するため、東京大学と共同で、CRISPR/Cas9 法を用いて、ヒト 22q11.2 領域に相当するマウス 16A 領域を欠失するコンディショナルノックアウトマウスの作製を試み、1系統候補マウスを得た。CNV の欠失を確認後、繁殖し、組織病理学的解析、行動薬理的解析を実施する予定である。

### ⑤22q11.2 欠失 iPS 細胞の樹立と品質確認

健常者 2 名、22q11.2 欠失患者 2 名（統合失調症 1 名、知的能力障害 1 名）から iPS 細胞樹立を行った。*In vitro* での三胚葉分化能確認試験および iPS 細胞由来ゲノム DNA を用いたアレイ CGH 解析を実施し、高品質 iPS 細胞株の獲得に成功した。

前述のとおり同等の樹立条件にて獲得した健常者および 22q11.2 欠失患者 iPS 細胞を用いて、iPS 細胞状態での培養状態比較、および中枢神経系への誘導比較を試みた。iPS 細胞の状態において、健常者に比して 22q11.2 欠失 iPS 細胞は細胞塊の形成速度が遅く、両者には細胞増殖能に差があると考えられた。次に、中枢神経系への誘導効率を確認するため、両群をニューロスフェア（神経幹細胞および神経前駆細胞）に分化誘導したところ、両群共ニューロスフェアへの誘導が可能であった。今後、さらに成熟した中枢神経系への分化誘導比較を行う予定である。

### ⑥22q11.2 欠失リンパ芽球様細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析

22q11.2 欠失患者の末梢分子病態の解明およびバイオマーカーへの応用を目指すため、22q11.2 欠失患者由来リンパ芽球様細胞 (LCL) を用いてトランスクリプトーム解析を実施した。健常者 9 名と 22q11.2 欠失患者 7 名において比較解析を行った結果、再現性良く低値に有意差が得られた遺伝子群は 22q11.2 欠失領域の一部であった。今後、iPS 細胞由来中枢神経系細胞も用いることで、末梢と中枢の発現比較を行う予定である。

## ⑦22q11.2 欠失 iPS 細胞の心筋細胞への分化誘導

健常者由来 iPS 細胞より心筋細胞の誘導を行い、浮遊状態の心筋細胞塊を誘導することに成功した。この細胞は経時的に拍動を行っていることが確認できた。さらに改良を加え、平面培養下での健常者由来心筋細胞集団を得ることに成功した。この細胞集団に対しカルシウム指示薬による観察を行ったところ、カルシウムシグナルが変動していることを観察した。一部の領域ではカルシウムシグナルが隣接細胞で同調して変動しており、心筋細胞の特徴を示していると考えられる。

今回樹立した高品質の22q11.2欠失患者由来iPS細胞からも同様に心筋細胞の誘導を行い、健常者との比較を行なった結果についての報告を予定している。

## 6. キーワード

(1) ゲノムコピー数変異 (CNV)	(2) 22q11.2欠失	(3) 人工多能性幹(iPS)細胞
(4) 口蓋心臓顔面症候群	(5) 統合失調症	(6) 先天性心疾患
(7) 免疫不全		

## 7. 研究発表 (印刷中も含む)

〔雑誌論文〕 計 ( 6 ) 件

著 者 名	論 文 標 題			
Yoshida, K. (他 8 名 9 番目)Ozaki, N.	Single-neuron and genetic correlates of autistic behavior in macaque			
雑 誌 名	巻・号	発 行 年	ペー ジ	
Sci Adv	2,9	2 0 1 6	pe1600558	

著 者 名	論 文 標 題			
Xing, J. (他 15 名 17 番目)Ozaki, N.	Resequencing and Association Analysis of Six PSD-95-Related Genes as Possible Susceptibility Genes for Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders			
雑 誌 名	巻・号	発 行 年	ペー ジ	
Sci Rep	6	2 0 1 6	27491	

著 者 名	論 文 標 題			
Takasaki, Y. (他 28 名 30 番目)Ozaki, N.	Mutation screening of GRIN2B in schizophrenia and autism spectrum disorder in a Japanese population			
雑 誌 名	巻・号	発 行 年	ペー ジ	
Sci Rep	6	2 0 1 6	33311	

平成 26 年度 特定研究助成 研究成果報告書

著者名	論文標題			
Kimura, H. (他 11 名 13 番目)Ozaki, N.	Identification of a rare variant in CHD8 that contributes to schizophrenia and autism spectrum disorder susceptibility			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
Schizophr Res	178,1-3	2	0 1 6	104-106

著者名	論文標題			
Ishizuka, K. (他 10 名 12 番目)Ozaki, N.	Investigation of Rare Single-Nucleotide PCDH15 Variants in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
PLoS One	11,4	2	0 1 6	e0153224

著者名	論文標題			
Nakazawa, T. (他 23 名 19 番目)Ozaki, N.	Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders			
雑誌名	巻・号	発行年		ページ
Nat Commun	7	2	0 1 6	10594

〔図書〕 計( 0 )件