

特集 2 統合失調症研究アップデート—基礎研究から社会実装研究まで—**1. iPS 細胞関連技術とヒト型疾患モデルマウスを用いた精神疾患のトランスレーショナル研究**

中澤 敬信*

抄録：臨床データを保持する統合失調症患者の iPS 細胞由来分化神経細胞の解析は、疾患の分子病態の本質を明らかにすることに直結するものと期待される。しかし、iPS 細胞技術を用いた細胞レベルの研究では、解析で明らかになった分子メカニズムが実際の精神活動に関与していることを実証することは難しい。そのため、分子・細胞レベルの解析のみならず、妥当性の高い精神疾患モデルマウスなどを用いた神経回路レベル、行動レベルの解析を融合的に実施することが重要である。この際、iPS 細胞技術は、マウスなどを用いた基礎研究とヒト臨床研究とを包括的に解釈することを可能にする点でも重要である。今後、iPS 細胞技術を用いた疾患研究によって、統合失調症の分子病態が明らかになるのみならず、疾患のバイオマーカーの開発、分子病態に基づいた疾患の層別化、治療薬開発のためのモデル系の構築、さらには中枢神経系の創薬の成功につながることを期待される。

日本生物学的精神医学会誌 33 (4) : 183-188, 2022

Key words : schizophrenia, autism spectrum disorders, iPSC technology, patient-derived neurons, disease mouse model, translational research

1. 統合失調症について

統合失調症は、主に思春期から青年期に発症する精神障害であり、約 100 人に 1 人が発症する頻度の高い疾患である。現存する主要な抗精神病薬を用いても十分に治療されない患者も多く、根本的な治療法が存在しないため、病態機序に基づいた治療法を開発する重要性が指摘されている。これまでのさまざまな臨床的・基礎的研究により、さまざまな病態仮説が提唱されている。1950 年代にクロルプロマジンやハロペリドールが臨床に導入され、抗精神病薬のドパミン D2 受容体の遮断作用が注目されるようになった。さらに、さまざまな抗精神病薬の臨床用量がドパミン D2 受容体遮断作用と相関することなどから、ドパミン D2 受容体の遮断作用が抗精神病薬の作用に本質的であることが明らかになり^{8, 35)}、ドパミン神経機能の過剰な活性化が統合失調症の病態であるとするドパミン仮説が提唱された^{7, 18)}。また、グルタミン酸仮説、セロトニン仮説、GABA 仮説、および発達障害仮説といった病態仮説

が提唱されているが^{5, 25, 43)}、統合失調症の明確な分子病態は未だに解明されておらず、未知の部分が大きく残されている。

2. 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、患者を対象とした分子遺伝学研究、死後脳研究、および動物モデルを用いた神経科学研究などによって進められてきた。新たな病態仮説に基づく創薬のためには、分子標的を探索・同定することが重要であり、患者を対象とした分子遺伝学研究が精力的に行われてきた²⁰⁾。2014 年には、大規模なサンプル数を用いたゲノムワイドの関連解析により、108 遺伝子座に統合失調症と関連する一塩基多型が同定された。それらにはドパミン系やグルタミン酸系などの統合失調症の分子病態仮説に関連する産物をコードする遺伝子座やシナプス可塑性などに関連する産物をコードする遺伝子座の近傍に存在するものが多く含まれており、それらのオッズ比は高いものでも 1.3 程度ではある

Modeling schizophrenia with iPSC-derived neurons and genetically engineered mice

*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】

が、示唆に富んでいる結果である³⁴⁾。また、近年、頻度の高い一塩基多型のみならず、頻度はまれではあるが、疾患と強く関連することが示唆されている *GRIA3*, *XPO7*, *CUL1*, *SETD1A*, *GRIN2A* といった遺伝子座上の変異や 3q29 del, 22q11.2 del, 16p11.2 distal del, 7q11.23 dup, 15q13.3 del, 2p16.3 (*NRXN1*) del などのゲノムコピー数変異、あるいは患者に突然生じる *de novo* 変異などに注目が集まっている^{13, 19, 23, 36)}。死後脳研究は統合失調症脳における mRNA レベル、タンパク質レベル、タンパク質の翻訳後修飾、あるいはエピジェネティクスなどの分子レベルの異常を直接解析することができるという利点があり、統合失調症の分子病態の解明につながる基礎データが蓄積されている。また、マウスなどの動物モデルを利用した研究では、神経生理学、および行動実験学的な解析などを融合的に実施することにより、直接的に統合失調症様病態の解析を分子レベルで実施することが可能である。これまでに、さまざまなシナプスの発達や機能を制御する疾患関連分子群などの遺伝子改変マウスが多数作出されており、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、および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いる。先述の病態仮説に関するモデルマウスの 1 つとして NMDA 受容体の Glutamate receptor ionotropic, NMDA1 (*GluN1*) サブユニットのノックダウンマウスが作出され、自発運動量の増加や社会行動の障害などの表現型が観察された²⁸⁾。また、GABA 神経細胞特異的な *GluN1* サブユニットの欠損マウスでは、大脳皮質のパルブアルブミンや Glutamate decarboxylase 67 (*GAD67*) の発現低下とともに、Y 迷路試験における作業記憶の障害やプレパルス抑制の低下といった疾患と関連する表現型が観察されている⁴⁾。パルブアルブミン神経細胞特異的な *GAD67* の欠損マウスでは、社会行動異常やプレパルス抑制の低下が観察されている¹⁴⁾。

3. iPS 細胞関連技術を用いた統合失調症の分子病態研究

ヒト固有の遺伝子が存在するといった知見などを考慮すると^{16, 38)}、マウスを用いた研究では、ヒトとマウスの種差を考慮する必要があり、動物モデルを用いた研究のみならず、患者神経細胞に直接的にアクセスする研究の重要性が指摘されてきた。2006～2007年にiPS細胞技術が報告されて以来^{39, 40)}、特定の患者由来の神経系細胞が作製され、分子病態

研究が実施されてきた。統合失調症分野では、2011年に、*DISC1* 遺伝子に変異をもつ患者由来のiPS細胞が患者の線維芽細胞から初めて樹立された⁹⁾。その後、次々に患者由来iPS細胞の樹立と解析の報告がなされ、患者由来iPS神経細胞における神経系細胞の発達異常、シナプスの発達異常、シナプス機能異常、およびさまざまな細胞内シグナル伝達機構の異常などが見いだされている^{3, 17, 27, 29, 32, 44)}。患者由来iPS細胞を用いた解析の利点として、直接的に患者と同じ遺伝的背景をもつ神経細胞の解析が可能となることが挙げられる。近年の大規模なゲノム研究により、次々と疾患関連遺伝子が同定されてきており、そのような遺伝学的データおよび病態解析データを保持する患者のiPS細胞由来分化神経細胞の解析は、疾患の分子病態の本質を明らかにすることに直結するものと期待される。しかし、iPS細胞技術を用いた細胞レベルの研究では、解析で明らかになった分子メカニズムが実際の精神活動に関与していることを実証することは難しい。その問題を克服するためには、分子・細胞レベルの解析のみならず、個体の神経回路レベル、行動レベルなどの解析を融合的に実施することが重要である。この際、生体の脳組織にアクセスできないヒトで分子病態研究を実施することは技術的にも倫理的にも不可能であり、患者に起きている遺伝子変異をそのまま導入することによって作製したヒト型精神疾患モデルマウスなどの妥当性の高い疾患モデルを用いることが重要である。このような融合的な研究において、iPS細胞技術は、疾患モデルを用いた基礎研究とヒト臨床研究とを包括的に解釈することを可能にするという点でも重要であると考えられる。

4. 効果サイズが大きい変異をもつ患者由来のiPS細胞を用いた研究

精神疾患分野では、従来のゲノムワイドの遺伝学的解析などの方法では、患者に共通した疾患関連遺伝子を同定することができていない。したがって、患者に共通する変異のみならず、頻度はまれではあるが、病態に直結することが期待される効果サイズが大きい変異の表現型を解析することが重要である。特に、疾患とのかかわりが強く示唆されるゲノムコピー数変異や発症に大きく寄与すると考えられている *de novo* 突然変異、および統合失調症多発家系患者などの分子病態の理解に直結する変異の研究が重要である^{13, 19, 20, 23, 36)}。この際、治療履歴や脳機能検査データといった臨床情報を保持する患者サン

ルを扱うことは、患者由来神経細胞を用いた研究で得られたデータの解釈に役立つと期待される^{22, 30, 45)}。

疾患とのかかわりが強く示唆されるゲノムコピー数変異のうち、22q11.2delについては多くの論文が報告されており、患者 iPS 細胞由来神経細胞において、miRNA 発現の異常、レトロトランスポゾン LINE-1 のコピー数の増加、患者神経幹細胞における miRNA や MAP キナーゼの発現変化や神経細胞への分化異常、および患者 iPS 細胞由来の中脳ドパミン神経細胞における小胞体の機能にかかわる PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) の発現低下や小胞体ストレスにかかわるシステムの異常などが見いだされている^{1, 6, 42, 47)}。2014 ~ 2015 年には、15q11.2 del をもつ患者由来の iPS 細胞が樹立された^{10, 46)}。15q11.2 del 領域内にはアクチン細胞骨格を制御する *CYFIP1* 遺伝子が含まれており、実際、患者 iPS 細胞由来の神経細胞では、*CYFIP1* の発現が低下しているとともに、細胞の極性異常や樹状突起の形態異常がみられる。16p11.2del や 16p11.2dup をもつ患者およびそれらのゲノムコピー数変異を導入した iPS 細胞由来の神経細胞では、神経細胞の発達や形態に異常が生じていることやシナプス機能にも異常があることが明らかになっている^{12, 26, 33, 37)}。*NRXN1* 遺伝子の欠損である 2p16.3del については、患者 iPS 細胞由来神経細胞において、神経伝達物質の放出に異常がある^{2, 11, 24, 31)}。16p13.11dup をもつ患者の iPS 細胞由来神経幹細胞では NFκB シグナルに異常があり、その増殖に異常がある²¹⁾。15q13.3del をもつ患者の iPS 細胞由来の神経細胞では、転写制御やエピゲノム制御に異常がある。これらのゲノムコピー数変異については、ヒトの欠失もしくは重複領域の相同領域を改変した疾患モデルマウスも作出されており、解析が進んでいる^{15, 41)}。

まとめ

統合失調症は遺伝的要因と環境的要因が複雑に絡み合う多因子疾患であり、発症に必要なかつ十分な遺伝子変異は同定されていないうえに、病態も多岐にわたっている。したがって、疾患の理解や患者選択的な治療戦略の構築のためには、分子病態に基づいて疾患を層別化し、個々の患者群の分子病態を個別に明らかにしていくことが重要である。疾患と強く関連していることが示唆されている遺伝子変異やゲノムコピー数変異などの表現型解析は、分子病態に基づいた患者群の層別化を可能にすることが期待さ

れる。この際、患者 iPS 細胞由来の神経細胞、患者から同定された遺伝子変異をそのまま導入した疾患モデル、および患者の臨床データを包括的に活用し、融合的な解析をすることによって、病態の本質にせまることが重要である。中枢神経系の創薬は成功率がきわめて低い。今後、iPS 細胞技術を用いた疾患研究によって、統合失調症の分子病態が明らかになるのみならず、疾患のバイオマーカーの開発、治療薬開発のためのモデル系の構築、ひいては中枢神経系の創薬の成功につながることを期待される。

なお、本論文に関して、開示すべき利益相反は存在しない。

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) Avazzadeh S, McDonagh K, Reilly J, et al (2019) Increased Ca²⁺ signaling in NRXN1α^{+/-} neurons derived from ASD induced pluripotent stem cells. *Mol Autism*, 10 : 52.
- 3) 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.
- 4) Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, et al (2010) Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci*, 13 : 76-83.
- 5) Birnbaum R and Weinberger DR (2017) Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 18 : 727-740.
- 6) Bundo M, Toyoshima M, Okada Y, et al (2014) Increased l1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia. *Neuron*, 81 : 306-313.
- 7) Carlsson A (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1 : 179-186.
- 8) Carlsson A (2001) A half-century of neurotransmitter research : impact on neurology and psychiatry. Nobel lecture. *Biosci Rep*, 21 : 691-710.
- 9) Chiang CH, Su Y, Wen Z, et al (2011) Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Mol Psychiatry*, 16 : 358-360.
- 10) Das DK, Tapias V, D'Aiuto L, et al (2015) Genetic

- and morphological features of human iPSC-derived neurons with chromosome 15q11.2 (BP1-BP2) deletions. *Mol Neuropsychiatry*, 1 : 116-123.
- 11) Deneault E, Faheem M, White SH, et al (2019) CNTN5^{-/+} or EHMT2^{-/+} human iPSC-derived neurons from individuals with autism develop hyperactive neuronal networks. *Elife*, 8 : e40092.
 - 12) Deshpande A, Yadav S, Dao DQ, et al (2017) Cellular phenotypes in human iPSC-derived neurons from a genetic model of autism spectrum disorder. *Cell Rep*, 21 : 2678-2687.
 - 13) Fromer M, Pocklington AJ, Kavanagh DH, et al (2014) De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature*, 506 : 179-184.
 - 14) Fujihara K, Miwa H, Kakizaki T, et al (2015) Glutamate decarboxylase 67 deficiency in a subset of GABAergic neurons induces schizophrenia-related phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 40 : 2475-2486.
 - 15) 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.
 - 16) Hodge RD, Bakken TE, Miller JA, et al (2019) Conserved cell types with divergent features in human versus mouse cortex. *Nature*, 573 : 61-68.
 - 17) Hoffmann A, Ziller M and Spengler D (2019) Progress in iPSC-based modeling of psychiatric disorders. *Int J Mol Sci*, 20 : 4896.
 - 18) Howes OD and Kapur S (2009) The dopamine hypothesis of schizophrenia : version III — the final common pathway. *Schizophr Bull*, 35 : 549-562.
 - 19) 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.
 - 20) Ikeda M, Takahashi A, Kamatani Y, et al (2019) Genome-Wide Association Study detected novel susceptibility genes for schizophrenia and shared transpopulations/diseases genetic effect. *Schizophr Bull*, 45 : 824-834.
 - 21) Johnstone M, Vasistha NA, Barbu MC, et al (2019) Reversal of proliferation deficits caused by chromosome 16p13.11 microduplication through targeting NFκB signaling : an integrated study of patient-derived neuronal precursor cells, cerebral organoids and in vivo brain imaging. *Mol Psychiatry*, 24 : 294-311.
 - 22) Kikuchi M, Nakazawa T, Kinoshita M, et al (2021) Methylation analysis in monozygotic twins with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Front Psychiatry*, 12 : 734606.
 - 23) 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.
 - 24) Lam M, Moslem M, Bryois J, et al (2019) Single cell analysis of autism patient with bi-allelic NRXN1-alpha deletion reveals skewed fate choice in neural progenitors and impaired neuronal functionality. *Exp Cell Res*, 383 : 111469.
 - 25) Lewis DA, Hashimoto T and Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 6 : 312-324.
 - 26) Li J, Brickler T, Banuelos A, et al (2021) Overexpression of CD47 is associated with brain overgrowth and 16p11.2 deletion syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 118 : e2005483118.
 - 27) Michael Deans PJ and Brennand KJ (2021) Applying stem cells and CRISPR engineering to uncover the etiology of schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol*, 69 : 193-201.
 - 28) Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, et al (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98 : 427-436.
 - 29) 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.
 - 30) Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, et al (2017) Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPSCs from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophr Res*, 181 : 75-82.
 - 31) 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.
 - 32) Powell SK, O'Shea CP, Shannon SR, et al (2020) In-

- vestigation of schizophrenia with human induced pluripotent stem cells. *Adv Neurobiol*, 25 : 155–206.
- 33) Roth JG, Muench KL, Asokan A, et al (2020) 16p11.2 microdeletion imparts transcriptional alterations in human iPSC-derived models of early neural development. *Elife*, 9 : e57178.
- 34) Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511 : 421–427.
- 35) Seeman P (1980) Brain dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 32 : 229–313.
- 36) Singh T, Neale BM, and Daly MJ (2020) Exome sequencing identifies rare coding variants in 10 genes which confer substantial risk for schizophrenia. medRxiv.
- 37) Sundberg M, Pinson H, Smith RS, et al (2021) 16p11.2 deletion is associated with hyperactivation of human iPSC-derived dopaminergic neuron networks and is rescued by RHOA inhibition in vitro. *Nat Commun*, 12 : 2897.
- 38) 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. e16.
- 39) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131 : 861–872.
- 40) Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 : 663–676.
- 41) Takumi T and Tamada K (2018) CNV biology in neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol*, 48 : 183–192.
- 42) Toyoshima M, Akamatsu W, Okada Y, et al (2016) Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. *Transl Psychiatry*, 6 : e934.
- 43) Uno Y and Coyle JT (2019) Glutamate hypothesis in schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*, 73 : 204–215.
- 44) Wen Z, Christian KM, Song H, et al (2016) Modeling psychiatric disorders with patient-derived iPSCs. *Curr Opin Neurobiol*, 36 : 118–127.
- 45) 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.
- 46) Yoon KJ, Nguyen HN, Ursini G, et al (2014) Modeling a genetic risk for schizophrenia in iPSCs and mice reveals neural stem cell deficits associated with adherens junctions and polarity. *Cell Stem Cell*, 15 : 79–91.
- 47) Zhao D, Lin M, Chen J, et al (2015) MicroRNA profiling of neurons generated using induced pluripotent stem cells derived from patients with schizophrenia and schizoaffective disorder, and 22q11.2 del. *PLoS One*, 10 : e0132387.

■ ABSTRACT

Modeling schizophrenia with iPSC-derived neurons and genetically engineered mice

Takanobu Nakazawa

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

Schizophrenia is a multifactorial disease in which genetic and environmental factors are intricately intertwined. Currently, the molecular pathogenesis of the disease remains unclear. Considering many patients are not adequately treated with the major antipsychotic drugs, it is important to stratify the disease based on molecular pathogenesis and to clarify the molecular pathogenesis of each patient group individually in order to understand the disease and to develop patient-selective treatment strategies. Analysis of iPSC-derived neurons from patients will directly lead to the clarification of the molecular pathology of the disease. It is also important to conduct not only molecular and cellular level analyses using iPSC-derived neurons from patients, but also neural circuit level and behavioral level analyses using mouse models of the disease, which are generated by introducing the genetic mutations occurring in the patients. In these studies, the use of patient-derived iPSCs enables cross-species verification. CNS drug discovery has an extremely low success rate. In the future, research using iPSC technology will not only clarify the molecular pathogenesis of the disease, but will also lead to molecular pathogenesis-based stratification of the disease, construction of model systems for the development of therapeutic drugs, and ultimately to the success of CNS drug discovery.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 33 (4) : 183-188, 2022)
