

平成30年6月5日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06777

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた遺伝性パーキンソン病の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of hereditary Parkinson's disease using induced pluripotent stem cells

研究代表者

太田 悦朗(OHTA, ETSURO)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：60508042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：LRRK2は優性遺伝パーキンソン病(PD)の原因分子の一つである。本研究では、I2020T変異LRRK2が起因となるPD発症機序の解明とその病態モデルの確立を目指し、I2020T変異LRRK2を有する相模原家系内PD患者iPS細胞と剖検脳を用いた病態解析を行った。その結果、iPS細胞から誘導した患者の神経細胞群から、酸化ストレスの脆弱性、ドーパミンの放出異常、細胞内のAKT/GSK-3シグナル伝達経路の異常によるリン酸化タウの増加を明らかにした。また、iPS細胞樹立患者の死後脳から、GSK-3活性化によるリン酸化タウの増加、そしてそれが脳内に沈着して生じる神経原線維変化を確認した。

研究成果の概要(英文)：LRRK2 is the causative molecule of the autosomal dominant hereditary form of Parkinson's disease (PD), PARK8, which was originally defined in a study of a Japanese family harboring the I2020T mutation. In the present study, to elucidate the mechanism of neurodegeneration in PD caused by LRRK2, we generated iPS cells (iPSC) derived from fibroblasts of PD patients. We found that patient LRRK2 iPSC-derived neurons released less dopamine than control-iPSC-derived neurons. Furthermore, we demonstrated that patient iPSC-derived neurons had a lower phospho-AKT level than control-iPSC-derived neurons, and that the former showed an increased incidence of apoptosis relative to the controls. Interestingly, patient iPSC-derived neurons exhibited activation of GSK-3 and high Tau phosphorylation. In addition, the postmortem brain of the patient from whom the iPSC had been established exhibited deposition of neurofibrillary tangles as well as increased Tau phosphorylation in neurons.

研究分野：細胞生物学

キーワード：パーキンソン病 LRRK2 iPS細胞 TAU ゲノム編集 PARK8

1. 研究開始当初の背景

優性遺伝パーキンソン病 (PD) の原因分子 Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) に変異をもつ PD 患者は、臨床症状や発症年齢、治療薬レボドパに対する反応性が孤発性 PD 患者と類似した特徴を示す。そのため LRRK2 の解析は、PD の発症機序を理解する上で重要と考えられる。これまでに申請者は、日本の優性遺伝 PD 家系 (相模原家系) の発症原因が LRRK2 のキナーゼドメイン内の I2020T 変異であることを明らかにした。その後、正常 LRRK2 および変異 LRRK2 に関する生理的機能や生化学的特性、LRRK2 の基質候補分子を明らかにしてきた。これらを踏まえて、共同研究者である慶應義塾大学生理学岡野栄之教授と大阪大学神経内科学望月秀樹教授と共に、I2020T 変異 LRRK2 を有する相模原家系内 PD 患者 2 名の皮膚線維芽細胞から人工多能性幹細胞 (iPSC) を樹立し、神経細胞への分化誘導に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、I2020T 変異 LRRK2 をもつ遺伝性パーキンソン病患者から樹立した iPSC 細胞由来神経細胞を用いた解析および iPSC 細胞を樹立した患者剖検脳を用いた解析を行うことによって、①パーキンソン病患者の iPSC 細胞由来神経細胞の *in vitro* 病態モデルとしての評価、②I2020T 変異 LRRK2 が引き起こすパーキンソン病の発症機序の解明、を目的とする。

3. 研究の方法

(1) iPSC 由来神経細胞の機能および形態に関する解析

I2020T 変異 LRRK2 を有する相模原家系内 PD 患者 2 名 (LA、LB) から樹立した iPSC 細胞 (I2020T LRRK2-iPSC) 4 株と健常者 2 名から樹立された iPSC (Control-iPSC) 2 株を使用した。分化誘導法は、既報に従い、iPSC から胚様細胞塊、さらには神経幹細胞塊を形成させ、神経細胞へ分化誘導した。iPSC 由来神経細胞は、Beta-III Tubulin 抗体、GFAP 抗体、TH 抗体を用いた免疫化学染色によって評価した。I2020T LRRK2-iPSC および Control-iPSC 由来神経細胞におけるドーパミン量またはドーパミン放出能について HPLC を用いて測定した。また、PD 患者と健常者間におけるリン酸化タンパク質の差異に関して、ウェスタンブロットを用いて解析した。同様に、酸化ストレスの指標となる酸化修飾蛋白質を Oxyblot 法で解析した。さらに、長期培養した I2020T LRRK2-iPSC および Control-iPSC 由来神経細胞におけるアポトーシス陽性細胞の数的差異を調べた。

(2) 患者剖検脳の解析および iPSC との比較

iPSC を樹立した LB 患者の剖検脳について、病理学的解析および分子レベルでの生化学的解析を行った。特に、神経原線維変化およ

び Tau のリン酸化に関しては、様々なリン酸化部位認識抗体を用いて解析を進めた。iPSC 由来神経細胞から得られた結果と比較解析を行い、患者 iPSC を *in vitro* の PD 病態モデルとして評価した。

(3) 遺伝子修復した患者 iPSC 細胞の作製および解析

共同研究機関の慶應義塾大学生理学で作製済の LRRK2-TALEN プラスミドを使用して、患者 iPSC における I2020T 変異を遺伝子修復した。シーケンス解析による遺伝子修復の確認および characterization による選別後、遺伝子修復した患者 iPSC の細胞株の樹立を行った。さらに、遺伝子編集技術によって遺伝子修復された患者 iPSC を神経細胞に分化誘導して、異常な表現型が回復するかについて解析した。

(4) 薬剤スクリーニングによる神経保護効果をもつ薬剤の探索

患者の iPSC 由来神経細胞では、細胞死の亢進が予想されるため、LRRK2 を標的にした LRRK2 inhibitor 群を投与し、神経保護効果があるか否かを評価した。

4. 研究成果

(1) iPSC 由来神経細胞の機能および形態に関する解析

樹立した iPSC の characterization を行った結果、3 胚葉への分化および正常な核型を示すことを確認した。また、培養 1 4 日後の iPSC 由来細胞は、80% が神経細胞、そのうち約 5% が TH 陽性のドーパミン産生神経細胞を示した。さらに、培養 118 日後では、約 20% がドーパミン産生神経細胞を示すことがわかった。

培養 86 日後の I2020T LRRK2-iPSC および Control-iPSC 由来神経細胞におけるドーパミン量を測定した結果、差異はみられなかった。しかし、Control-iPSC 由来神経細胞に比べ、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞のドーパミン放出能が有意に低下していた。

次に、I2020T LRRK2-iPSC および Control-iPSC 由来神経細胞におけるタンパク質レベルを解析した結果、Control-iPSC 由来神経細胞群に比べ、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞群における LRRK2 タンパク質の低下、リン酸化 AKT (Ser473 および Thr308) の低下がそれぞれみられた。さらに、phospho-AKT substrate antibody を用いた AKT 基質分子群のリン酸化レベルを調べた結果、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞群において、AKT 基質分子群のリン酸化レベルは低下していた。これより AKT の機能低下が推測された。

次に、AKT の下流分子 GSK-3 β に着目して解析をした結果、Control-iPSC 由来神経細胞群に比べ、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞群において、Ser9 のリン酸化 GSK-3 β が低下しており、活性化型 GSK-3 β に変化している可能性が考えられた。そこで続いて、GSK-3 β

の下流分子で神経変性に関与する分子の1つであるTAUに着目し、GSK-3 β によるTAUのリン酸化部位（Ser202/Thr205、Thr231/Ser235、Thr181、Ser396/Ser404）について解析した。その結果、Control-iPSC由来神経細胞群に比べ、I2020T LRRK2-iPSC由来神経細胞群において、GSK-3 β によるリン酸化TAUが亢進していた。さらに、Phos-tagゲルを用いた解析においても同様にTAUのリン酸化レベルがI2020T LRRK2-iPSC由来神経細胞群において増加していることを確認した。また、LRRK2阻害剤であるLRRK2-IN1およびGSK-3 β 阻害剤であるCHIR-99021を用いた実験より、変異LRRK2によるTAUのリン酸化亢進が判明したが、AKT/GSK-3 β シグナル伝達経路の異常によってリン酸化タウがより増加することがわかった。

次に、酸化ストレスに対する脆弱性を調べるために、過酸化水素を添加したI2020T LRRK2-iPSCおよびControl-iPSC由来神経細胞におけるアポトーシス陽性細胞の数的差異を調べた結果、活性化カスパーゼ-3がControl-iPSC由来神経細胞群に比べ、I2020T LRRK2-iPSC由来神経細胞群において増加することがわかった。特に、TH陽性のドーパミン産生神経細胞において顕著に差異がみられた。

樹立iPSCの*in vitro*病態モデルとしての評価として、PDで報告されているオートファジー機能不全および α -synucleinの蓄積、酸化修飾蛋白質について解析した。その結果、Control-iPSC由来神経細胞群に比べ、I2020T LRRK2-iPSC由来神経細胞群におけるオートファジー関連分子p62の増加傾向およびLC3B-IIの有意な増加がみられた。また、Oxyblot法の結果、I2020T LRRK2-iPSC由来神経細胞群における酸化修飾蛋白質の増加がみられた。一方、 α -synucleinのタンパク質レベルにおいては、両群で差異はみられなかったが、PARK8の相模原家系内のPD患者においては、ほとんどが α -synucleinの蓄積がみられないことから矛盾しない結果であった。

(2) 患者剖検脳の解析およびiPSCとの比較

iPSCを樹立したうちのLB患者の死後脳について、AT8抗体を用いた免疫組織化学染色で調べたところ、海馬および青斑核、黒質においてGSK-3 β 活性化によるリン酸化タウの増加がみられた。また、海馬をGallyas-Braak染色で調べた結果、リン酸化タウが脳内に沈着して引き起こされる神経原線維変化を検出した。

次に、LB患者剖検脳をウエスタンブロットで解析した結果、disease control剖検脳群と比較して、リン酸化タウの増加および活性化型GSK-3 β の増加がみられた。これより、I2020T LRRK2-iPSC由来神経細胞群においてみられた活性化GSK-3 β によるリン酸化タウの増加を確認した。

(3) 遺伝子修復した患者iPSC細胞の作製および解析

TALENによるゲノム編集技術でLRRK2-iPSCにおけるI2020T変異を遺伝子修復し、11株のゲノム編集iPSCを樹立した。樹立TALEN-iPSCのcharacterizationにおいて、多能性マーカー発現および正常な染色体核型解析を確認した。さらに、TALEN-iPSC由来神経細胞では、I2020T LRRK2-iPSC由来神経細胞でみられた神経突起の異常短縮や酸化ストレスに対する細胞脆弱性が健常者iPSC由来神経細胞と同程度まで回復していた。

(4) 薬剤スクリーニングによる神経保護効果をもつ薬剤の探索

LRRK2を標的にしたLRRK2 inhibitor群を投与して神経突起長への影響を調べた結果、LRRK2-IN1投与時では、非投与時と比較し、神経突起長の伸長がみられた。

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 3 件)

- ① Murakami N, Ishikawa T, Kondo T, Keiko Imamura, Tsukita K, Enami T, Funayama M, Shibukawa R, Matsumoto S, Izumi Y, Ohta E, Obata F, Kaji R, Inoue H. Establishment of DYT5 patient-specific induced pluripotent stem cells with a GCH1 mutation. *Stem Cell Res*, 2017, 24, 36-39. 査読有
- ② Kubo M, Nagashima R, Ohta E, Maekawa T, Isobe Y, Kurihara M, Eshima K, Iwabuchi K, Sasaoka T, Azuma S, Melrose HL, Farrer MJ, Obata F. Leucine-rich repeat kinase 2 is a regulator of B cell function, affecting homeostasis, BCR signaling, IgA production, and TI antigen responses. *J Neuroimmunol*, 2016, 292, 1-8. 査読有
- ③ Ohta E, Nihira T, Uchino A, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Takahashi K, Hayakawa H, Nagai M, Ohshima M, Ryo M, Ogino M, Murayama S, Takashima A, Nishiyama K, Mizuno Y, Mochizuki H, Obata F, Okano H. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagami-hara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3 β signaling pathway. *Hum Mol Genet*, 2015, 24 (17), 4879-4900. 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① 太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鶴飼 英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、川村俊彦、岡野栄之：遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経細胞における経時的なmRNA発現解析. 第17回日本再生医療学会総会、2018. 3. 21-23 (横浜)
- ② 大日方友理、岩下 由佳、永井 真貴子、服部 精人、江島 耕二、小幡 文弥、川村俊彦、岡野 栄之、太田悦朗：遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経幹細胞移植マウスの作製および病態解析. 第17回日本再生医療学会総会、2018. 3. 21-23 (横浜)
- ③ Ohta E, Obinata Y, Iwashita Y, Nagai M, Hattori A, Eshima K, Obata F, Okano H: Generation of a mouse model of familial Parkinson's disease bearing patient iPSC-derived transplanted neurospheres. The 8th meeting of Asian Cellular Therapy Organization, 2017年10月27日～29日 (Tokyo, Japan)
- ④ Obinata Y, Iwashita Y, Nagai M, Hattori A, Eshima K, Obata F, Okano H, Ohta E, Generation of a mouse model of familial Parkinson's disease bearing patient iPSC-derived transplanted neurospheres. XXIII World Congress of Neurology, 2017年9月16日～21日 (Kyoto, Japan)
- ⑤ 大日方友理、岩下由佳、永井真貴子、服部精人、江島耕二、岡野栄之、小幡 文弥、太田悦朗：遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経幹細胞移植マウスの作製. 第40回日本神経科学大会、2017. 7. 20-23 (幕張)
- ⑥ Ohta E, Sone T, Obinata Y, Ukai H, Hisamatsu T, Kitagawa T, Ishikawa M, Komano H, Ueda HR, Obata F, Okano H: Generation of gene-corrected iPSC from patient-derived iPSC with familial Parkinson's disease. International Society for Stem Cell Research 2017 Annual Meeting, 2017年6月13日～16日 (Boston, USA)
- ⑦ 太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鶴飼英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之 遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞におけるゲノム編集iPS細胞の樹立. 第16回日本再生医療学会総会、2017. 3. 8 (仙台)
- ⑧ 大日方友理、太田悦朗、曾根岳史、鶴飼英樹、久松知子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之：遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞のゲノム編集および病態解析. 第11回日本臨床検査学教育学会学術大会、2016. 9. 1 (神戸)
- ⑨ 太田悦朗、曾根岳史、大日方友理、鶴飼英樹、久松知子、北川季子、石川充、駒野肇、上田泰己、小幡文弥、岡野栄之：遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞におけるゲノム編集iPS細胞の樹立. 第39回日本神経科学大会、2016. 7. 20 (横浜)
- ⑩ Hoshino K, Hayashi M, Isono Y, Nagao Y, Kimura K, Hachimori K, Nozaki H, Ohta E, Obata F, Kawarai T, Kaji K. Segawa disease with action retrocollis (cervical dystonia); A case report of 23-year-old female. 14th International Child Neurology Congress, 2016年5月4日～5日 (Amsterdam, Netherland)
- ⑪ 太田悦朗、仁平友子、内野彰子、今泉陽一、岡田 洋平、赤松和土、高橋加代子、永井真貴子、大山学、梁正淵、荻野美恵子、村山繁雄、高島明彦、西山和利、水野美邦、望月秀樹、小幡文弥、岡野栄之：I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons exhibit increased Tau

phosphorylation. 第15回日本再生医療学会総会、2016. 3. 17 (大阪)

- ⑫ 曾根岳史、朴聖俊、田中泰圭、太田悦朗、日暮 憲道、中井 謙太、廣瀬 伸一、岡野栄之：ゲノム編集した患者由来疾患iPS細胞の全ゲノム解析によって明らかになったこと. 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会、2015. 12. 2 (神戸)
- ⑬ Ohta E, Nihira T, Uchino A, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Takahashi K, Hayakawa H, Nagai M, Ohyama M, Ryo M, Ogino M, Murayama S, Takashima A, Nishiyama K, Mizuno Y, Mochizuki H, Obata F, Okano H. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagami-hara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3 β signaling pathway. XXI WFN World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, 2015年12月9日～11日 (Milan, Italy)
- ⑭ Sone T, Tanaka Y, Ohta E, Hosoya M, Ichiyangi N, Akiyama T, Higurashi N, Hirose S, Okano H. TALEN-mediated genome editing of patient-derived iPSCs for disease model studies. The Conference on Transposition and Genome Engineering, 2015年11月17日～21日 (Nara, Japan)
- ⑮ 太田悦朗、仁平友子、内野彰子、今泉陽一、岡田 洋平、赤松和土、高橋加代子、永井真貴子、大山学、梁正淵、荻野美恵子、村山繁雄、高島明彦、西山和利、水野美邦、望月秀樹、小幡文弥、岡野栄之：I2020T LRRK2変異をもつ遺伝性パーキンソン病患者のiPS細胞由来神経細胞はTauのリン酸化亢進を示す. 第38回日本神経科学大会、2015. 7. 28 (神戸)
- ⑯ 太田悦朗、仁平友子、内野彰子、今泉陽

一、赤松和土、高橋加代子、永井真貴子、大山学、梁正淵、荻野美恵子、村山繁雄、高島明彦、西山和利、水野美邦、望月秀樹、小幡文弥、岡野栄之：I2020T LRRK2 iPSC-derived neurons exhibit increased Tau phosphorylation. 第56回日本神経学会学術大会、2015. 5. 22 (新潟)

[図書] (計 3 件)

- ① 太田悦朗：LRRK2(PARK8)の病態. 「週刊医学のあゆみパーキンソン病の新展開—発症の分子機構と新規治療」編者：高橋良輔、262(6)：591-596、医歯薬出版株式会社、東京都、2017
- ② 太田悦朗、岡野栄之：パーキンソン病のiPS細胞研究. 「月刊細胞 The CELL 特集疾患特異的iPS細胞を用いた病態解明の最前線」編者：福田恵一、48(2)：5-8、ニューサイエンス社、東京都、2016
- ③ 太田悦朗：iPS細胞を用いたパーキンソン病の病態解析. 「ブレインサイエンス・レビュー2015」編者：廣川信隆、1:15-34、株式会社クバプロ、東京都、2015

[その他]

ホームページ等

- ① http://www.keio.ac.jp/ja/press_release/2015/.../20150616_01.pdf
- ② <http://www.nikkan.co.jp/news/nkx1021020150eaaz.html>
- ③ <http://news.mynavi.jp/news/2015/06/17/298/>
- ④ https://yomidr.yomiuri.co.jp/article/20170403-OYTET50009/?catname=news-kaisetsu_news

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 悦朗 (OHTA ETSURO)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：60508042