

令和元年6月21日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08280

研究課題名(和文)パーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経におけるエピゲノム修飾機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of epigenetic modification in parkinson's disease patient-specific iPSCs-derived dopamine neurons

研究代表者

葛巻 直子 (Kuzumaki, Naoko)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10507669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究より、パーキンソン病患者iPS細胞由来ドパミン神経細胞において、高度なDNA脱メチル化を伴ったcatechol-O-methyltransferase (COMT)の発現増加を見出し、げっ歯類の黒質ドパミン神経特異的にCOMTを過剰発現させることにより、運動障害が惹起されることを明らかとした。こうした結果より、黒質ドパミン神経におけるエピジェネティック修飾を伴ったCOMTの発現増加は、パーキンソン病初期段階において、ドパミン神経の機能障害に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、疾患特異的iPS細胞技術や神経科学的アプローチに従って、黒質ドパミン神経におけるエピジェネティック修飾を伴ったCOMTの発現増加を見出し、こうしたドパミン神経特異的COMTの発現増加は、ドパミン神経の機能障害に関与する可能性を明らかとした。このような結果は、パーキンソン病態の初期段階を反映していることが考えられるため、初期段階における治療法の開発の一助となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In Parkinson's disease, it has been widely accepted that the continuous loss of dopamine (DA) neurons in the substantia nigra leads to movement disorders. However, the mechanism that underlies the selective loss of DA neurons in Parkinson's disease is not fully understood. In this study, we found a dramatic increase in catechol-O-methyltransferase (COMT) along with a decrease in DNA methylation levels in Parkinson's disease-specific iPSC-derived DA neurons. Furthermore, in the cell-specific in vivo study, overexpression of COMT in DA neurons of the substantia nigra of dopamine transporter-Cre mice produced cataleptic behaviors accompanied by impaired motor coordination. These findings suggest that increase of COMT, with its epigenetic modification, in dopaminergic neurons may result in the dysfunction of synaptic DA transmission in the initial process of Parkinson's disease.

研究分野：幹細胞薬理学

キーワード：パーキンソン病 iPS 細胞 ドパミン神経 エピジェネティクス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病とは、黒質ドパミン神経の変性脱落を伴った運動障害を主徴とする神経変性疾患であり、振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害を伴う難治性疾患である。これまでの患者剖検脳研究やゲノム研究の成果から、パーキンソン病のいくつかの原因遺伝子候補が提唱されている。一方、近年、難治性疾患の原因として、環境に応じてゲノム構造や機能を変化させることにより遺伝子発現を調節する仕組みが注目されるようになった。こうした仕組みとして注目されているのが後天的遺伝子修飾 (エピジェネティクス) であるが、エピジェネティクスは細胞分化や核リプログラミング・老化シグナルと深く関わっているだけでなく、その破綻や機能異常ががんや生活習慣病など多くの疾患の原因に結びつくことが明らかにされている。パーキンソン病をはじめとした神経変性疾患は一般的には、ゲノムの異常に基づき発症していると考えられているが、近年では、時系列に従ったエピジェネティックな細胞機能脆弱性が病態の形成に重要であるという知見も散見される。また、これまで数多くの研究が進められているものの、パーキンソン病態における黒質ドパミン神経選択的な脱落メカニズムは明らかとなっていないのが現状である。そこで、本研究では、パーキンソン病の原因遺伝子の一つである *parkin* 遺伝子に変異が認められているパーキンソン病発症患者から採取した iPS 細胞をドパミン神経細胞に分化させ、エピゲノム変化を解析した。また、エピゲノム変動を伴って発現変動が認められる疾患特異的変動分子を絞り込み、疾患特異的変動分子をげっ歯類の黒質ドパミン神経に特異的に発現させることにより、ドパミン神経細胞の脆弱性ならびに錐体外路障害への影響について検討を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、パーキンソン病態における黒質ドパミン神経の脆弱性を惹起するメカニズムを探索する目的で、パーキンソン病患者由来 iPS 細胞からパーキンソン病の疾患感受性細胞であるドパミン神経細胞への分化誘導を行い、ドパミン神経伝達に関わる遺伝子群の発現変化に着目し、これら遺伝子の発現変動に関連したエピゲノム変化について検討を行う。また、パーキンソン病態下ドパミン神経細胞における疾患特異的変動分子を抽出し、黒質ドパミン神経における疾患特異的変動分子の発現変動が運動障害に及ぼす影響について、げっ歯類を用いた遺伝子改変技術を応用して検討を行う。

### 3. 研究の方法

本研究課題については、星薬科大学研究倫理委員会、動物実験委員会ならびに組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て研究を遂行している。

#### 1. 使用細胞

健常者由来 iPS 細胞 (Takahashi et al., Cell, 2007, Imaizumi et al., Mol Brain, 2012)、*Parkin* に変異の認められる家族性パーキンソン病 (PARK2) 患者由来 iPS 細胞 (Imaizumi et al., Mol Brain, 2012)、健常者 iPS 細胞において *parkin* を欠失させた PARK2 isogenic iPS 細胞 (Suda et al., Mol Brain, 2018, Kuzumaki et al., Brain, 2019) を使用した。

#### 2. iPS 細胞からの中脳ドパミン作動性神経細胞への誘導

iPS 細胞を、TrypLE select 処理にてシングルセルに分離し、FGF8b ならびに Shh を含む MHM+B27 培地にて 12 日間浮遊培養することによりドパミン神経前駆細胞を含む神経幹細胞の誘導を行った。神経幹細胞の継代は、TrypLE select 処理にて行い、実験には、3-5 継代 (36 日-60 日培養後) の神経幹細胞を使用した。ドパミン神経細胞への分化誘導は、poly-ornithine ならびに fibronectin コーティング後のディッシュに細胞を播種し、BDNF をはじめとする栄養因子を添加した MHM+B27 培地を用いて 10 日間接着培養した。

#### 3. DNA メチル化解析

DNA メチル化アレイに従い抽出した DNA メチル化の変動が大きいドパミン関連疾患特異的変動分子について、qMSP 法ならびにバイサルファイトシーケンス法に従い解析を行った。

#### 4. iPS 細胞由来ドパミン神経細胞における catechol-O-methyltransferase (COMT) 過剰発現による細胞脆弱性に対する検討

CSIV-hSynI-hCOMT-IRES2-Venus vector plasmid あるいは CSIV-hSynI-IRES2-Venus control plasmid を作成し、これらのプラスミドを用いて、レンチウイルスを作製した。健常者由来 iPS 細胞より誘導したドパミン神経細胞に上記のウイルスベクターを用いて COMT を過剰発現させ、活性酸素種 (ROS) の産生を指標に、ドパミン神経細胞脆弱性の評価を行った。

#### 5. 遺伝子改変動物を用いた黒質ドパミン神経特異的 COMT 過剰発現による運動障害に対する検討

野生型マウスあるいはドパミントランスポーター (DAT)-Cre マウスの両側黒質に flex-switch システムに従い、Cre 酵素依存的に COMT の発現を誘導できるアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を微量注入することにより、黒質ドパミン神経特異的な COMT の過剰発現動物を作製した。運動の評価については、AAV 微量注入後 13 週目まで各週に渡り、rotarod test ならび horizontal bar test を行った。

#### 4. 研究成果

健常者ならびにパーキンソン病患者 (PARK2) 由来 iPS 細胞から疾患感受性細胞と考えられる中脳ドパミン神経細胞へ分化誘導し、遺伝子発現ならびに DNA メチル化の網羅的解析を行った。その結果、いくつかの分子の転写開始点直上付近で DNA メチル化の大きな変動が認められた。中でも、健常者と比較し、パーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞において、ドパミンの代謝酵素である *COMT* の発現増加を見出し、こうした *COMT* の発現増加には、著明な脱メチル化を伴うことを明らかとした。また、*COMT* 遺伝子転写開始点直上の CpG サイトにおける DNA 低メチル化状態は、qMSP 法あるいはバイサルファイトシーケンス法を用いても同様に確認された。

次に、パーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞における *COMT* 遺伝子の発現変化が *parkin* 遺伝子の変異に起因しているか否か検討する目的で、CRISPER/Cas9 システムを応用して作製した isogenic iPS line を用いて検討を試みた。その結果、健常者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞と比較して、isogenic iPS 細胞由来ドパミン神経細胞において、*COMT* の有意な発現増加が認められた。

こうした結果を受け、パーキンソン病患者疾患特異的 iPS 細胞研究により抽出したドパミン神経細胞における *COMT* の発現増加がパーキンソン病態下において認められるドパミン神経の脆弱性を惹起するか否か検討を行った。その結果、健常者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞に *COMT* を過剰発現させたところ、*COMT* の過剰発現により、活性酸素種 (ROS) 産生の亢進が認められた。

さらに、疾患特異的 iPS 細胞研究により抽出した黒質ドパミン神経細胞における *COMT* の発現増加がパーキンソン病態下に認められる運動障害を惹起させるのか否か検証を行った。DAT-Cre マウスの両側黒質に Cre 酵素依存的に *COMT* を発現するアデノ随伴ウイルスベクターを微量注入し、rotarod 法ならびに horizontal bar 法に従い、運動機能の評価を行った。その結果、黒質ドパミン神経特異的 *COMT* の過剰発現により、運動障害の発現が認められた。以上の結果より、黒質ドパミン神経における *COMT* の発現増加は、パーキンソン病態下で認められる運動障害を惹起する一因である可能性が示唆された。

以上、本研究より、疾患特異的 iPS 細胞研究より、パーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞において、*COMT* の発現増加を見出し、こうした *COMT* の発現増加にはエピジェネティック修飾が関与していることを明らかにした。また、黒質ドパミン神経における *COMT* の発現増加は、ドパミン神経の脆弱性を促し、運動障害に繋がることを見出した。こうした結果は、パーキンソン病態のドパミン神経脱落前の初期段階を反映していることが考えられるため、こうした分子を標的とした治療法の開発の一助となる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.

Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Koike M, Kuzumaki N, Hayakawa H, *et al.* Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and  $\alpha$ -synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain* 2012; 5: 35.

Suda Y\*, Kuzumaki N\*, Sone T, Narita M, Tanaka K, Hamada Y, *et al.* Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Mol Brain* 2018; 11: 6. \*equally contributed author

Kuzumaki N\*, Suda Y\*, Iwasawa C, Narita M, Sone T, Watanabe M, *et al.* Cell-specific overexpression of COMT in dopaminergic neurons of Parkinson's disease. *Brain* 2019; 142: 1675-86. \*equally contributed author

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kuzumaki N\*, Suda Y\*, Iwasawa C, Narita M, Sone T, Watanabe M, Maekawa A, Matsumoto T, Akamatsu W, Igarashi K, Tamura H, Takeshima H, Tawfik VL, Ushijima T, Hattori N, Okano H, Narita M: Cell-specific overexpression of COMT in dopaminergic neurons of Parkinson's disease. *Brain*, 142, 1675-1686 (2019) \*equally contributed author

2. Suda Y\*, Kuzumaki N\*, Sone T, Narita M, Tanaka K, Hamada Y, Iwasawa C, Shibasaki M, Maekawa A, Matsuo M, Akamatsu W, Hattori N, Okano H, Narita M: Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Mol Brain*, 11, 6 (2018) \*equally contributed author

〔学会発表〕（計 9 件）

1. 第28回日本臨床精神神経薬理学会 第48回日本神経精神薬理学会合同年会  
2018年11月14-16日, 東京  
黒質ドパミン神経細胞における COMT の発現増加がパーキンソン病症状に関わる運動機能障害に及ぼす影響  
須田雪明<sup>1</sup>, 葛巻直子<sup>1,2,3</sup>, 成田道子<sup>1</sup>, 前川 文<sup>1</sup>, 池田有里<sup>1</sup>, 松本紘聡<sup>1</sup>, 曾根岳史<sup>2</sup>, 五十嵐勝秀<sup>3</sup>, 服部信孝<sup>4</sup>, 岡野栄之<sup>2,3</sup>, 成田 年<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>星薬大,<sup>2</sup>慶應大医,<sup>3</sup>先端生命科学研究セ (L-StaR),<sup>4</sup>順天堂大医)
2. 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 6-9 日, 神戸  
Analysis of dopaminergic dysfunction-related molecules in the developmental stage of Parkinson's disease using human disease-specific iPS cells  
葛巻 直子<sup>1</sup>, 須田雪明<sup>1</sup>, 岩澤千鶴<sup>1</sup>, 成田道子<sup>1</sup>, 渡邊 萌<sup>1</sup>, 田村 英紀<sup>2</sup>, 五十嵐 勝秀<sup>2</sup>, 牛島 俊和<sup>2,3</sup>, 服部 信孝<sup>4</sup>, 岡野栄之<sup>2,5</sup>, 成田 年<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>星薬大,<sup>2</sup>先端生命科学研究セ (L-StaR),<sup>3</sup>国立がんセ,<sup>4</sup>順天堂大医,<sup>5</sup>慶応大医)
3. 第 61 回日本薬学会 関東支部大会 2017 年 9 月 16 日, 東京  
ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経・精神疾患メカニズムの解明に向けた多角的解析  
葛巻直子<sup>1</sup>, 須田雪明<sup>1</sup>, 岩澤千鶴<sup>1</sup>, 成田 年<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>星薬大,<sup>2</sup>先端生命科学研究セ (L-StaR))
4. 第 40 回日本神経科学大会 2017 年 7 月 20-23 日, 幕張  
Analysis of epigenetics changes in the pathology of Parkinson's disease using PARK2 patient-specific iPS cells  
Y. Suda<sup>1</sup>, N. Kuzumaki<sup>1</sup>, S. Akamatsu<sup>1</sup>, H. Ishimi<sup>1</sup>, C. Iwasawa<sup>1</sup>, M. Narita<sup>1</sup>, H. Tamura<sup>3</sup>, A. Maekawa<sup>1</sup>, T. Sone<sup>2</sup>, K. Igarashi<sup>3</sup>, H. Takeshima<sup>4</sup>, T. Ushijima<sup>3,4</sup>, N. Hattori<sup>5</sup>, H. Okano<sup>2,3</sup>, M. Narita<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Hoshi Pharm. Univ., <sup>2</sup>Keio Univ. Sch. Med., <sup>3</sup>Life Science Tokyo Advanced Research Center (L-StaR), <sup>4</sup>National Cancer Center Res. Institute, <sup>5</sup>Juntendo Univ.)
5. 第 136 回日本薬理学会関東部会 2017 年 7 月 8 日, 東京  
ヒト疾患特異的 iPS 細胞研究の最前線とリバーストランスレショナルリサーチへの応用  
葛巻直子<sup>1</sup>, 須田雪明<sup>1</sup>, 岩澤千鶴<sup>1</sup>, 成田道子<sup>1</sup>, 岡野栄之<sup>2</sup>, 成田 年<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>星薬大,<sup>2</sup>慶応大医,<sup>3</sup>先端生命科学研究セ (L-StaR))
6. 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15-17 日, 長崎  
ヒト疾患特異的 iPS 細胞技術を応用した難治性神経疾患のメカニズム解析  
葛巻直子<sup>1</sup>, 須田雪明<sup>1</sup>, 成田道子<sup>1</sup>, 岡野栄之<sup>2</sup>, 成田 年<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>星薬大,<sup>2</sup>慶応大医,<sup>3</sup>先端生命科学研究セ (L-StaR))
7. 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20-22 日, 横浜  
Hypomethylation of COMT gene promoter in Parkinson's disease-specific iPS cell-derived dopaminergic neurons  
Y. Suda<sup>1</sup>, N. Kuzumaki<sup>1,2</sup>, M. Narita<sup>1</sup>, K. Igarashi<sup>3</sup>, H. Takeshima<sup>4</sup>, T. Ushijima<sup>3,4</sup>, N. Hattori<sup>5</sup>, H. Okano<sup>2,3</sup>, M. Narita<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Hoshi Pharm. Univ., <sup>2</sup>Keio Univ. Sch. Med., <sup>3</sup>Life Science Tokyo Advanced Research Center (L-StaR), <sup>4</sup>National Cancer Center Res. Institute, <sup>5</sup>Juntendo Univ. Sch. Med.)
8. ISSCR 2016 Annual meeting 2016 年 6 月 22 日, San Francisco, USA  
Analysis of changes in the expression of dopamine-related genes with epigenetic changes in parkinson's disease-specific iPS cell-derived dopaminergic neurons  
Y. Suda<sup>1</sup>, N. Kuzumaki<sup>1,2</sup>, M. Narita<sup>1</sup>, K. Igarashi<sup>3</sup>, H. Takeshima<sup>4</sup>, T. Ushijima<sup>3,4</sup>, N. Hattori<sup>5</sup>, H. Okano<sup>2,3</sup>, M. Narita<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Hoshi Pharm. Univ., <sup>2</sup>Keio Univ. Sch. Med., <sup>3</sup>Life Science Tokyo Advanced Research Center (L-StaR), <sup>4</sup>National Cancer Center Res. Institute, <sup>5</sup>Juntendo Univ. Sch. Med.)
- 9  
第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会 2016 年 5 月 19-20 日, 大阪  
ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いたパーキンソン病態下におけるエピゲノム変化の解析  
須田雪明<sup>1</sup>, 葛巻直子<sup>1</sup>, 成田道子<sup>1</sup>, 五十嵐勝秀<sup>5</sup>, 竹島秀幸<sup>2</sup>, 服部信孝<sup>3</sup>, 岡野栄之<sup>4,5</sup>, 牛島俊和<sup>2</sup>, 成田 年<sup>1,5</sup>  
(<sup>1</sup>星薬大,<sup>2</sup>国立がんセ,<sup>3</sup>順天堂大医,<sup>4</sup>慶応大医,<sup>5</sup>先端生命科学研究セ (L-StaR))

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
特になし

## 6. 研究組織

特になし

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。