

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893263

研究課題名(和文) 複数の遺伝性パーキンソン病iPS細胞由来神経細胞におけるオートファジー異常の解明

研究課題名(英文) Analysis of autophagic impairment in neurons derived from familial parkinson's disease

研究代表者

石川 景一 (Ishikawa, Kei-ichi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90733973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：PARK9患者由来iPS細胞を樹立した。iPS細胞からドパミン神経細胞への高効率な分化誘導法を確立することができた。確立したドパミン神経細胞誘導法を用いることによって、PARK9-iPS細胞由来ドパミン神経細胞におけるリソソームの異常とオートファジー異常を見いだすことができた。また、CRISPR/CAS9システムを用いて、病因変異を修正したPARK9-iPS細胞を作製し、本iPS細胞を用いることで表現型がPARK9の病因変異によるものであることを強く示すことが可能になった。PARK2患者におけるドパミン神経細胞内のミトコンドリアのオートファジー異常も確認した。

研究成果の概要(英文)：PARK9-iPS cells were established from the patient's T-cell. We established a highly efficient induction method from the iPS cells into dopaminergic neurons. We found lysosomal abnormalities and impairment of autophagy in PARK9-dopaminergic neurons derived from iPS cells using the new induction method. We established mutation-corrected PARK9-iPS cell line using CRISPR/CAS9 system. We also detect abnormalities of mitophagy in PARK2-dopaminergic neurons.

研究分野：神経内科

キーワード：パーキンソン病 iPS細胞 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(以下 PD)は中脳黒質のドパミン神経細胞の進行性脱落による運動症状を主症状とする神経変性疾患である。PDの発症機序は主に遺伝性PDの原因遺伝子産物の機能解析により解明が進み、黒質神経細胞の小胞体ストレス、カルシウム流入による excitotoxicity、転写異常、ミトコンドリア機能異常、それに続くアポトーシス、蛋白分解機構(ユビキチンプロテアソーム系とオートファジー)異常が報告されている(*Annu Rev Pathol* 2011)。なかでも多くのPD原因遺伝子(PARK1/2/6/8/9)産物がオートファジーと関連し、PD患者脳に蓄積するタンパク質  $\alpha$ -synuclein の分解やミトコンドリアオートファジー(マイトファジー)によるミトコンドリア品質管理などPD病態に深く関わることが確立されつつある。一方、神経特異的オートファジー欠損マウスにて、神経細胞体内にオートファジーの基質である p62 やユビキチン陽性凝集体が蓄積し、神経細胞脱落をきたし、運動障害を呈することから(*Nature* 2006a、*Nature* 2006b、*Cell* 2007)、基底レベル(変動の極めて少ない)のオートファジーが神経細胞生存に極めて重要であるとされる。研究代表者石川はオートファジー機構の解析とPDの病態解明を目的とした研究を大学院博士課程1-3年次に完遂している。具体的にはヒト培養細胞における caffeine による Akt 抑制を介したオートファジー促進機構を明らかにした(*Autophagy* 2011)。さらにパーキンソン症状を呈する遺伝性疾患ペリー-症候群責任遺伝子産物 p150glued の機能解析を行い、ヒト培養細胞に変異型 p150glued を強制発現することにより p150glued 凝集物を形成すること、異常ミトコンドリアが蓄積すること、細胞死が増加し汎カスパーゼ阻害剤 zVAD で細胞死が抑制されること(グラフ1)、リソソームの局在変化によりオートファゴソーム・リソソーム融合が阻害されオートファジー機能不全が生じることを確認し一部を報告し(*PLOS ONE* 2014)、もう1つの学術論文を投稿準備中である。

以上を行う中で、培養細胞実験に関わる実験技術(遺伝子・タンパク質関連実験、共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメーターなど)と、オートファジー分子機構の知識を身につけた。しかし通常培養細胞を用いる実験の限界(ヒト神経細胞内での真の病態解明への距離感)を感じ、優れたヒト疾患モデルでの評価が重要と考え、平成25年3月より患者由来 iPS 細胞の樹立・分化・機能解析において秀でた実績をもつ慶応義塾大学生理学教室(岡野栄之教授)に移り、iPS 細胞の樹立、管理、神経分化誘導技術を習得し、既に新たに PARK9 患者検体から iPS 細胞を樹立した。自身が樹立

した PARK9 患者由来 iPS 細胞、使用可能な PARK2、PARK6 患者由来 iPS 細胞、および繁殖中の PARK9 モデルマウスという多面的なモデルによる相互的検証の利点を生かしつつ、習熟したオートファジー関連実験技術を用いて病態解明を行うことで、ヒト神経細胞におけるオートファジー機能と、PD のより正確な病態機序解明を行うべく、本研究を計画した。

PARK9 は常染色体劣性遺伝性の世界的にも稀な遺伝性 PD であり、本邦での報告は1例のみである(*Neurology* 2009)。病態機序としてはヒト培養細胞もしくはモデル動物においてリソソーム機能異常によりオートファジー異常が招来されると報告されている(*Proc Natl Acad Sci* 2012、*Hum Mol Genet* 2012)。PARK9 患者 iPS 細胞(既に樹立済み)から分化させた神経細胞を用いて、オートファジー活性を中心とした機能解析を行うことにより、未だ十分な評価がなされていないヒト神経細胞におけるオートファジー機能異常の評価手法を確立すると同時に、PARK9 分子病態に迫る。さらに、他の家族性 PD 患者由来 iPS 細胞を用いて同様の検討を行うことで、分子病態の共通性や相違を明らかにすることができ、現在までに培養細胞やモデル動物で指摘されていた PD 病態におけるオートファジーの重要性を、ヒト神経細胞による病態解明に繋げることが出来る

## 2. 研究の目的

(1)培養細胞・マウスモデルにて証明されてきた PD 病態とオートファジー異常の関わりをヒト神経細胞で証明することを目的とする。オートファジー機能異常が報告されている PARK9 患者および正常対照 iPS 細胞由来神経細胞を用い、ヒト神経細胞におけるオートファジー機能評価方法を確立する。

(2)複数の家族性 PD 患者由来 iPS 細胞を用いて比較を行うことで、より正確な PD 病態におけるオートファジーの役割を解明する。

樹立した同モデルは、分子病態既知の薬効評価ツールとして創薬スクリーニングにも汎用できる可能性を秘める。

## 3. 研究の方法

順天堂大学医学部倫理委員会(2013095号)および慶応義塾大学医学部倫理委員会(20080016号)の承認の下、研究代表者は PARK9 患者と患者の長女から iPS 樹立と機能解析の承諾を得て、既に iPS 細胞を作製済みである。また、過去に樹立済みの PARK2、PARK6 患者由来 iPS 細胞も常に研

究に使用できる。本研究計画では、PARK9 患者由来神経細胞をいわば陽性コントロールとしてオートファジー機能異常の評価手法を通常の培養細胞系で行われている手法に基づいて確立する。その後 PARK2、PARK6 患者由来神経細胞を用いて検討を行い、ヒト神経細胞における PD 病態へのオートファジーの関与を 2 年計画で解明する。

#### (1) 正常対照/PARK9 患者 iPS 細胞由来神経細胞におけるオートファジー機能評価

PARK9 はリソソーム異常によりオートファジー最終ステップの障害をきたすとされる。分化した神経細胞に対して、低グルコース、低アミノ酸、オートファジー機能調整作用薬 (Bafilomycin A1, E64d+pepstatin A, rapamycin, Torin1, insulin など) 処理を行い、ウエスタンブロッティング (WB) と免疫染色 (IF)、FACS でオートファゴソームマーカーである LC3、オートファジーの基質である p62、PD 患者脳で蓄積しオートファジーの基質とされる  $\alpha$ -synuclein などを評価し、疾患 iPS 細胞由来神経細胞におけるオートファジー機能変化を解明する。内在性マーカーでの評価が困難な際には、GFP-LC3 及び GFP-RFP-LC3 をウイルスベクターで細胞内に導入してオートファジー活性の評価を行う。さらに適切な蛍光色素で標識した ATG5、ATG16 などをウイルスベクターで導入しオートファジーに必須である ATG タンパク質の動態を検討することで、オートファゴソームの形成過程からリソソームとの融合までの各ステップにおける異常の有無を評価する。PARK9 由来神経細胞のオートファゴソーム蓄積を順天堂大学医学部神経生物学・形態学講座 (小池正人教授) のご協力の下、電子顕微鏡で確認する。必要に応じて FACS で適切な細胞を抽出し実験を行う。これらの実験によってヒト神経細胞におけるオートファジー機能異常の検出方法を確立する。

#### (2) ゲノム編集技術による疾患 iPS 細胞由来神経細胞の表現型改善の確認

CRISPR/Cas-9 や TALEN を用いた遺伝子特異的な改変技術は、疾患モデル細胞の遺伝子改変にも有用な手段として確立されつつある (*Science* 2013, *Dev Growth Differ* 2014)。本技術を用いて疾患 iPS 細胞の遺伝子変異を野生型に改変して表現型の改善を確認することにより、疾患細胞の未知の遺伝的要因や実験系による異常でなく、病因遺伝子変異による異常であることを強力に証明することができる。病因変異修正 iPS 細胞作成には時間がかかるため平成 25 年度から作成を開始し、出来次第上記 (1) や下記で得られた表現型の改善を確認する。

#### (3) PARK2、PARK6 患者 iPS 細胞由来

#### 神経細胞との表現型の比較

上記 (1) で得られた知見を、病態機序としてミトコンドリアオートファジー (マイトファジー) 不全が指摘されている PARK2/6 患者 iPS 細胞由来神経細胞でも検討し比較する。(1) の実験により PARK9 患者 iPS 細胞由来神経細胞で認められた異常について、PARK2/6 患者由来 iPS 細胞において検討する。また PARK9 患者 iPS 細胞由来神経細胞でマイトファジー異常を検討する。

#### (4) PARK9、PARK2、PARK6 患者 iPS 細胞由来神経細胞における神経細胞死誘導の検出

PD 病態では最終的に神経細胞脱落が引き起こされる。オートファジー調節 (低グルコース、低アミノ酸、その他オートファジー機能調整作用薬) ミトコンドリア毒 (CCCp) などの条件下での細胞死誘導を核形態、Annexin-V と propidium iodide、TUNEL 染色で評価する。さらにアポトーシス経路を中心にカスパーゼや小胞体ストレスマーカーを、カスパーゼ阻害剤などを適宜使用しながら WB、IF で検定し細胞死誘導経路を解明する。

#### (5) 計画通りに進まなかった場合

疾患 iPS 細胞由来神経細胞でオートファジー異常を確認できなかった場合、iPS 細胞をさらに PD で神経細胞脱落をきたすドパミン神経細胞に分化させ、ドパミン神経細胞のみを抽出して異常の有無を検討する。

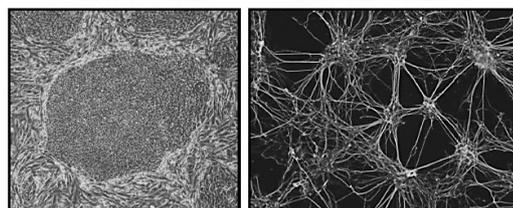
### 4. 研究成果

#### (1) PARK9-iPS 細胞由来神経細胞では、オートファジー異常、細胞死誘導に異常はない。

PARK2-iPS 細胞由来神経細胞の解析で実績のある既存の誘導法 (*Mol Brain* 2012) を用いて、PARK9 および正常コントロールの iPS 細胞を神経細胞に誘導した。本誘導法では神経細胞誘導はできるが、TH 陽性のドパミン神経細胞の含有は 1%以下である。

PARK9 患者由来 iPS 細胞

患者 iPS 細胞由来神経細胞



誘導した神経細胞を回収し、ウエスタンブロッティングにてオートファジーの活性を検討したが、PARK9 由来神経細胞と正常コントロール神経細胞で明らかな差は認めなかった。

PARK9 はリソソーム機能異常が報告されているが、リソソームタンパク質の成熟や、リソソーム pH にも明らかな差は認めなかった。

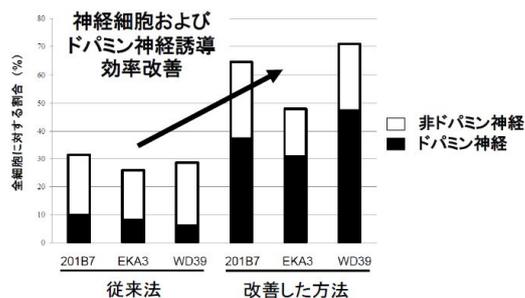
更に細胞死の検定のため、ウエスタンブロッティング及び免疫染色法によるカスパーゼタンパク質の活性の検定でも明らかな差は認めなかった。また神経細胞の障害を示す神経突起長の検定でも差は認めなかった。

これらの結果より PARK9-iPS 細胞由来神経細胞においては、特に神経の特性を規定しない神経細胞集団においては、正常細胞と変わりがなかったことが確認できた。

### (2) iPS 細胞からのドパミン神経細胞誘導効率を改善した。

疾患 iPS 細胞由来神経細胞の解析において、神経細胞の中でも疾患感受性細胞のみ異常が確認される可能性が示されている (*Stem Cell Rep* 2016)。 (1) の結果より、計画通りに進まないときの対応に基づいて、iPS 細胞を疾患感受性細胞であるドパミン神経細胞に誘導して検討を行った。しかしながら当時のドパミン神経細胞誘導効率は 10%前後と低く、さらに誘導までの時間も長期にわたるため、ドパミン神経細胞の誘導法の効率化を行った。

既存の報告を参考に、投与する化合物やリコンビナントタンパク質の投与期間、濃度を検討し、下記の図の通りドパミン神経誘導効率を 50-60%程度まで改善することに成功した。



本誘導法の改善は、PARK9-iPS 細胞の解析のみならず、他のパーキンソン病由来 iPS 細胞の解析やドパミン神経が関与する疾患解析にも有用な成果である。

### (3) PARK9-iPS 細胞のドパミン誘導効率はコントロール iPS 細胞と同等である。

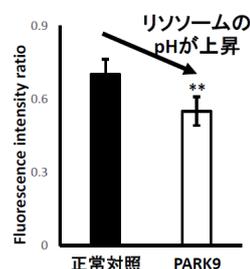
(2) により確立したドパミン神経細胞誘導法により、PARK9-iPS 細胞をドパミン神経細胞に誘導した。誘導効率は正常コントロール細胞と比べて明らかな差は認めなかった。

### (4) PARK9-iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の神経突起長解析は正常 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞と同等である。

PARK9-iPS 細胞と正常コントロール iPS 細胞を同様にドパミン神経細胞に誘導し、神経細胞障害を反映するとされる神経突起長解析を行った。解析は最終の神経分化開始後 14, 21, 28 日後に行った。本検討においては PARK9 神経細胞と正常コントロール神経細胞で明らかな差は認めなかった。

### (5) PARK9-iPS 細胞由来ドパミン神経細胞のリソソームの pH が上昇し、オートファジーが障害される。

PARK9 はリソソーム機能異常が指摘されている。PARK9-iPS 細胞と正常コントロール iPS 細胞を同様にドパミン神経細胞に誘導し、神経細胞内のリソソームの pH を Lysosensor を用いて検討した。分化した神経細胞を Lysosensor で染色し、InCellAnalyzer 2200 で撮影及び蛍光強度の測定を行った。PARK9 由来神経細胞において、正常コントロール神経細胞と比べて有意にリソソームの pH が上昇していることを見いだした。



リソソームは pH を酸性にすることでリソソーム内の多くの分解酵素の至適 pH を保ち、細胞内の不要物を分解している。リソソーム内 pH が上昇することで細胞内の不要タンパク質分解が障害されていることが予想された。

さらに本結果に基づいて PARK9 ドパミン神経細胞のオートファジーを検討し、オートファジーによる分解が障害されていることを見いだした。

上記結果により本研究計画の目的であった、PARK9 の病態機序におけるオートファジーの関わりを解明することに成功した。

### (6) ゲノム編集技術により患者由来 PARK9-iPS 細胞から病因変異を修正した iPS 細胞を作製した。

CRISPR/Cas9 システムを用いて、患者由来 PARK9-iPS 細胞の原因遺伝子変異の修復を行った。デザインしたプラスミドをエレクトロポレーションにより iPS 細胞に導入してコロニーを回収拡大培養を行い、そのうちの 1 ラインにおいて遺伝子修復ができていたことを確認した。

得られた遺伝子修復 iPS 細胞と、PARK9-iPS 細胞を用いて検討することにより、PARK9-iPS 細胞で認められた表現型が修復した遺伝子変異により引き起こされていることを強く証明することができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Yamada D, Saiki S, Furuya N, Ishikawa K, Imamichi Y, Kambe T, Fujimura T, Ueno T, Koike M, Sumiyoshi K, Hattori N. Ethambutol neutralizes lysosomes and causes lysosomal zinc accumulation. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Feb 26;471(1):109-16. (査読あり)
2. 石川景一, 赤松和土, 服部信孝. 「iPS細胞を用いたパーキンソン病の病態解析」, 『再生医療 -新たな医療を求めて-』, 日本臨床, 73巻, 増刊号5, pp391-395, 2015. (査読なし)

〔学会発表〕(計5件)

1. 石川景一, 齊木臣二, 古屋徳彦, 今道洋子, 服部信孝. ペリー症候群の原因遺伝子 *DCTN1* 欠損によるオートファジー障害の検討. 第2回新学術「オートファジー」班会議・第8回オートファジー研究会, 2014年11月10日~11日, シャトラーゼガトーキングダムサッポロ, 北海道札幌市
2. Kei-ichi Ishikawa, Shinji Saiki, Norihiko Furuya, Daisuke Yamada, Yoko Imamichi, Yuanze Li, Suminoro Kawajiri, Yoshio Tsuboi, Nobutaka Hattori. p150glued associated disorders are caused by apoptotic pathway, 第56回神経学会学術大会, 2015年5月20日~23日, 朱鷺メッセ, 新潟県新潟市
3. 石川景一, 齊木臣二, 古屋徳彦, 今道洋子, 服部信孝. ペリー症候群の原因遺伝子 *DCTN1* 欠損によるオートファジー障害の検討, 第3回新学術「オートファジー」班会議・第9回オートファジー研究会, 2015年11月16日~17日, 淡路夢舞台国際会議場, 兵庫県淡路市

他2件。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: パーキンソン病診断指標

発明者: 服部信孝, 齊木臣二, 波田野琢, 山城一雄, 石川景一, 王子 悠, 森 聡生, 奥住文美

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2016-017794

出願年月日: 2016年2月2日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

なし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 景一 (ISHIKAWA, Kei-ichi)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 90733973