

特集 2 精神疾患研究におけるヒト iPSC 研究最前線

2. iPS 細胞技術とヒト型疾患モデルマウスを用いた精神疾患の分子病態研究

中澤 敬信*

抄録：iPS 細胞技術の登場により、患者の遺伝情報を保持する神経系細胞を用いて、直接的に神経機能異常を *in vitro* で調べることが可能になった。ヒトとマウスなどのモデル生物との脳機能の種差を考慮すると、ヒト（患者）神経細胞を用いた分子病態研究が重要であると考えられ、従来の研究を補完するものとして期待されている。これまでに、多くの統合失調症患者の iPS 細胞由来分化神経細胞が作製され、分子病態解析が実施されてきており、疾患の分子病態の一端が明らかになっている。また、分子病態研究のみならず、iPS 細胞技術を用いた医薬品の探索、探索段階における薬効評価、さらには医薬品の毒性評価系の構築などの研究が精力的に進められている。iPS 細胞技術を用いた精神疾患の分子病態研究は、まだその歴史は長くなく、今後の発展が期待される。今後、基盤技術である iPS 細胞の培養・分化技術の開発、精神疾患の分子病態研究、および創薬研究がさらに発展していくことが期待される。

日本生物学的精神医学会誌 34 (2) : 75-80, 2023

Key words : schizophrenia, iPS cell, iPSC technology, patient-derived neuron, drug discovery, translational research

1. 統合失調症の分子病態研究

統合失調症の分子病態解析は、マウスや霊長類などの動物モデルを用いた研究、患者を対象とした分子遺伝学、脳画像学、神経生理学、死後脳研究、そして最近では iPS 細胞技術を用いた研究などによって推進されている。これまでのマウスなどの動物モデルを利用した研究により、病態と関連することが期待される神経細胞の発達異常、シナプス機能の異常、シナプス動態異常、神経回路レベルの異常などといったさまざまな知見が蓄積されてきた¹⁸⁾。ただし、幻覚、妄想、幻聴などの症状や、主に思春期に発症するといった病態が、マウスで再現することができるのかどうか、などが議論になっている。また、死後脳研究によって、大脳皮質神経細胞の樹状突起上のスパインの密度の低下、抑制性神経細胞を介するシグナルの異常、あるいは遺伝子の発現量変化やエピジェネティクス異常などの分子レベルの表現型などが明らかになっている。磁気共鳴画像法を用い

た研究により、前頭葉や側頭葉などの大脳皮質や、海馬、扁桃核、視床、側坐核などの大脳皮質下の体積の減少や神経細胞の機能的結合の異常などが明らかになっている。ただし、これらの手法では、詳細な分子レベルの研究は難しい場合が多い。このように、精神疾患の研究が難しい理由として、実際に活動する患者神経細胞への直接的なアクセスが困難であることが挙げられるが、iPS 細胞技術の登場により、患者の遺伝情報を保持する神経系細胞を用いて、直接的に神経機能異常を *in vitro* で調べることが可能になった。また、*NOTCH2NL* や *SRGAP2C* といったヒト固有の遺伝子が存在していることや²⁸⁾、ヒトとマウスの脳機能の種差を考慮すると⁹⁾、やはりヒト（患者）神経細胞を用いた分子病態研究が重要であると考えられ、従来の研究を補完するものとして期待されている。

Modeling schizophrenia with iPSC-derived neurons and mouse models

*東京農業大学生命科学部バイオサイエンス学科 (〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1 サイエンスポート N301) Takanobu Nakazawa : Department of Bioscience, Graduate School of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

【中澤 敬信 E-mail : tn207427@nodai.ac.jp】

2. iPS 細胞技術を用いた分子病態研究

これまでに、多くの患者の iPS 細胞由来の分化神経細胞が作製され、分子病態解析が実施されてきた^{1, 2, 16, 17, 23, 24, 30}。NEUROD1 や TBR1 などの神経細胞マーカーの発現量を指標にした研究で、患者由来神経幹細胞の神経細胞への分化異常が明らかになった³⁶。また、患者由来神経細胞において、樹状突起の伸長の低下などの形態的な異常⁷や細胞の膜電位や興奮性の異常¹²なども同定され、それらの分子基盤として、アクチン細胞骨格、カルシウムチャンネル、アポトーシス、あるいは MAPK シグナルなどのさまざまな細胞内シグナルの障害が明らかになっており、神経細胞の初期発達の異常が疾患と関連することが強く示唆されている。

ある程度成熟した神経細胞のシナプス形成やシナプス機能に関する研究も数多く報告されており、患者由来神経細胞において、神経伝達物質の放出の異常、興奮性シナプスマーカーである postsynaptic density protein 95 (PSD-95) puncta 数の低下、抑制性シナプスマーカーである Gephyrin puncta 数の低下⁷などが見いだされている。統合失調症患者の脳では、興奮性神経機能と抑制性神経機能とのバランス (E/I バランス) に異常があることが報告されているが、実際に、電気生理学的な解析やカルシウムイメージングなどの手法を用いた研究により、患者由来神経細胞において、興奮性シナプス機能の異常や^{33, 35}、神経細胞同士の機能的な結合の低下などが明らかになっている。抑制性神経機能については、患者由来抑制性神経細胞の樹状突起の発達遅延、抑制性シナプスの密度の低下、GABA の合成酵素である GAD65/67 の発現レベルの低下などの表現型^{11, 26}が観察されるものの、抑制性シナプス機能に関する報告例は少ない。

神経細胞の発達異常やシナプス機能異常のみならず、患者神経細胞における翻訳、炎症、酸化ストレスなどの細胞機能の異常、レトロトランスポゾン配列の増加、マイクロ RNA の動態変化などが報告されているが^{2, 16, 17}、近年、報告例が増加しているのがミトコンドリアに関する研究である。ミトコンドリアは、ATP の産出やカルシウムシグナルのみならず、神経活動にも関与している。患者由来神経細胞では、ミトコンドリアの形態異常、膜電位の低下、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を形成するタンパク質の発現量の低下、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) レベルの上昇、ATP 産出の低下などのミトコンドリアの機能異常が、患者由来神経細胞

で観察されており、疾患の病態にミトコンドリアの機能異常が関与していることが示唆されている^{14, 22, 37}。

神経細胞のみならず、脳の発達期におけるミクログリアの過剰な活性化やミクログリアによる過剰なシナプス刈り込みが疾患の発症に関与していることが示唆されている。実際、患者由来の iPS 細胞を分化させたミクログリアでは、健常者のものに比べて、シナプス除去が過剰であることが報告されている²⁵。また、患者由来のアストロサイトの分化や形態異常などの表現型も報告されている³⁴。

このように、近年、患者由来 iPS 細胞を分化させた神経系細胞を用いた研究が多数報告されてきており、疾患の分子病態の一端が明らかになりつつある。今後、さらに研究が進み、iPS 細胞レベルの表現型と病態との因果関係が明らかになることが期待される。

3. 統合失調症の多発家系患者の分子病態研究

iPS 細胞レベルの研究で明らかになった分子基盤情報が、実際に疾患の発症や病態にかかわっていることを確認していくには、一般的にかなりの研究を要すると考えられる。特に、疾患の病態が多岐にわたっており、また、多くの患者の病態を説明可能な疾患関連遺伝子が同定されていないことが、疾患の分子病態研究を難しくしている。筆者らは、頻度はまれであっても疾患と強く関連することが期待される遺伝子変異の表現型を明らかにし、明らかにした分子基盤情報を基に患者を層別化していくことによって、疾患の分子病態を解明するのみならず、疾患のバイオマーカー開発や個別化医療のための基礎データの蓄積が可能になるのではないかと考えている。

統合失調症の一卵性双生児の発症一致率が 50% 程度であるなどの事実から、疾患の発症に遺伝要因が関与していることが強く示唆されている。実際に、統合失調症が多発する家系が多く存在しており、それらの家系の解析の結果から、患者サンプルから N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) 型グルタミン酸受容体、SHANK2、Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ II (Calcium-calmodulin-dependent protein kinase : CaMK II) などのシナプス分子をコードする遺伝子などに変異が同定されている⁶。筆者らも統合失調症の多発家系患者の分子病態解析を実施している³⁵。筆者らが解析している家系では、統合失調症疑いを含めて 3 代にわたり患者が存在しており、遺伝的

な要因が発症に関与していることが考えられる。筆者らは、COCORO (Cognitive Genetics Collaborative Research Organization, 認知ゲノム共同研究機構)¹⁹⁾から、この家系に属する2人の患者のサンプルの提供を受け、iPS細胞を樹立し、分化神経細胞の表現型を解析した³⁵⁾。まず、患者由来iPS細胞を神経幹細胞を経て、神経細胞に分化させた。長期間培養した神経細胞のシナプス機能を解析したところ、患者由来の神経細胞では、自発性の微小興奮性シナプス後電流の振幅や頻度が有意に上昇していた。その分子基盤として、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 型グルタミン酸受容体の発現量の増加や、シナプス数の増加などの表現型を見いだした。また、興味深いことに、患者神経細胞では、抗精神病薬の標的になっているドパミン D₂ 受容体のスプライシングに異常があり、short form と long form の割合に異常があることが明らかになった。これらの結果は、患者脳内において、興奮性神経伝達が過剰になっていること、およびドパミン神経伝達にも異常があり、シナプス機能が多岐にわたって異常になっていることを示唆している。また、全エキソシーケンス解析を実施したところ、11 遺伝子座に患者特異的な変異を同定した。患者神経細胞の表現型をこれらの変異で説明できるかどうかはまだ不明であるが、変異を同定した遺伝子群のなかでも *HNRNPM* 遺伝子産物はドパミン D₂ 受容体のスプライシングにかかわることが報告されており、その変異により患者神経細胞のドパミン D₂ 受容体のスプライシングが異常になっていることが示唆される。今後、COCORO が収集している大規模患者サンプルなどを活用し、明らかにした分子病態の妥当性を評価するとともに、同定した変異と疾患との関連性を明らかにしていく計画である。

疾患と強く関連することが期待される遺伝子変異としては、上記以外にも最近の大規模サンプルの解析によって明らかになった *GRIA3*, *XPO7*, *CUL1*, *SETD1A*, *GRIN2A* 遺伝子座の変異や、患者に突然生じる *de novo* 変異、あるいは 3q29 del, 22q11.21 del, 16p11.2 distal del, 7q11.23 dup, 15q13.3 del, 2p16.3 (NRXN1) del といったゲノムコピー数変異が疾患と強く関連していることが示唆されており、変異の表現型解析が iPS 細胞やモデルマウスを用いて進められている^{4, 8, 10, 13, 15, 29)}。NRXN1 はシナプスに局在し、その構築を制御している細胞接着分子であるが、最近、2p16.3 (NRXN1) del に関して、興味深い論文が報告された²⁰⁾。2p16.3 (NRXN1)

del をもつ患者 iPS 細胞由来の神経細胞では、シナプス機能に異常がみられるが、2p16.3 (NRXN1) に対応するマウス染色体領域に欠失を導入したモデルマウスから胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) を作製し、神経細胞に分化させたところ、シナプス機能に異常がみつからなかった。2p16.3 (NRXN1) del は欠失領域のサイズに個人差があるが、基本的には NRXN1 の単独遺伝子のヘテロ欠失であり、これらの結果は、NRXN1 の機能に種差がある、もしくはマウスでは NRXN1 のヘテロ欠失を補うシステムが存在すること、などの可能性が考えられる。いずれにしても、2p16.3 (NRXN1) del の分子病態研究のためには、iPS 細胞などの患者 (ヒト) 由来のサンプルを用いることの必要があると考えられる。

4. 3D 脳オルガノイドを用いた病態研究

3D 脳オルガノイド培養では、まず神経幹細胞の層ができ、それらが分裂しつつ外側に移動しながら分化し、神経細胞の層ができることから、実際の脳の発生過程が再現されるという利点がある。特に、ヒトの大脳皮質の複雑性に関連している outer subventricular zone も観察されることが報告されている。また、神経発達だけではなく、シナプス機能の解析や神経回路に関する研究を可能にする優れたモデルシステムであり、これまでに、それほど多数ではないが、統合失調症患者の iPS 細胞由来の 3D 脳オルガノイドの解析が報告されている³²⁾。例えば、*DISC1* 遺伝子に変異をもつ患者由来 iPS 細胞を用いた脳オルガノイドでは、そのサイズが小さいことや、神経幹細胞の増殖性が低いこと²⁷⁾、また統合失調感情障害双極型の一卵性双生児の不一致例を用いた解析では、抑制性神経細胞の分化が亢進していること²³⁾などが報告されている。

以前より、ES 細胞、あるいは iPS 細胞由来の脳オルガノイドをマウス脳に移植する研究が実施されている。最近、ヒト iPS 細胞由来の脳オルガノイドをラット脳に移植した研究が報告された²¹⁾。移植された脳オルガノイドは、次第にその体積が大きくなり、脳オルガノイドを構成する個々の神経細胞のサイズも、通常の試験管内で培養したものに比べて、大きくなることが明らかになった。興味深いことに、脳オルガノイドとラット脳を構成する神経細胞間に機能的な結合が形成され、実際に、脳オルガノイドの神経細胞の活動を操作することにより、ラットの行動を操作することが可能であることが明らかに

なった。

5. iPS 細胞技術を用いた創薬研究

分子病態研究のみならず、iPS 細胞技術を用いた医薬品の探索、探索段階における薬効評価、さらには医薬品の毒性評価系の構築などの研究が精力的に進められている³⁾。患者の iPS 細胞由来神経細胞を用いた創薬のための化合物のスクリーニングについては、筋萎縮性側索硬化症⁵⁾、脊髄性筋萎縮症、あるいはパーキンソン病などの神経変性疾患ですでに有用性が示されているが³¹⁾、精神疾患の分野でも、化合物スクリーニングのみならず、そのために必要な均質な神経細胞の大規模な調製、あるいは神経細胞のさらなる成熟化を促進するための研究が進められている。

まとめ

iPS 細胞技術を用いた精神疾患の分子病態研究は、まだその歴史は長くなく、今後の発展が期待される。今後、基盤技術である iPS 細胞の培養・分化技術の開発、精神疾患の分子病態研究、および創薬研究がさらに発展していくことが期待される。なお、本論文に関して、開示すべき利益相反は存在しない。

本論文に記載した筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。

文 献

- 1) Arioka Y, Shishido E, Kushima I, et al (2021) Chromosome 22q11.2 deletion causes PERK-dependent vulnerability in dopaminergic neurons. *EBioMedicine*, 63 : 103138.
- 2) Balan S, Toyoshima M and Yoshikawa T (2019) Contribution of induced pluripotent stem cell technologies to the understanding of cellular phenotypes in schizophrenia. *Neurobiol Dis*, 131 : 104162.
- 3) Donegan JJ and Lodge DJ (2020) Stem cells for improving the treatment of neurodevelopmental disorders. *Stem Cells Dev*, 29 : 1118-1130.
- 4) Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, et al (2014) De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature*, 506 : 179-184.
- 5) Fujimori K, Ishikawa M, Otomo A, et al (2018) Modeling sporadic ALS in iPSC-derived motor neurons identifies a potential therapeutic agent. *Nat Med*, 24 : 1579-1589.
- 6) Glahn DC, Nimgaonkar VL, Raventos H, et al (2019) Rediscovering the value of families for psychiatric genetic research. *Mol Psychiatry*, 24 : 523-535.
- 7) Grunwald LM, Stock R, Haag K, et al (2019) Comparative characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived from patients with schizophrenia and autism. *Transl Psychiatry*, 9 : 179.
- 8) Hiroi N and Yamauchi T (2019) Modeling and predicting developmental trajectories of neuropsychiatric dimensions associated with copy number variations. *Int J Neuropsychopharmacol*, 22 : 488-500.
- 9) Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, et al (2019) Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, 573 : 61-68.
- 10) Howrigan DP, Rose SA, Samocha KE, et al (2020) Exome sequencing in schizophrenia-affected parent-offspring trios reveals risk conferred by protein-coding de novo mutations. *Nat Neurosci*, 23 : 185-193.
- 11) Kathuria A, Lopez-Lengowski K, Watmuff B, et al (2019) Synaptic deficits in iPSC-derived cortical interneurons in schizophrenia are mediated by NLGN2 and rescued by N-acetylcysteine. *Transl Psychiatry*, 9 : 321.
- 12) Khan TA, Revah O, Gordon A, et al (2020) Neuronal defects in a human cellular model of 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Med*, 26 : 1888-1898.
- 13) Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, et al (2018) Comparative analyses of copy-number variation in autism spectrum disorder and schizophrenia reveal etiological overlap and biological insights. *Cell Rep*, 24 : 2838-2856.
- 14) Li J, Ryan SK, Deboer E, et al (2019) Mitochondrial deficits in human iPSC-derived neurons from patients with 22q11.2 deletion syndrome and schizophrenia. *Transl Psychiatry*, 9 : 302.
- 15) Marshall CR, Howrigan DP, Merico D, et al (2017) Contribution of copy number variants to schizophrenia from a genome-wide study of 41,321 subjects. *Nat Genet*, 49 : 27-35.
- 16) Nakazawa T (2022) Modeling schizophrenia with iPSC cell technology and disease mouse models. *Neurosci Res*, 175 : 46-52.
- 17) Nakazawa T, Hashimoto R, Takuma K, et al (2019) Modeling of psychiatric disorders using induced pluripotent stem cell-related technologies. *J Pharmacol Sci*, 140 : 321-324.

- 18) Onitsuka T, Hirano Y, Nakazawa T, et al (2022) Toward recovery in schizophrenia : Current concepts, findings, and future research directions. *Psychiatry Clin Neurosci*, 76 : 282–291.
- 19) Onitsuka T, Hirano Y, Nemoto K, et al (2022) Trends in big data analyses by multicenter collaborative translational research in psychiatry. *Psychiatry Clin Neurosci*, 76 : 1–14.
- 20) Pak C, Danko T, Mirabella VR, et al (2021) Cross-platform validation of neurotransmitter release impairments in schizophrenia patient-derived NRXN1-mutant neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 118 : e2025598118.
- 21) Revah O, Gore F, Kelley KW, et al (2022) Maturation and circuit integration of transplanted human cortical organoids. *Nature*, 610 : 319–326.
- 22) Robicsek O, Karry R, Petit I, et al (2013) Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*, 18 : 1067–1076.
- 23) Sawada T, Chater TE, Sasagawa Y, et al (2020) Developmental excitation-inhibition imbalance underlying psychoses revealed by single-cell analyses of discordant twins-derived cerebral organoids. *Mol Psychiatry*, 25 : 2695–2711.
- 24) Sebastian R, Song Y and Pak C (2022) Probing the molecular and cellular pathological mechanisms of schizophrenia using human induced pluripotent stem cell models. *Schizophr Res*, Online ahead of print. doi : 10.1016/j.schres.2022.06.028.
- 25) Sellgren CM, Gracias J, Watmuff B, et al (2019) Increased synapse elimination by microglia in schizophrenia patient-derived models of synaptic pruning. *Nat Neurosci*, 22 : 374–385.
- 26) Shao Z, Noh H, Bin Kim W, et al (2019) Dysregulated protocadherin-pathway activity as an intrinsic defect in induced pluripotent stem cell-derived cortical interneurons from subjects with schizophrenia. *Nat Neurosci*, 22 : 229–242.
- 27) Srikanth P, Lagomarsino VN, Muratore CR, et al (2018) Shared effects of DISC1 disruption and elevated WNT signaling in human cerebral organoids. *Transl Psychiatry*, 8 : 77.
- 28) Suzuki IK, Gacquer D, Van Heurck R, et al (2018) Human-specific NOTCH2NL genes expand cortical neurogenesis through Delta/Notch regulation. *Cell*, 173 : 1370–1384.
- 29) Takumi T and Tamada K (2018) CNV biology in neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol*, 48 : 183–192.
- 30) Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, et al (2016) Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. *Transl Psychiatry*, 6 : e934.
- 31) Trudler D, Ghatak S and Lipton SA (2021) Emerging hiPSC models for drug discovery in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*, 22 : 8196.
- 32) Wang M, Zhang L and Gage FH (2020) Modeling neuropsychiatric disorders using human induced pluripotent stem cells. *Protein Cell*, 11 : 45–59.
- 33) Wen Z, Nguyen HN, Guo Z, et al (2014) Synaptic dysregulation in a human iPSC cell model of mental disorders. *Nature*, 515 : 414–418.
- 34) Windrem MS, Osipovitch M, Liu Z, et al (2017) Human iPSC glial mouse chimeras reveal glial contributions to schizophrenia. *Cell Stem Cell*, 21 : 195–208. e6.
- 35) Yamamoto K, Kuriu T, Matsumura K, et al (2021) Multiple alterations in glutamatergic transmission and dopamine D2 receptor splicing in induced pluripotent stem cell-derived neurons from patients with familial schizophrenia. *Transl Psychiatry*, 11 : 548.
- 36) Yu DX, Di Giorgio FP, Yao J, et al (2014) Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2 : 295–310.
- 37) Zuccoli GS, Nascimento JM, Codo AC, et al (2020) Mitochondrial, cell cycle control and neuritogenesis alterations in an iPSC-based neurodevelopmental model for schizophrenia. *BioRxiv*, doi : <https://doi.org/10.1101/2020.09.04.282046>.

■ ABSTRACT

Modeling schizophrenia with iPSC-derived neurons and mouse models

Takanobu Nakazawa

Department of Bioscience, Graduate School of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture

Thanks to iPSC cell technology, it is now possible to directly investigate neuronal dysfunction *in vitro* using neural cells that retain the patient's genetic background. Considering the species differences in brain functions between humans and model organisms such as mice, molecular and cellular pathological research using human (patient) neurons is important, which is expected to complement conventional research. To date, many iPSC cell-differentiated neurons derived from patients with schizophrenia have been generated and analyzed for the molecular and cellular pathogenesis of the disease. Accordingly, promising candidates for the molecular and cellular pathogenesis of the disease have been elucidated. The molecular and cellular pathological research of psychiatric disorders using iPSC cell technology has relatively a short history, and thus the research is expected to be further developed. In addition to studies on the molecular and cellular pathogenesis of the disease, iPSC cell technology is also useful for the establishment of a system for drug screening, evaluation of drug efficacy in the preclinical stages, and evaluation of the neurotoxicity of drugs. In the future, research using iPSC technology will not only clarify the molecular and cellular pathogenesis of the disease, but will also lead to the success of drug discovery.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 34 (2) : 75-80, 2023)
