

## 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：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860666

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた孤発性パーキンソン病の病態解明と標的分子の同定

研究課題名(英文) Investigating the pathomechanism underlying idiopathic Parkinson's disease using patient-derived iPS cells

研究代表者

山門 穂高 (Yamakado, Hodaka)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10378771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病約150名のGBA遺伝子シーケンスを行い、L444P、R120W、など6名のGBA変異患者を同定し計5系統以上のiPS細胞を樹立した。GBA 444番目アミノ酸(L444)をtargetとし、ゲノム編集を行ったが、効率は10%弱と低確率であった。個体差・遺伝的バックグラウンドの解消の手段として、多数例のGBA変異患者を対象とすること、Corinなどドパミン細胞表面に発現するマーカーを用いることによって、ドパミン神経への分化の程度をそろえて均一なドパミン細胞集団を解析することを行った。

研究成果の概要(英文)：Genomic sequencing was performed to identify GBA-related Parkinson's disease patients, and five clones of iPS cells from 6 patients were generated by plasmid methods. Genome editing by CRISPR/cas9 was employed to edit GBA gene (L444), but its efficiency was about 10%, and it was lower than expected, even in HEK 293 cells. To overcome the disadvantages from heterogeneity of genetic background in iPS research, we are analyzing the corin-sorted dopaminergic precursor cells, as well as increasing the number of target clones.

研究分野：パーキンソン病

キーワード：パーキンソン病

## 1. 研究開始当初の背景

1) GBA ヘテロ接合体変異は孤発性パーキンソン病(PD)の極めて重要なリスク因子である

パーキンソン病(PD)は黒質線条体系ドパミン神経の選択的変性と  $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -Syn)を主要構成成分とするレヴィー小体の存在を特徴とする神経変性疾患である。 $\alpha$ -Synは点変異や重複により遺伝性PDを発症するだけでなく、その発現量を上昇させる一塩基多型を介して孤発性PDの遺伝的リスクとなる。このことから、 $\alpha$ -Synの蓄積毒性はPD発症に繋がると考えられるが、 $\alpha$ -Synは主にオートファジー・ライソソーム(AL)系を介して分解されることから、AL系の障害もPDの発症に関わっている可能性がある。

近年、ゴーシェ病の原因遺伝子であるGBA遺伝子のヘテロ接合体変異が、孤発性PDの最も強力な遺伝的リスクであることが示された。日本人においてはそのオッズ比は28であり、PD患者の9.4%にGBA変異が認められている。GBAはリソソーム酵素であることから、GBAヘテロ接合体変異はAL系の障害に起因する二次的な $\alpha$ -synの蓄積を引き起こすと想定される。このことはGBAヘテロ接合体変異が孤発性PD発症に極めて重要なリスク因子となっている原因の一つと考えられる。

2) PDにおける疾患特異的iPS細胞を用いた研究の限界と解決法

遺伝性PD患者由来iPS細胞の解析に関しては、PINK1、Parkin、LRRK2、 $\alpha$ -synの各遺伝子変異患者における報告がある。ミトコンドリア異常、酸化ストレスを始めとした各種ストレスに対する脆弱性、 $\alpha$ -synの発現量上昇など各遺伝子変異に特異的な所見を細胞内で再現することが可能であった。一方で、孤発性PDにおける解析の報告は、皆無である。いくつかの理由が考えられ、孤発性PDは元来heterogenousな疾患であり、iPS細胞ドナーの遺伝的背景も多様であることから、特異的所見が検出しにくい、さらに孤発性PDは遺伝要因と環境要因から成り立つが、細胞内では環境要因の付加が十分ではない、などの理由が考えられる。これらの問題点を解決すべく、以下の研究戦略を立案した。

孤発性PDの多様性に対して

孤発性PDの中でも比較的均一な集団であるGBA変異(L444P)を持つ患者由来iPS細胞を対象とする。L444P変異はGBA変異の中でも酵素活性が低く、PD発症の高リスクとなるとされている。

iPS細胞ドナーにおける遺伝的背景の多様

性に対して

近年、Zinc finger nuclease やTALEN、CRISPR/Cas9などの人工ヌクレアーゼによる細胞の遺伝子改変が報告されている。iPS細胞はこれら人工ヌクレアーゼによる遺伝子改変が比較的容易であり、iPS細胞においても2012年以降複数の報告がある。従来の疾患群と正常群(コントロール群)の単純比較では、遺伝的背景の多様性のため、疾患そのものの多様性が高い孤発性PDに対しては有効性が低いと予想される。TALENまたはCRISPR/Cas9を用いて、GBA(L444P)ヘテロ変異を正常型に修復したものをコントロール群とすることによって遺伝的背景を同一にした上で、L444Pヘテロ接合体変異に特異的な変化を検出できるようにする。

ドパミン細胞の純化と環境要因付加

ドパミン神経特異的な変化の解析にはドパミン神経の純化(sorting)が必要であるが、現在の分化技術では、神経系に分化した細胞に対するドパミン神経の割合は約30%でしかない。高橋淳らにより確立された表面マーカーcorinを用いたFACSによるsorting以外に、より分化した細胞sortingの開発を予定している。表現型が検出できなかった場合は、環境要因付加を考慮する。

## 2. 研究の目的

PDでは診断の時点で既に黒質ドパミン細胞は3-4割に減少しており、早期診断に基づいた先制医療が必要である。GBA変異PD患者由来のiPS細胞モデルから、マイクロアレイやプロテオミクスによるパスウェイ解析を始めとした網羅的解析により、発症前の生化学的早期バイオマーカーと疾患特異的ターゲット分子の同定までを本研究の目的とする。バイオマーカーはPD患者の髄液で検証を行い、疾患特異的ターゲット分子からは将来的に薬剤スクリーニングシステムの構築を目指す。さらにヒット化合物・薬物のin vivoでの検証に関して、モデル動物としては、GBA<sup>-/-</sup>メダカ、あるいは $\alpha$ -syn BACトランスジェニックマウスとGBAヘテロノックアウトマウスの交配マウスが候補となりうる。GBA<sup>-/-</sup>メダカは、ヒトやマウスではGBA活性を欠損すると致死となるのに対し月単位で生存し、神経細胞内の $\alpha$ -Synやp62の凝集体形成、軸索内のスフェロイド形成を認める我々が開発したモデルメダカである。

## 3. 研究の方法

GBA変異を持つ孤発性PD患者を同定し、研究参加への同意のもと、採血によりリンパ球を採取し、iPS細胞を作製する。人工ヌクレアーゼであるTALENやCRISPR/cas9を用いたゲノム編集を行い、GBA変異を正常型に変換し、正常コントロールとして使用する。同時

に健常人から樹立された iPS 細胞に孤発性 PD 患者に認められた GBA 変異を導入する。

これらの遺伝子改変 iPS 細胞は最終的に神経系（特にドパミン神経細胞）に分化させ、マイクロアレイを用いたパスウェイ解析などを行い、個体差を除外した疾患特異的な異常の検出に使用されるが、このための基盤づくりを行う。

#### 4. 研究成果

##### 1) 結果

国立病院機構宇多野病院通院中の患者の中から、倫理委員会の承認のもとに、GBA 遺伝子のシークエンスを行い、GBA 変異患者 (RecNCI GBA mutation) を同定した。患者の選定・同意には澤田秀幸臨床研究部長・大江田知子神経内科医長の協力を得た。本患者の皮膚組織より繊維芽細胞を採取し、plasmid 法により iPS 細胞を樹立した。

iPS 細胞の遺伝子修復による isogenic control/mutant 作製について、まず HEK293 細胞において pilot study を行った。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集のため、GBA 444 番目アミノ酸 (L444) を target とした guide RNA を作製し、cas9 plasmid とともに transfection を行ったが、ゲノム編集率は 10%弱と予想された確率より低い確率でしか編集が認められなかった。その後同手法を用いた方法では、GBA 遺伝子の L444 部位に対しては、iPS 細胞を用いた場合 1/200 程度の効率であるとの報告がなされた。

このため、個体差・遺伝的バックグラウンドの解消の手段として、多数例の GBA 変異患者を対象とすること、ドパミン神経への分化の程度をそろえて均一なドパミン細胞集団を解析すること、とした。

に対して、京都大学附属病院通院中の患者約 150 名に対して、倫理委員会の承認のもと、GBA 遺伝子のシークエンスを行った。L444P、R120W、など 6 名の GBA 変異患者を同定した。c.1447\_1466 delinsTG 変異は PD における GBA 変異としては新規の変異であった (Gaucher 病変異では報告あり)。これら L444P、R120W、c.1447\_1466 delinsTG 変異患者より plasmid 法により計 5 系統以上の iPS 細胞を樹立した。

に関して、ドパミン前駆細胞の細胞表面に発現する corin に注目して sorting を行った。Sorting により 70-80%程度まで corin 陽性細胞を濃縮することが可能であったが、corin の発現率に個体差があること、また細胞数が 10%以下に減少すること、その後の成熟ドパミン細胞の段階で完全には分化がそろわけてではないことが判明した。

##### 2) 考察・結論

iPS 細胞は人工 nuclease を用いた遺伝子改変に適しているとされているが、そのゲノム編集効率は遺伝子部位により大きく変わることが分かってきた。最も酵素活性が低下する L444P 変異をターゲットとしたが、R120W などその他の部位もゲノム編集のターゲットとして考慮する必要がある。また、分化の程度を揃えて分化ドパミン細胞の正確な比較を行う必要があるが、この点に関しても従来の corin による sorting は、細胞移植には効果を発揮するが、疾患研究には不十分と考えられる。

近年、細胞内の複数の miRNA 活性の違いを定量的に感知することで、分化した細胞の同定や分離の精度を 90%程度まで高めることができる技術が開発されており、分化ドパミン細胞に適応することでこれらの問題を克服できる可能性がある。

##### 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4件)

Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Yamakado H, Takahashi R. Viable neuronopathic Gaucher disease model in Medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein. *PLoS Genet.* 11(4):e1005065. 2015 doi: 10.1371/journal.pgen.1005065. (査読有)

Yamakado H. Advance in PD research explored a new field on ubiquitin biology. *Mov Disord.* 10:1243. 2014 doi: 10.1002/mds.25977. (査読有)

Tojima M, Hitomi T, Jingami N, Tanioka K, Yamakado H, Matsumoto R, Takahashi Y, Ikeda A, Takahashi R. Two cases of acute onset of focal cortical reflex myoclonus following acute aseptic meningoencephalitis with positive anti-glutamate receptor autoantibody. *Rinsho Shinkeigaku.* 54:543-9. 2014 (査読有)

Matsui H, Uemura N, Yamakado H, Takeda S, Takahashi R. Exploring the pathogenetic mechanisms underlying Parkinson's disease in medaka fish. *J Parkinsons Dis.* 4:301-10. 2014. doi: 10.3233/JPD-130289. Review. (査読有)

[学会発表](計14件)

Generation of iPS cells harboring GBA heterozygous mutations.

陣上 直人、山門 穂高、小芝 泰、大江田 知子、澤田 秀幸、堀田 秋津、井上 治久、高橋 淳、高橋 良輔

Neuroscience 2014 Yokohama, Sep 13-15, 2014

iPS Cell Modeling of Genetic Parkinson's Disease.

小芝 泰、森実 飛鳥、山門 穂高、菊地 哲広、陣上 直人、土井 大輔、井上 治久、高橋 淳、高橋 良輔

Neuroscience 2014 Yokohama, Sep 13-15, 2014

Generating mice models for idiopathic Parkinson's disease.

山門 穂高、生野 真嗣、浅野 剛史、高橋 良輔

Neuroscience 2014 Yokohama, Sep 13-15, 2014

Alpha-synuclein accumulation in Gaucher disease model of medaka does not contribute to neurodegeneration.

上村 紀仁、藤原 - 石川 智子、木下 政人、小池 正人、松井 秀彰、山門 穂高、内山 安男、藤堂 剛、武田 俊一、高橋 良輔

Neuroscience 2014 Yokohama, Sep 13-15, 2014

Increased synaptic density and improved spatial memory in N-cadherin shedding deficient knock-in mice

浅田 めぐみ、久保田 正和、野田 秦葉、上田 奈津実、諏訪 あゆみ、宮本 将和、田代 喜崇、山門 穂高、山下 博史、下濱 俊、高橋 良輔、植村 健吾、木下 専、木下 彩栄

Neuroscience 2014 Yokohama, Sep 13-15, 2014

Screening of small molecules that down-regulate  $\alpha$ -synuclein transcription for drugs to treat Parkinson's disease

浅野 剛史、山門 穂高、高橋 良輔

Neuroscience 2014 Yokohama, Sep 13-15, 2014

Analysis of the ATP13A2 (PARK9) mutant medaka

樽野 陽亮、松井 秀彰、上村 紀仁、山門 穂高、高橋 良輔

Neuroscience 2014 Yokohama, Sep 13-15, 2014

Creating mice models for sporadic Parkinson's disease based on its genetic risk factors

生野 真嗣、浅野 剛史、山門 穂高、高橋 良

輔

Neuroscience 2014 Yokohama, Sep 13-15, 2014

Two cases of Parkinson's disease with GBA heterozygous mutation (c.1447\_1466delinsTG)

陣上 直人、山下 博史、山門 穂高、澤本 伸克、高橋 良輔.

日本人類遺伝学会 Tokyo, Oct 14-17, 2015.

Creating mice models for sporadic Parkinson's disease based on its genetic risk factors.

生野 真嗣、浅野 剛史、山門 穂高、高橋 良輔

Neuroscience 2015 Kobe, Jul 28-31, 2015

Pathological role of GBA2 in GBA1-deficient neuronopathic Gaucher's disease model of medaka

中西 悦郎、上村 紀仁、秋山 央子、木下 政人、山門 穂高、武田 俊一、平林 義雄、高橋 良輔

Neuroscience 2015 Kobe, Jul 28-31, 2015

Pathological role of the innate immune system in neuronopathic Gaucher disease model in medaka

上村 紀仁、中西 悦郎、木下 政人、山門 穂高、武田 俊一、高橋 良輔

Neuroscience 2015 Kobe, Jul 28-31, 2015

Analysis of the ATP13A2 (PARK9) mutant medaka.

樽野 陽亮、松井 秀彰、上村 紀人、山門 穂高、高橋 良輔

Neuroscience 2015 Kobe, Jul 28-31, 2015

15歳で発症した FUS p.P525L (c. 1574 C>T, hetero) 変異を伴う ALS の一剖検例

綾木 孝、引網 亮太、端 祐一郎、山門 穂高、辰己 新水、山下 博史、澤本 伸克、辻 輝之、漆谷 真、高橋 良輔. 第 11 回

日本神経病理学会近畿地方会 2015 年 6 月 27 日

〔図書〕(計 3 件)

山門 穂高、高橋 良輔、日本臨床社、神経症候群 (第 2 版) II 孤発性パーキンソン病、2014、65

生野 真嗣、山門 穂高、高橋 良輔、難病と在宅ケア パーキンソン病講座 治療ガイドラインと最近の進歩 2014、Vol. 20 No. 1

山門 穂高、高橋 良輔、科学評論社、神経内科 特集 II . 神経疾患の動物モデルをめぐって Parkinson 病動物モデル、2014、

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山門 穂高 (YAMAKADO, Hodaka)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号： 10378771

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし