

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K15468

研究課題名(和文)レトロマーを標的としたパーキンソン病治療戦略

研究課題名(英文)Cell biological analysis of VPS35 mutation using iPSCs

研究代表者

坊野 恵子 (Bono, Keiko)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20753320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：レトロマーはVPS26-VPS29-VPS35 からなる三量体と、sorting nexin二量体が構成するタンパク複合体である。レトロマーは細胞内でエンドソーム小胞の膜上に付着し、積荷タンパクの認識、輸送、エンドソーム小胞の切断などを制御している。VPS35 D620N変異陽性の患者由来iPS細胞を神経系細胞に分化させ解析した。VPS35 D620N変異はエンドソーム機能障害を引き起こし、 $\alpha$ -シヌクレイン蓄積、ドパミンニューロン細胞死といったパーキンソン病にみられる病理所見を反映していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によりVPS35 D620N変異はエンドソーム機能障害を引き起こし、 $\alpha$ -シヌクレイン蓄積、ドパミンニューロン細胞死といったパーキンソン病にみられる病理所見を反映していることが明らかになり、VPS35が構成するタンパク複合体であるレトロマーはパーキンソン病の治療標的となり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the Vacuolar protein sorting 35 (VPS35) gene have been linked to familial Parkinson's disease (PD), PARK17. VPS35 is a key component of the retromer complex, which plays a central role in endosomal trafficking. We analyzed human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived neurons from PD patients with the VPS35 D620N mutation and addressed relevant disease mechanisms. In the disease group, dopaminergic (DA) neurons underwent extensive apoptotic cell death. The movement of Rab5a- or Rab7a-positive endosomes was slower, and the endosome fission and fusion frequencies were lower in the PD group than in the healthy control group. Furthermore, we found  $\alpha$ -synuclein accumulation in TH positive DA neurons. Our results demonstrate the induction of cell death, endosomal dysfunction and  $\alpha$ -synuclein accumulation in neural cells of the PD group.

研究分野：神経内科学

キーワード：パーキンソン病 iPSC細胞 エンドソーム VPS35 レトロマー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病を始めとする細胞内に異常なタンパク質が蓄積する疾患では、異常タンパク質の細胞内クリアランスが重要である。VPS35 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子でありこの家族性パーキンソン病家系 (VPS35 D620N 変異) は PARK17 と呼ばれる。VPS35 はレトロマーの構成因子であり、レトロマーは細胞内の種々のタンパク質を輸送するエンドソーム経路において、エンドソーム小胞の膜上に付着し、積荷タンパクの認識、輸送、エンドソーム小胞の切断などを制御する役割を担っていることが明らかになっている<sup>1</sup>。しかし、VPS35 D620N 変異がパーキンソン病の病態にどのように関与しているかは明らかになっていない。

レトロマーは同じプロテオパチーであるアルツハイマー型認知症においても治療標的として注目されており、アルツハイマー型認知症剖検脳において海馬歯状回、嗅内野でレトロマーの構成タンパク質である VPS35 と VPS26 のタンパク発現量が大幅に低下していると報告された<sup>2</sup>。その後、レトロマーを安定化させ機能を促進する小分子化合物、レトロマー薬理シャペロンが同定され、さらに、この薬理シャペロンがアミロイド  $\beta$  の蓄積を低下させることが示された<sup>3</sup>。レトロマー機能改善はパーキンソン病のみならずアルツハイマー型認知症においても治療標的となり得る。

### 2. 研究の目的

VPS35 はレトロマーを構成するタンパク質である。家族性パーキンソン病の原因遺伝子である VPS35 の細胞内輸送およびエンドソーム経路における役割を調査する。また VPS35 D620N 変異がパーキンソン病の病態にどのように関与しているかを調査する。

### 3. 研究の方法

家族性パーキンソン病 (VPS35 D620N 変異; PARK17) 患者由来 iPS 細胞を樹立し、パーキンソン病で障害されるニューロンであるドパミンニューロンへと分化誘導した。健常コントロール由来 iPS 細胞から同様に分化誘導した細胞と比較検証した。蛍光マーカーを用いたライブイメージングにより細胞内のエンドソーム小胞の動態を評価し、パーキンソン病の原因タンパク質である  $\alpha$ -シヌクレインの細胞内蓄積率、ドパミンニューロン細胞死といったパーキンソン病に見られる病理初見を反映しているか *in vitro* で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) VPS35 D620N 変異陽性の家族性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞から分化誘導したドパミンニューロンでは、アポトーシスが優位に誘導される

パーキンソン病は運動障害としてパーキンソニズムを呈するが、その責任病巣は中脳黒質のドパミンニューロンの脱落である。VPS35 D620N 変異がパーキンソン病の病態に及ぼす影響を調査するために、本研究ではパーキンソン病群 (PD 群)、コントロール群 (Control 群) いずれも iPS 細胞からドパミンニューロンへと分化誘導した。DIV42 の段階で Control 群ではニューロンのうち約 20% が TH 陽性のドパミンニューロンであった。一方で PD 群では 5% 程度であり、この結果から PD 群ではドパミンニューロンの分化効率が高いか、もしくはドパミンニューロンが培養過程で細胞死を生じやすくなっている可能性が考えられた。ドパミンニューロンをアポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 で染色すると、cleaved caspase-3 陽性率は PD 群で上昇を認めた。これらの結果よりパーキンソン病患者から分化誘導したドパミンニューロンは細胞死を生じやすい傾向にあることがわかった。

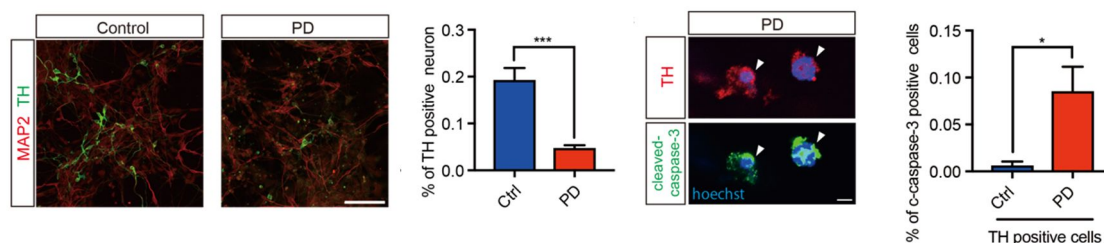


図1 VPS35 D620N 変異陽性の家族性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞から分化誘導したドパミンニューロンでは、アポトーシスが優位に誘導される

#### (2) レトロマーと初期および後期エンドソーム小胞は近接し細胞内を移動する

レトロマーの動きを可視化するために、レトロマーのレポーターとしてレトロマーを構成する VPS29 の下流に YFP をタグ付けした VPS29-YFP を HeLa 細胞に遺伝子導入した。レトロマーとエンドソームの関係可視化するために VPS29-YFP と同時に初期エンドソームのマーカーとして RFP-Rab5a、後期エン

ドソームのマーカ―として RFP-Rab7a をそれぞれ遺伝子導入し、ライブイメージングで観察した(図 2)。VPS29 陽性のレトロマー(緑)は、常に Rab5a 陽性のエンドソーム小胞(赤)を取り囲むように隣接し、一緒に回転するように動きながら細胞質内を移動していた(図 2 左)。VPS29 陽性のレトロマー(緑)は、Rab7a 陽性のエンドソーム小胞(赤)とは重なり合い、動きを一致させて動いていた(図 2 右)。重要なことは、常にレトロマーは Rab5a または Rab7a 陽性のエンドソーム小胞とほとんど挙動を同じくし、ぴったりと近接、もしくは重なりあって細胞質内を移動しているという点であった。VPS29-YFP と同時にゴルジ体、リソソーム、ミトコンドリアのマーカ―を遺伝子導入した HeLa 細胞もライブイメージングで観察したが、いずれの細胞内小器官局在ともレトロマーは独立しており、この結果からレトロマーとエンドソームの密接した関係性を確認できた。

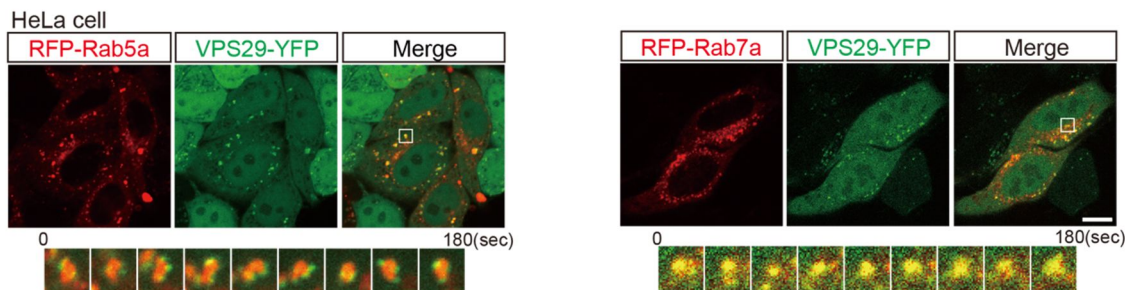


図2 レトロマーと初期および後期エンドソーム小胞は近接し細胞内を移動する  
タイムラプス蛍光イメージングで観察した HeLa 細胞。VPS29-YFP (緑、レトロマーのマーカ―)、Rab5a (赤、初期エンドソームのマーカ―)、Rab7a (赤、後期エンドソームのマーカ―)

### (3) VPS35 D620N 変異により初期エンドソーム小胞の移動速度は低下する

VPS35 D620N 変異のエンドソームにおける影響を調べるために、初期エンドソームのマーカ―である Rab5a を iPS 細胞由来ニューロン(iNeuron)に遺伝子導入し、ライブイメージングで観察した。神経突起における赤色の蛍光タンパク質を目印とし蛍光タイムラプスイメージングで観察し、初期エンドソーム小胞のひとつひとつの粒の動きを 1 分間観察しその最大速度、平均速度を算出した。初期エンドソーム小胞の最大及び平均速度はいずれも Control 群に比し PD 群で低下していた。

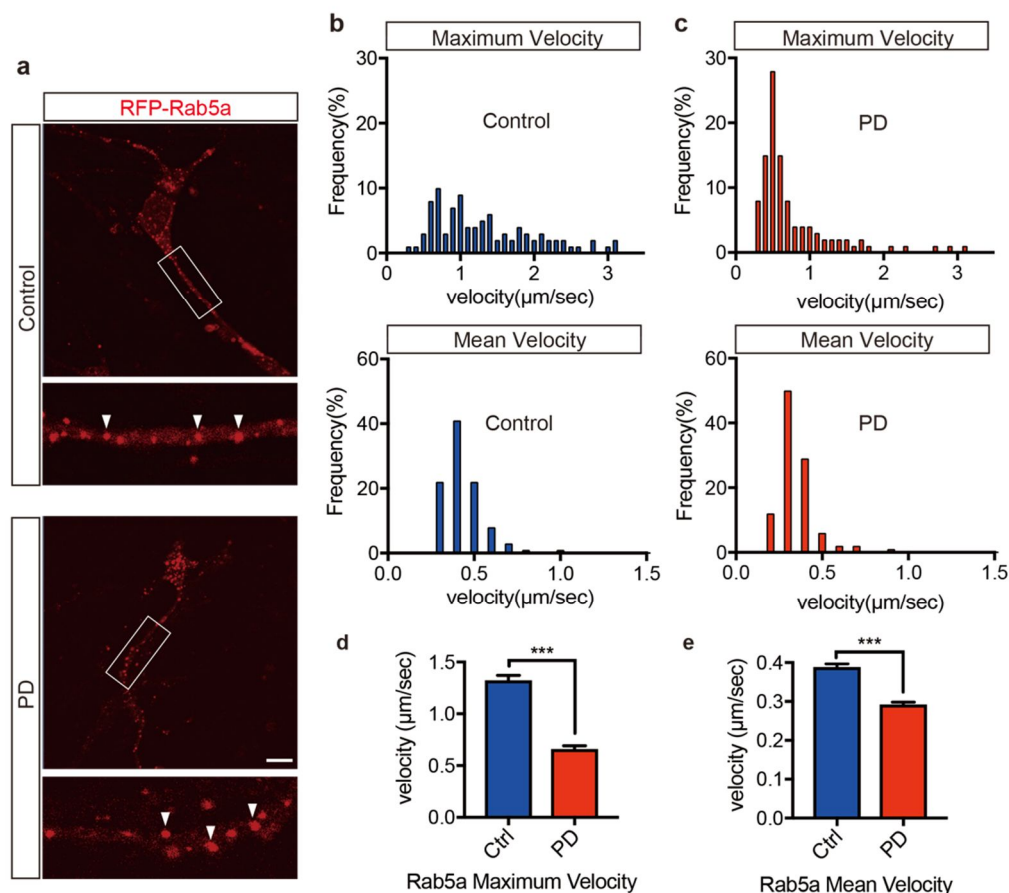


図3 VPS35 D620N 変異により初期エンドソーム小胞の移動速度は低下する

初期エンドソーム小胞のひとつひとつの粒の動きを 1 分間観察しその最大速度、平均速度を算出した。**a.**神経突起内の初期エンドソーム小胞を矢印で示す。**b, c.** 神経突起内における初期エンドソーム小胞の最大速度および平均速度のばらつきをグラフ化した。**d, e.** 初期エンドソーム小胞の最大及び平均速度はいずれも Control 群に比し PD 群で低下していた。

#### (4) VPS35 D620N 変異により後期エンドソーム小胞の移動速度は低下する

前述(3)の実験と同様に後期エンドソームのマーカである Rab7a を iNeuron に遺伝子導入しライブイメージングで観察した。神経突起において後期エンドソーム小胞のひとつひとつの粒の動きを観察し、その最大速度、平均速度を算出したところ、いずれも Control 群に比し PD 群で低下していた。(結果詳細のグラフは 2020 年報告論文参照)

#### (5) VPS35 D620N 変異は初期および後期エンドソーム小胞の分離、融合を阻害する

細胞内でエンドソーム小胞はチューブ伸張、小胞の分離、融合しながら積荷タンパク質を目的の場所へと輸送しているが、レトロマーは WASH complex と直接接触してエンドソーム小胞のチューブを伸張、分離させていることが明らかになっている<sup>1</sup>。また HeLa 細胞などの細胞株を使った研究で VPS35 D620N 変異により WASH complex との接触が阻害されることも明らかになっている。本研究では、VPS35 D620N 変異のエンドソーム小胞の分離、融合における影響を調査するために、iNeuron の神経突起内でのエンドソーム小胞の分離、融合の頻度を解析した。初期および後期エンドソーム小胞の 1 分間の分離、融合頻度を定量化すると、分離、融合頻度共に Control 群に比し PD 群で低下していた。

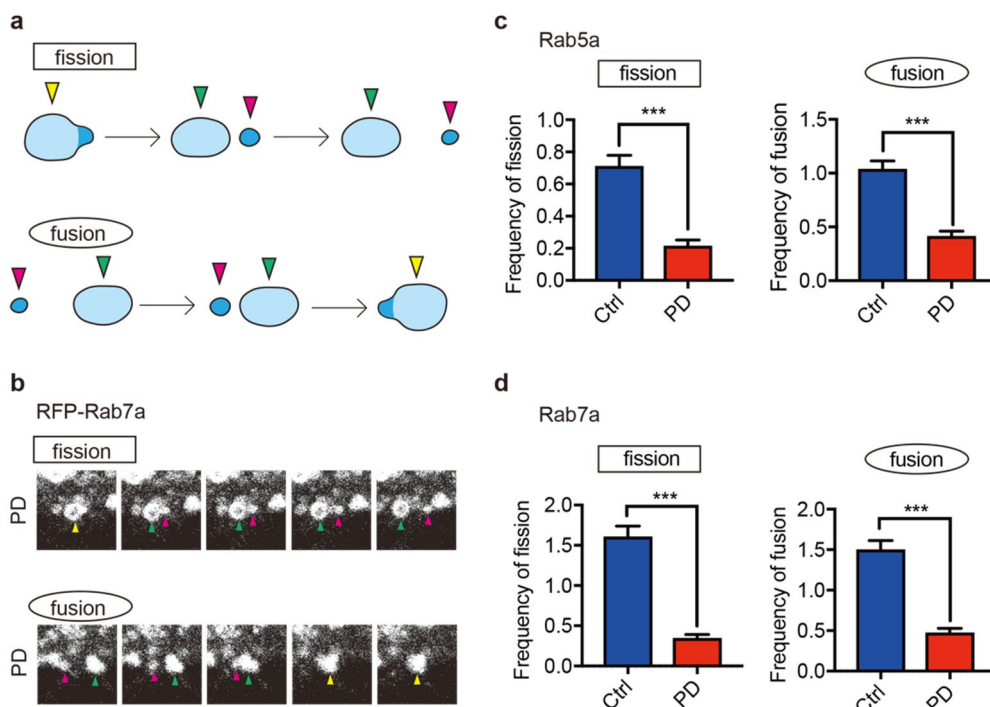


図 4 VPS35 D620N 変異は初期および後期エンドソーム小胞の分離、融合を阻害する

**a.**エンドソーム小胞の分離 (fission)、融合 (fusion)のシエマ。**b.** iPS 細胞由来ニューロンの神経突起内で観察される RFP-Rab7a 陽性の小胞が分離、融合する様子。**c.**初期エンドソーム (RFP-Rab5a 陽性) 小胞の 1 分間の分離、融合頻度を定量化したグラフ。**d.**後期エンドソーム (RFP-Rab7a 陽性) 小胞の 1 分間の分離、融合頻度を定量化したグラフ。分離、融合頻度共に Control 群に比し PD 群で低下している。

#### (6) VPS35 D620N 変異によりグリア細胞では CI-MPR の輸送障害が生じる

CI-MPR (cation-independent mannose 6-phosphate receptor; カチオン非依存性マンノース 6リン酸受容体) はカテプシン D 等のリソソーム酵素を輸送する受容体であり、レトロマーの代表的な積荷タンパクとして知られ、過去より様々なレトロマー研究に用いられてきた。過去の研究では CI-MPR はカテプシン D の輸送に必須であり、CI-MPR 輸送障害が $\alpha$ -シヌクレイン代謝にも影響を及ぼすことが示唆されている。本研究では iPS 細胞由来グリア細胞における CI-MPR の局在を調べた。PD 群ではゴルジ体近傍での輝度値上昇が Control 群に比し顕著であり、ゴルジ体領域と、細胞質(ゴルジ体領域を除く)での CI-MPR 輝度値を比較すると PD 群では有意にゴルジ体領域での輝度値上昇を認めた。この結果より、

VPS35 D620N 変異によりグリア細胞では CI-MPR の輸送障害が生じることが示唆された。尚、ニューロンでのゴルジ体領域は極めて微小で輝度値を測定し比較することが困難であったため本項目ではグリア細胞を用いて検証した。

#### (7) VPS35 D620N 変異により iPS 細胞由来ドパミンニューロンでは $\alpha$ -シヌクレインが蓄積する

パーキンソン病の病理学的特徴は神経細胞内の $\alpha$ -シヌクレインの異常蓄積である。TH 陽性ドパミンニューロンの細胞質における $\alpha$ -シヌクレイン輝度値を測定し、Control、PD 両群で比較したところ、PD 群ではドパミンニューロンの細胞質内で $\alpha$ -シヌクレイン輝度値の上昇を認めた。この結果により、VPS35 D620N 変異陽性患者の脳内ではドパミンニューロンにおける $\alpha$ -シヌクレインの蓄積が亢進しており、パーキンソン病の病理像を呈している可能性があることが示唆された。

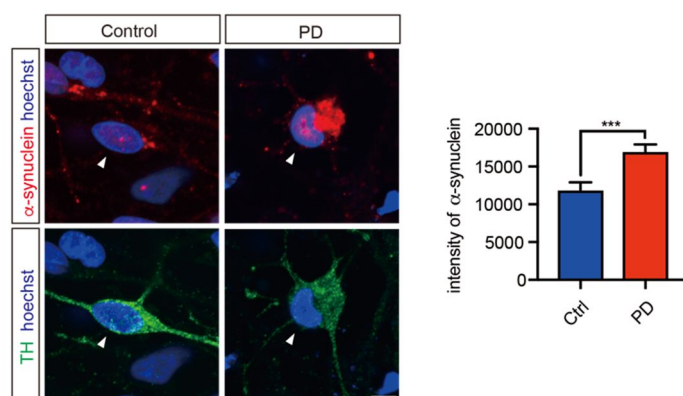


図 5 iPS 細胞由来ドパミンニューロンにおける $\alpha$ -シヌクレインの蓄積

iPS 細胞由来ドパミンニューロンの $\alpha$ -シヌクレイン染色。TH; ドパミンニューロンのマーカー。ドパミンニューロンの細胞質内での $\alpha$ -シヌクレイン輝度値を定量化した。PD 群では $\alpha$ -シヌクレインが蓄積している。

#### まとめと今後の展望

本研究により VPS35 D620N 変異はエンドソーム機能障害を引き起こし、さらに $\alpha$ -シヌクレイン蓄積、ドパミンニューロン細胞死といったパーキンソン病にみられる病理所見を反映していることがわかった。上記報告に続く研究では、VPS35 D620N 変異を持つ iPS 細胞から分化誘導したドパミンニューロンでは新規オートファジー障害が存在し、女性ホルモンであるエストロゲンが同細胞においては神経保護作用を有することを確認している(2024 年の報告論文参照)。本研究で確立させたツールを用いてさらにパーキンソン病の治療法開発へとつながる研究を進めたい。

#### 参考文献

- 1 . Wang J, Fedoseienko A, Chen B, Burstein E, Jia D, Billadeau DD. Endosomal receptor trafficking: Retromer and beyond. *Traffic*. 2018; 19: 578–90.
- 2 . Small SA, Kent K, Pierce A, Leung C, Kang MS, Okada H, Honig L, Vonsattel JP, Kim TW. Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 2005;58: 909–19.
- 3 . Mecozzi VJ, Berman DE, Simoes S, Vetanovetz C, Awal MR, Patel VM, et al. Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing. *Nat Chem Biol*. 2014;10: 443–9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Bono Keiko, Hara-Miyauchi Chikako, Sumi Shunsuke, Oka Hisayoshi, Iguchi Yasuyuki, Okano Hiroataka James	4. 巻 13
2. 論文標題 Endosomal dysfunction in iPSC-derived neural cells from Parkinson's disease patients with VPS35 D620N	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 137 (1-15)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00675-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onda-Ohto Asako, Hasegawa-Ogawa Minami, Matsuno Hiromasa, Shiraishi Tomotaka, Bono Keiko, Hiraki Hiromi, Kanegae Yumi, Iguchi Yasuyuki, Okano Hiroataka James	4. 巻 16
2. 論文標題 Specific vulnerability of iPSC-derived motor neurons with TDP-43 gene mutation to oxidative stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 62 (1-16)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-023-01050-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiraishi Tomotaka, Bono Keiko, Hiraki Hiromi, Manome Yoko, Oka Hisayoshi, Iguchi Yasuyuki, Okano Hiroataka James	4. 巻 81
2. 論文標題 The impact of VPS35 D620N mutation on alternative autophagy and its reversal by estrogen in Parkinson's disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 103 (1-15)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-024-05123-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Keiko Bono, Chikako Hara, Syunsuke Sumi, Yasuyuki Iguchi, Hiroataka James Okano
2. 発表標題 Cell biological analysis of VPS35 mutation using iPSCs
3. 学会等名 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坊野 恵子、原 央子、角 俊輔、井口 保之、岡野ジェイムス 洋尚
2. 発表標題 疾患iPS細胞を用いたVPS35遺伝子変異パーキンソン病の病態解析
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 恩田（大戸）亜沙子、長谷川（小川）実奈美、松野博優、坊野恵子、平木宏美、鐘ヶ江裕美、井口保之、岡野ジェイムス洋尚
2. 発表標題 遺伝子編集ヒトiPS細胞を用いた筋萎縮性側索硬化症の病態研究
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomotaka Shiraiishi、Keiko Bono、Yasuyuki Iguchi、Hiroataka James Okano
2. 発表標題 Role of alternative autophagy in $\alpha$ -syn reduction and protection to VPS35 D620N dopaminergic neurons
3. 学会等名 MDSJ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石 朋敬、坊野 恵子、井口 保之、岡野 ジェイムス洋尚
2. 発表標題 Activation of alternative autophagy is neuroprotective in VPS35 D620N patient-derived iNeurons
3. 学会等名 日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------