

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 精神障害のゲノム変異を起点としたバイオリソースと臨床情報の活用による
非競争的フェーズにおける産学連携創薬の基盤構築
Drug discovery platform for mental disorders by industry-academia collaboration in non-competitive
phase based on pathogenic variants using clinical information and bioresource.

研究開発実施期間： 令和元年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：尾崎 紀夫
Norio Ozaki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人東海国立大学機構・名古屋大学大学院医学系研究科精神疾患病態解明学・特任教授
National University Corporation Tokai National Higher Education and Research System・Pathophysiology
of Mental Disorders Nagoya University Graduate School of Medicine・Designated Professor

II 研究開発の概要

本研究課題に先んじて、研究開発代表者尾崎及び名古屋大学内分担研究者等(以下尾崎等と略)は、「非競争フェーズ」において、アカデミアが有する非臨床・臨床情報の一体化情報を企業に提供、および仲介役となって企業間の意見交換を促進するとともに、企業ニーズに基づくバックキャスト型の進め方を重視した精神障害の産学コンソーシアム (NU-CoPR) を設立していた。本課題の目的は、製薬企業3社 (A社、B社、C社) と共にこの産学コンソーシアムを発展させ、創薬に直結する「競争的フェーズ」への移行を加速することである。以下に項目ごとの成果の概要を記載する。

項目1 精神障害患者由来 iPS 細胞の樹立

(名古屋大学)

本研究開発実施期間中に計8例の患者から iPS 細胞を樹立した。さらに、A社に患者の脳波データ、B社に患者9例と健常者9例の血液検体、C社に患者5例と健常者3例の iPS 細胞を提供した。また、iPS 細胞から誘導した神経前駆細胞を対象とした bulk RNA シークエンス解析を実施した結果、リスクゲノム変異を保有する患者で発現変化していた遺伝子は、共通して神経発生・発達関係や細胞形態・骨格関係の分子カテゴリに集積することが明らかとなった。

項目2 ヒト神経細胞動態・形態に対する化合物薬効評価

(名古屋大学)

「非競争的フェーズ」として、精神障害患者由来 iPS 細胞を用いた化合物評価を実施した。用いた化合物ライブラリーは B 社から提供された 271 種類の化合物とし、薬効評価の指標とする表現型は神経突起長（患者 iPS 細胞から誘導した神経細胞では共通して突起長短縮が認められる）とした。22q11.2 欠失患者と MeCP2 変異患者それぞれの iPS 細胞から誘導した神経細胞の突起長に対する化合物の効果スクリーニングしたところ、共通して突起長促進効果があった化合物 X を同定した。そこで、化合物 X と類似の構造をもつ他の化合物および、化合物 X と同じ分子に作用する他の化合物を用いて、健常者および患者（22q11.2 欠失と MeCP2 変異）iPS 細胞由来神経細胞を対象とした追加スクリーニングを実施した。その結果、健常者 iPS 細胞由来の神経細胞では濃度依存的な突起伸長作用の再現性がとれたものの、患者ではその効果が十分に得られなかった。

また、名古屋大学における新たな化合物評価系構築に向けては、神経細胞の電気活動を指標とした評価系構築を進めた。微小電極アレイを用いた iPS 細胞由来興奮性神経細胞の電気活動測定系に加え、脳オルガノイドを用いた電気活動測定系構築にも成功した。

(B 社)

i) 名古屋大学での精神障害患者由来 iPS 細胞を用いた薬効評価に供する化合物ライブラリー計 271 化合物（アノテーション付きの化合物ライブラリー）を選定して送付した。本アッセイにおいて効果を認めた化合物 X に着目し、次に化合物 X と同じ分子に作用する他の関連化合物群の提供を行い、薬効評価のバリデーション実験を実施した（健常者由来細胞および患者由来細胞）。その結果、健常者由来の細胞での結果とは異なり、患者由来細胞では化合物の濃度依存的な効果が十分に得られず、再検討が必要となる結果となった。本結果は定例会において共有した。

ii) 名古屋大学より提供された健常者および精神障害患者の血漿サンプル（各 9 例ずつ）を用いて神経細胞由来エクソソームの単離し、エクソソーム中の遺伝子発現解析を RNA シークエンスにより行った。得られたデータを用いてバイオインフォマティクス解析（エンリッチメント解析）を行ったところ、細胞接着や、細胞骨格に関連する分子パスウェイの変化が示唆された。本遺伝子発現解析データは定例会において共有した。

(C 社)

精神障害患者由来 iPS 細胞①を大脳皮質オルガノイドへ分化誘導した結果、細胞凝集塊の大きさが健常者株と異なることを見出した。この表現型は、疾患原因遺伝子の正常型を健常者株の発現量にまで戻すことで、表現型が回復することを確認し、疾患表現型であることを検証した。また、低分子によってもこの表現型を改善できることが確認できたため、化合物評価系として活用できるように改良を加え、本評価系を用いて競争フェーズに移行することとした。精神障害患者由来 iPS 細胞②については、大脳皮質へ分化誘導後に分散培養し、神経突起長を測定した結果、突起長の伸長が異なる現象が観察された。こちらも化合物評価が可能な系にまで改良を加え、短期間で先述の表現型が検出できるようになり、また陽性対照薬の改善効果も確認できるようになった。

項目 3 ゲノム変異モデルマウスの作製と表現型解析

(名古屋大学)

本項目の a. 精神障害モデルマウスの作製、b. 精神障害モデルマウスの *in vitro* 神経細胞形態解析、c. 精神障害モデルマウスの組織病理学的解析および一般行動表現型解、d. 精神障害モデルマウスの概日リズム解析、を担当しいずれの研究項目についても計画通りに達成された。

特に項目 c のモデルマウスの組織病理学的解析について、項目 d の概日リズム解析の成果にヒントを得て、A 社と共同で PCDH15 欠失マウスを対象として、全脳 *c-fos* マッピングを実施した。マウスの覚醒・休息時の 2 点では全く異なる様相が得られた。点灯時休息期にはマウスの活動量と体温の著しい低下と消灯時活動期には著しい体温の上昇と活動量の激しい亢進が認められた。一つの仮説ではあるが、このモデルマウスの病態は Yakovlev

回路に関係している可能性を考えた。さらに 22q11.2 欠失においても c-fos マッピングを本課題内で実施した。一つの考察として、記憶の重要な回路である Papez の回路に関係している可能性を示唆するものであった。

研究項目 a では、新たに Cacna1c-A36V 変異モデルマウスおよび Mecp2-T158M 変異モデルマウスを構築した。MeCP2-T158M 変異モデルマウスは繁殖し次世代を得ることはできなかった。そのほか、ニーズに合わせて 22q11.2 欠失マウスについてコンディショナルノックアウトマウスを作製した。他研究課題で構築したモデルマウスを含めたリストについては参画企業と共有した。研究項目 b については、モデルマウス胎児脳の primary culture neuron の培養による形態異常について共有した。

(A 社)

名古屋大学から MeCP2-R255X 変異モデルマウスを入手し、表現型解析を実施した。その結果、本モデルマウスにおいて、生存率の低下、体重減少、常同行動、自発運動量の低下、および認知機能障害が認められた。また、名古屋大学から精神障害患者の脳波を入手し、本モデルマウスの脳波との比較解析を実施した。その結果、レット症候群患者とモデルマウスに共通して変動する Multiscale entropy (MSE) のパラメーターを見いだした。

項目 4 産学コンソーシアムの円滑な運営とプロジェクトの推進

(名古屋大学)

参画企業 3 社を交えた研究進捗の共有を目的とした会合について、キックオフミーティングをスタートに四半期に 1 回の頻度で実施した。本会合において企業間の意見交換を促進し、其処から得られた企業ニーズに基づくバックキャスト型の進め方に則り、創薬に直結する「競争的フェーズ」への移行の加速 (5 件) を実現することが出来た。

Prior to this research project, Prof. Ozaki (the Principal Investigator) and other members of Nagoya University (Co-Principal Investigators) had established the industry-academia consortium (Nagoya University Consortium for Psychiatric disorders Research: NU-CoPR) that provides integrated non-clinical and clinical information to companies, promotes the exchange of opinions between companies, and facilitates the back-casting approach based on the needs of companies at the "Non-Competitive Phase." This project aims to develop this industry-academia consortium with three pharmaceutical companies (Company A, Company B, and Company C) and to accelerate the transition to the "Competitive Phase," which directly links to drug discovery. An outline of this project's achievement is described below.

1. Establishment of iPS cells derived from patients with mental disorders.

(Nagoya University)

iPS cells were established from a total of eight patients. In addition, EEG data from four patients were provided to Company A, blood samples from nine patients and nine healthy subjects were provided to Company B, and iPS cells from five patients and three healthy controls were provided to Company C. Bulk-RNA sequencing analysis of neural progenitor cells differentiated from the patient- and healthy control-derived iPS cells revealed that the differentially expressed genes commonly in patients with risk genome variants were enriched in terms related to neurogenesis/development and cell morphology/skeleton.

2. Drug screening using human neuronal cell kinetics and morphology.

(Nagoya University)

Drug screening using patient-derived iPSCs was conducted as a "Non-Competitive Phase". The phenotype used as an index of drug efficacy was neurite elongation (shortening of neurite outgrowth is commonly observed in neuronal cells derived from patient iPS cells). Among 271 compounds provided by Company B, Nagoya University identified compound X which had a positive effect on promoting neurite length. Then, Nagoya University conducted an additional screening using other compounds with a similar structure and/or the same pharmacological action to compound X. As a result, the reproducibility was not obtained in the case of using patient-derived iPSCs although could be observed when using healthy control-derived iPSCs. In addition, Nagoya University succeeded in measuring system of electrical activity using excitatory neurons and brain organoids.

(Company B)

- i. Company B sent the 271 compounds with annotations to Nagoya University. Based on the result of 1st screening, Company B focused on compound X and then provided the other additional compounds related to compound X.
- ii. Using blood samples from nine patients and nine healthy subjects provided by Nagoya University, Company B isolated neuronal cell-derived exosomes and compared their gene expression by bulk-RNA sequencing. Bioinformatics analysis suggested that molecular pathways related to cell adhesion and the cytoskeleton were altered in the patient-derived samples. (Company C)

Company C found that the size of patient iPSC-derived cortical organoids was different from that of the healthy control iPSC-derived cortical organoids. This phenotype was ameliorated by rescuing the genomic variants and treating the small molecules. In addition, Company C observed that neurite outgrowth in patient-derived neurons differed from the healthy control-derived neurons. The positive control compound ameliorated this phenotype.

3. Generation and phenotypic Analysis of model mice for mental disorders.

(Nagoya University)

We performed whole-brain c-fos mapping using PCDH15-deficient mice in collaboration with Company A. The mice showed completely different aspects at two-time points: during wakefulness and at rest. During the resting phase, when the lights were on, the mice showed a marked decrease in activity and low body temperature. In contrast, during the active phase, when the lights were off, the mice showed a marked high body temperature and a marked increase in activity. One hypothesis is that the pathophysiology of this mouse model may be related to the Yakovlev circuit. In addition, c-fos mapping of the 22q11.2 deletion was performed within this project. The results were discussed as possibly being related to the Papez circuit, an important circuit for memory. We also generated new Cacna1c-A36V variant mouse model, and we also generated conditional knockout mice with a 22q11.2 deletion.

(Company A)

Model mice of Rett syndrome were obtained from Nagoya University, and the phenotypic analysis was performed. As a result, the decreased survival rate, weight loss, addictive behavior, decreased spontaneous locomotion, and cognitive dysfunction was observed in this model. In addition, the EEG data of this mouse model were compared to that of patients with mental disorders provided by Nagoya University. Company A found a Multiscale entropy (MSE) parameter that commonly altered between patients with Rett syndrome and the model mice.

4. Management of industry-academia consortium and promotion of projects.

(Nagoya University)

Meetings were held once a quarter, starting with a kick-off meeting to share the progress with the Nagoya University and the three participating companies. The meetings promoted the exchange of opinions among the companies and the back-casting approach, resulting in the acceleration of the transition to the “Competitive Phase” directly related to drug discovery (five projects).