

令和元年6月13日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09676

研究課題名(和文) エネルギーホメオスタシスに着目した新規パーキンソン病細胞モデルの開発

研究課題名(英文) Development of novel cellular models for Parkinson's disease focusing on energy-homeostasis

研究代表者

船山 学 (FUNAYAMA, Manabu)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70468578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：パーキンソン病(PD)原因遺伝子であるCHCHD2の分子病態を明らかにし新しいin vitro細胞モデルを開発する目的でCHCHD2ノックアウトSH-SY5Y細胞とCHCHD2 T61I変異陽性PD患者由来iPS細胞を作製した。作製した2種類の細胞はCHCHD2の喪失とミトコンドリア電子伝達系の機能低下が共通して認められ、PDの病態生理を解明する新しい細胞モデルとなりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病(PD)とミトコンドリア機能低下は数十年来指摘されているが、家族性PDの原因遺伝子で直接ミトコンドリア電子伝達系に関与している遺伝子はCHCHD2のみである。本研究で開発したCHCHD2細胞モデル(ノックアウト細胞およびPD患者iPS細胞)に共通してミトコンドリア電子伝達系の機能低下が見出され、この表現型を指標としたPDの病態解明や新規治療薬の開発への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：We recently identified coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2) mutations are novel causes for autosomal dominant Parkinson's disease (PD). Although CHCHD2 is localized to mitochondria and involved in mitochondrial complex IV, its function remains largely unknown. To elucidate the role of CHCHD2 in mitochondria, we generated CHCHD2 knockout SH-SY5Y neuroblastoma cells (CHCHD2-KO) and induced pluripotent stem cells (iPSc) derived from PD patient with CHCHD2 T61I mutation. CHCHD2-KO as well as iPSc showed a profound mitochondrial dysfunction, suggesting that CHCHD2 plays a crucial role in maintaining normal mitochondrial function. These findings indicate that CHCHD2 cellular models are a useful model for understanding CHCHD2 function and pathophysiology of CHCHD2 mutations and PD.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：パーキンソン病 ミトコンドリア 電子伝達系 遺伝子 iPS細胞 ノックアウト細胞 酸化ストレス

## 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 (PD) は静止時振戦、筋固縮、姿勢反射障害などを呈する進行性の神経変性疾患である。PD の第1の発症リスクは加齢であり、患者数の増加は日本人の寿命延長や疾患の認知、および適切な医療が提供されていることを反映しているが、超高齢化社会へ突入しつつあるわが国では医療保険財政を圧迫する重大な疾病である。PD は原因不明で現在の治療は薬剤による対症療法および外科療法であるが、治療の完治を目指す根治療法は開発されていない。

PD は通常孤発性で発症するが、全患者の 5-10% に家族歴が認められる。このような遺伝性 PD の原因遺伝子を単離することで、疾患に直接関与する遺伝子を明らかにすることができる。これまで約 20 種類の PD 原因遺伝子が報告されている。我々は 2015 年、常染色体優性遺伝性 PD の新規原因遺伝子として coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain containing 2 (CHCHD2) を単離した (Lancet Neurology, 2015)。CHCHD2 はミトコンドリア局在配列を持ちミトコンドリア膜間腔に局在し、複合体 IV の機能を調節していると言われていたが、PD 患者から同定された変異 CHCHD2 がこれらの機能に影響している証拠は無い (LANCET Neurology, 2015, PLoS Genet, 2009)。

### 2. 研究の目的

PD 患者から同定した変異 CHCHD2 の分子病態を明らかにする目的で、本研究では電子伝達系および解糖系を含む細胞内代謝経路が変異 CHCHD2 によってどのように変化するか解析し、変異 CHCHD2 の *in vitro* における表現系を明らかにすることで、エネルギーホメオスタシスに着目した PD の新しい細胞モデルを開発する。

### 3. 研究の方法

#### (1) CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞の作製

CHCHD2 遺伝子の開始コドンを選択的とするガイド RNA (gRNA) をデザインし、CRISPR/Cas9 システムをもちいてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞の CHCHD2 遺伝子ノックアウト細胞を作製した。dCas-Fok I プラスミドおよび gRNA プラスミドを SH-SY5Y 細胞へ導入後、限界希釈法で細胞をクローン化し CHCHD2 ノックアウト細胞を得た。ノックアウト細胞の CHCHD2 遺伝子の標的配列を PCR 増幅後 TA クローニングしシーケンス解析で配列を確認した。さらに qPCR 法、およびウエスタンブロット法により CHCHD2 の発現確認を行った。

#### (2) CHCHD2 T61I 変異を有する PD 患者 iPS 細胞の樹立とドーパミン神経細胞分化

CHCHD2 T61I 変異陽性患者 1 名の皮膚線維芽細胞から Imaizumi らの方法 (Mol Brain, 2012) をもちいて iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞からドーパミン神経細胞へは Matsumoto らの方法 (Stem Cell Rep, 2016) をもちいた。ドーパミン神経細胞の分化指標として tyrosine hydroxylase の発現をウエスタンブロット法で確認した。

#### (3) 酸素呼吸量および解糖能の測定

SH-SY5Y CHCHD2 ノックアウト細胞および iPS 由来ドーパミン神経細胞の酸素呼吸量は XF ミトストレスキット (アジレント社) をもちいて細胞外フラックスアナライザー XFe24 (アジレント社) で測定した。解糖能は XF 解糖ストレスキット (アジレント社) をもちいて測定した。

#### (4) ATP 量および ATP 合成能の測定

SH-SY5Y および iPS 由来ドーパミン神経細胞の ATP 量は各細胞総タンパク量 1mg を定量し、ATP バイオルミネッセンスアッセイキット CLS II (シグマアルドリッチ社) をもちいてルシフェラーゼによる発光として Mithras2 LB943 プレートリーダー (バルトールド社) で測定した。ATP 合成能は各細胞総タンパク量 1mg を定量し、基質 (ADP) と共に 37°C 10 分間反応後 ATP バイオルミネッセンスアッセイキット CLS II をもちいてルシフェラーゼによる発光として Mithras2 LB943 プレートリーダーで測定した。

#### (5) 酸化ストレスの測定

SH-SY5Y 細胞の酸化ストレスは 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H2DCFDA) および MitoSOX Red をもちいて蛍光強度として測定した。

#### (6) メタボロミクス解析

SH-SY5Y 細胞および CHCHD2 ノックアウト細胞について、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析法 (CE-TOFMS) をもちいて野生型細胞とノックアウト細胞の代謝物質を比較した (ヒューマンメタボロームテクノロジー社)。

#### (7) レチノイン酸処理による SH-SY5Y 細胞の分化

SH-SY5Y 細胞および CHCHD2 ノックアウト細胞に 10  $\mu$  M レチノイン酸を 6 日間処理後、細胞を回収し、ウエスタンブロット法で各神経細胞分化マーカータンパク発現量を観察した。神経細胞分化マーカーとして、nestin、synaptophysin、beta III tubulin、アストロサイトマーカーとして GEAP の抗体をそれぞれもちいた。

### 4. 研究成果

#### (1) CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞の解析

PD における CHCHD2 遺伝子変異の病態生理を明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムをもちいてヒト神経芽細胞株である SH-SY5Y 細胞の CHCHD2 遺伝子ノックアウト細胞を作製し、種々の解析を行った。CHCHD2 はミトコンドリアに局在し、複合体 IV の機能を調節していると考えられているため、CHCHD2 ノックアウト細胞のミトコンドリアにおける表現型を解析した。ATP 合成能および ATP 量は共に野生型に比べ有意に低下していることが明らかとなった (図 1)。このことから CHCHD2 の欠損は電

子伝達系に影響を与えると考え、次に CHCHD2 ノックアウト細胞の酸素呼吸量を解析した。酸素呼吸量はミトコンドリア電子伝達系の酸化リン酸化を反映する。細胞外フラックスアナライザーで測定した結果、ノックアウト細胞の酸素呼吸量は基礎呼吸、最大呼吸共にコントロールに比べ著明かつ有意に低下していることが明らかとなった(図 2)。一方、解糖能はノックアウト細胞で低下傾向が観察されたものの、コントロール細胞と統計学的有意差は無かった。電子伝達系が障害されると細胞内酸化ストレスが上昇することが知られている。そこで酸化ストレスを測定した結果、CHCHD2 ノックアウト細胞では過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、活性酸素(ROS)、およびスーパーオキシドがコントロール細胞に比べ有意に増加していることがわかった(図 3)。

次に、CHCHD2 の機能喪失によってどのような細胞内外の変化が生じるか検討するために CHCHD2 ノックアウト細胞のメタボロミクス解析を実施した。その結果、ノックアウト細胞において乳酸の増加および ATP の減少、TCA サイクルの異常やウレアサイクルの異常などを見出した(表 1)。先に述べたようにノックアウト細胞における解糖能は野生型細胞と比較し低下傾向はあるものの有意な差は見出されなかったが、ノックアウト細胞では乳酸が著明に増加していることから、解糖系が亢進していると推察された。これはノックアウト細胞では酸化リン酸化が阻害され、その代償反応として解糖系が亢進していると示唆された。CHCHD2 の発現を抑制すると複合体 IV の機能低下が生じることが報告されており(PLoS Genet, 2009)、メタボロミクス解析におけるノックアウト細胞の表現型は複合体 IV をはじめとする電子伝達系の機能低下を反映していることが示唆された。その裏づけとして、CHCHD2 ノックアウト細胞はミトコンドリア呼吸鎖複合体の関連タンパクである MTCO2 と COA4 が減少していた。いずれのタンパクも複合体 IV に関与するため、CHCHD2 は複合体 IV の機能調節に関与していることが示唆された。

一方 SH-SY5Y 細胞はレチノイン酸処理によって成熟ニューロン様の神経細胞に分化することが知られている。野生型細胞と CHCHD2 ノックアウト細胞にレチノイン酸を添加し、分化の進行度を各種神経マーカータンパク質についてウエスタンブロット法で観察した。その結果、コントロール細胞は成熟神経細胞マーカーである synaptophysin が高発現しており、レチノイン酸処理によって成熟ニューロン様の神経細胞に分化したことが確認された。しかしながら CHCHD2 ノックアウト細胞は synaptophysin の発現がほとんど無く、レチノイン酸処理によって成熟ニューロン様の神経細胞に分化できないことが明らかとなった。以上の観察結果から、CHCHD2 は神経分化に重要な役割を演じていることが示唆された。

## (2) CHCHD2 T61I 変異陽性患者由来 iPS 細胞の解析

CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞の解析で見出した様々な表現型が CHCHD2 変異をもつ PD 患者でも実際に観察されるかどうかを検証するために、CHCHD2 変異陽性 PD 患者から樹立した iPS 細胞と iPS 細胞から分化させた神経細胞をもちいて解析を行った。まず、CHCHD2 T61I 変異をもつ PD 患者由来 iPS 細胞における CHCHD2 の発現量を解析した。iPS 細胞からドーパミン神経細胞に分化誘導する各段階での CHCHD2 発現量をウエスタンブ

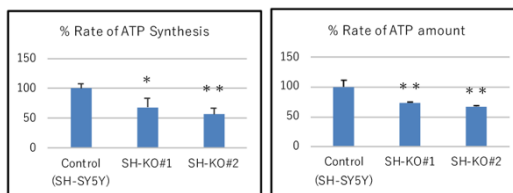


図 1. ATP 量、ATP 合成能の比較  
\*P<0.05, \*\*P<0.01

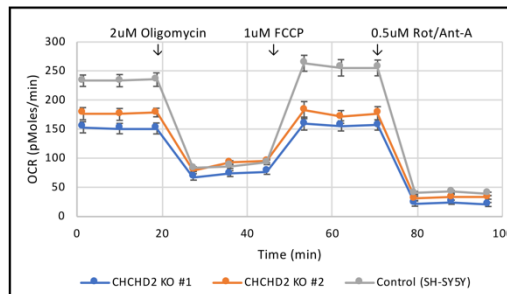


図 2. 酸素呼吸量の比較

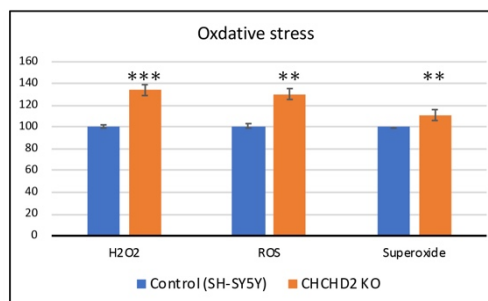


図 3. 酸化ストレスの比較  
\*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

Metabolite	Concentration (pmol/10 <sup>7</sup> cells)				Comparative Analysis	
	Control		KnockOut		Ratio <sup>†</sup>	p-value <sup>‡</sup>
	Mean	S.D.	Mean	S.D.		
Lactic acid	16,610	645	34,733	709	2.1	5.7E-06
Hydroxyproline	111	2.0	78	1.3	0.7	6.9E-05
Succinic acid	245	9.4	592	18	2.4	7.6E-05
GABA	908	27	431	10	0.5	3.0E-04
S-Adenosylmethionine	81	1.0	65	1.6	0.8	4.3E-04
Asp	832	48	357	27	0.4	5.2E-04
Gln	7,739	317	4,766	389	0.6	6.2E-04
Glu	20,773	710	12,792	312	0.6	6.4E-04
Glucose 1-phosphate	176	12	86	9.6	0.5	7.2E-04
Asn	764	33	509	18	0.7	0.001

表 1. メタボロミクス解析で差の大きかったメタボライト 10 種

ロミクス解析で差の大きかったメタボライト 10 種

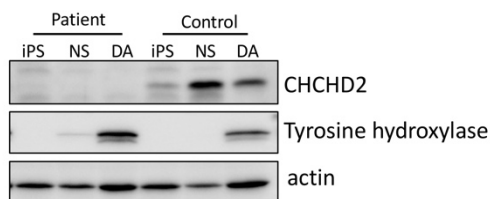


図 4. 神経分化の各段階における CHCHD2 発現  
Patient: CHCHD2 T61I 変異 PD 患者、iPS: induced pluripotent stem cell、ND: neurosphere、DA: dopaminergic neuron。

ロット法と qPCR 法で解析したところ、未分化状態の iPS 細胞では CHCHD2 の発現は非常に低く、神経前駆細胞であるニューロスフィアでは高発現、ドーパミン神経細胞では中等度発現することが明らかとなった (図 4)。このことは先に述べた SH-SY5Y 細胞のレチノイン酸処理によるドーパミン神経細胞分化実験の結果と対応していると考えられる。つまり、CHCHD2 は神経幹細胞または神経前駆細胞から成熟神経細胞への分化段階で重要な役割を演じており、CHCHD2 ノックアウトでは前駆細胞から成熟細胞への分化ができなくなっていると考えられた。一方、CHCHD2 T61I 変異をもつ PD 患者由来の iPS 細胞、ニューロスフィア、ドーパミン神経細胞では mRNA レベルおよびタンパクレベルで CHCHD2 が著明に減少していることが明らかになった (図 4)。CHCHD2 変異が原因の家族性 PD は優性遺伝性であり、iPS 細胞を樹立した CHCHD2 T61I 変異陽性患者もこの変異をヘテロ接合体で持っている。すなわち、片方のアレルは T61I 変異があるが、もう片方のアレルは変異のない野生型の CHCHD2 をもち、野生型 CHCHD2 と T61I 変異 CHCHD2 は理論上等量に発現すると考えられる。にもかかわらず、どの分化ステージにおいても CHCHD2 の発現が著明に低下しているということは、遺伝子変異が存在することで何らかの遺伝子発現抑制または mRNA の分解機構が働いているか、T61I 変異 CHCHD2 が野生型 CHCHD2 と共に速やかに分解されるか、不溶化凝集体として存在している可能性が考えられる。T61I 変異患者ではどのようなメカニズムで CHCHD2 が著明に減少しているかは明らかでなく今後の課題であるが、いずれにしても T61I 変異陽性 PD 患者から樹立した iPS 細胞は CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞と同様の表現型を示す可能性が高いと考えられた。そこで、T61I 変異陽性 PD 患者由来 iPS 細胞について CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞で観察されたミトコンドリア電子伝達系の低下について解析した。CHCHD2 変異陽性患者 iPS 細胞およびコントロール iPS 細胞からドーパミン細胞へ分化させた細胞をもち、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞で表現型が観察されたミトコンドリア機能について詳細に解析した。その結果、CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞と同様にコントロール iPS 細胞由来ドーパミン細胞に比べ CHCHD2 T61I 変異患者 iPS 細胞由来ドーパミン細胞の ATP 量と ATP 合成能が有意に低下していた (図 5)。さらに酸素消費度の測定から ATP 合成、最大呼吸がコントロール細胞に比べ CHCHD2 T61I 変異患者細胞が有意に低下していることが明らかとなった (図 6)。以上の結果から家族性 PD の原因である CHCHD2 T61I 変異をもつ PD 患者 iPS 細胞は、CHCHD2 機能喪失モデル細胞である CHCHD2 ノックアウト SH-SY5Y 細胞と同様の表現型を示すことが明らかとなった。

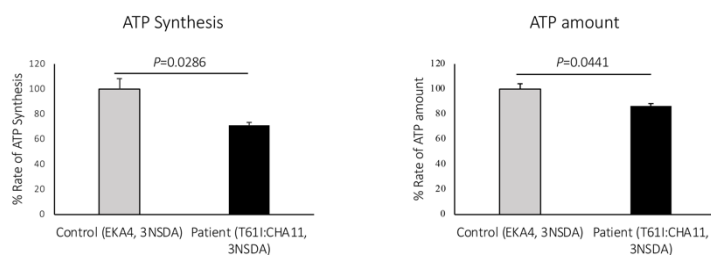


図 5. CHCHD2 T61I 変異 PD 患者由来 iPS 細胞の ATP 合成能と ATP 量

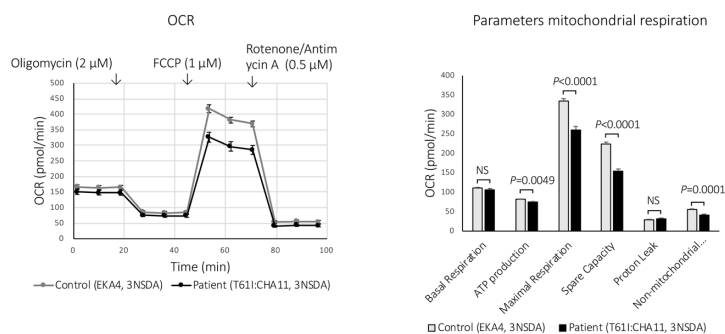


図 6. CHCHD2 T61I 変異 PD 患者由来 iPS 細胞の酸素呼吸解析

以上の結果から、(a) CHCHD2 の機能喪失はミトコンドリアの酸化的リン酸化を阻害し、ATP 合成能を低下させる、(b) 酸化的リン酸化を阻害の結果、細胞内酸化ストレスが上昇する、(c) 酸化的リン酸化を阻害の代償として解糖系が亢進する、(d) 酸化的リン酸化阻害の主要原因は複合体 IV 関連タンパクの発現低下であると考えられる、(e) PD 患者における CHCHD2 ヘテロ接合体変異、すなわち片方のアレルは変異の無い野生型にもかかわらず CHCHD2 の著明な発現減少が起こり、CHCHD2 ノックアウト細胞と同様の酸化的リン酸化障害が起こる、(g) CHCHD2 ノックアウト細胞では神経細胞の成熟化が抑制される、ことが本研究から明らかになった。本研究で開発した CHCHD2 ノックアウト細胞と CHCHD2 T61I 変異をもつ PD 患者由来の iPS 細胞はエネルギーホメオスタシスに着目することで同様の表現型を示すことを証明することができた。本研究で開発した細胞モデルとその表現型を指標に PD に有効な化合物スクリーニングや診断法の開発など PD の新規治療法開発に役立つことが今後期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- Ikeda A, Matsushima T, Daida K, Nakajima S, Conedera S, Li Y, Yoshino H, Oyama G, Funayama M, Nishioka K, Hattori N, A novel mutation of CHCHD2 p.R8H in a sporadic case of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 査読有, 34: 66-68, 2017, DOI:

10.1016/j.parkreldis.2016.10.018.

- ② Meng H, Yamashita C, Shiba-Fukushima K, Inoshita T, Funayama M, Sato S, Hatta T, Natsume T, Umitsu M, Takagi J, Imai Y, Hattori N, Loss of Parkinson's disease-associated protein CHCHD2 affects mitochondrial crista structure and destabilizes cytochrome c. *Nat Commun.* 査読有, 8: 15500, 2017, DOI: 10.1038/ncomms15500.
- ③ Takanashi M, Funayama M (contributed equally), Matsuura E, Yoshino H, Li Y, Tsuyama S, Takashima H, Nishioka K, Hattori N, Isolated nigral degeneration without pathological protein aggregation in autopsied brains with LRRK2 p.R1441H homozygous and heterozygous mutations. *Acta Neuropathologica Communications* 査読有, 6: 105, 2018, DOI: 10.1186/s40478-018-0617-y.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 舩山学, 服部信孝, CHCHD2 is Novel Causative Gene for Autosomal Dominant Parkinson's Disease. 第 39 回日本神経科学大会, 2016.
- ② Funayama M, Park JS, Amo T, Funayama T, Akamatsu W, Sue CM, Hattori N. CHCHD2 DEFICIENCY LEADS TO MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION AND INCREASING OXIDATIVE STRESS IN HUMAN NEUROBLASTOMA SH-SY5Y CELLS. XXIII World Congress of Neurology, 2017.
- ③ 舩山学, パーキンソン病の分子遺伝学研究, 第 59 回日本神経学会学術大会, 2018.

○取得状況 (計 1 件)

名称: パーキンソン病の診断  
発明者: 服部 信孝、舩山 学  
権利者: 学校法人順天堂  
種類: 特許  
番号: 特許第 6468586 号  
取得年: 平成 31 年  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等  
<http://www.juntendo-neurology.com/>

## 6. 研究組織

### (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: 天羽 拓

ローマ字氏名: (AMO, taku)

研究協力者氏名: 赤松 和土

ローマ字氏名: (AKAMATSU, wado)

※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。