

令和元年6月18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：16K09677

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解析システムの開発と病態の再分類

研究課題名(英文) iPSC-based disease modeling of sporadic Parkinson's disease

研究代表者

赤松 和土 (Akamatsu, Wado)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60338184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：順天堂大学に蓄積された孤発性症例パーキンソン病患者検体からiPS細胞の樹立を進め、研究期間中に100症例以上のiPS細胞株を樹立した。樹立した孤発性患者由来iPS細胞を順次ニューロンに分化誘導し、複数の種類の表現型をそれぞれの症例で解析しその結果をデータベース化した。孤発性患者は症例によって示す表現型が様々であり、臨床所見同様に細胞の表現型でも多様性があることが明らかになった。本研究で樹立したリソースは今後様々なプロジェクトで活用することができる重要な研究リソースとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では100症例以上の孤発性パーキンソン病の検体を解析し、これまで実現不可能であったiPS細胞を用いた孤発性疾患の解析システムを構築した。今後はこれらの結果を指標として、個々の孤発性患者が細胞内のどの分子機構に異常を来しているかを明らかにし、新たな病態分類を確立し最適な治療法の開発の基礎となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have established more than 100 iPS cell lines from sporadic cases of Parkinson's disease patients at Juntendo University during the study period. The established sporadic patient-derived iPS cells were sequentially induced to differentiate into neurons, and multiple phenotypes were analyzed in each case, and the results were made into a database. Sporadic patients have a diversity of cellular phenotypes as well as clinical findings. The iPSCs and database established in this research have become important research resources that can be used in various projects in the future.

研究分野：神経発生学

キーワード：iPS細胞 パーキンソン病 疾患モデル 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

神経疾患に対する創薬・病態解明のツールとして iPS 細胞を用いた疾患モデルが有効であることが示されている。申請者はこれまで遺伝性パーキンソン病(Ohta et al. Hum Mol. Gen. 2015, Imaizumi et al. Mol. Brain 2012)、レット症候群 (Andoh-Noda et al. Mol. Brain 2015)、統合失調症 (Maekawa et al. Biol Psychiatry. 2015, Bundo et al. Neuron 2014)、アルツハイマー病 (Yagi et al Hum Mol. Gen. 2011) その他の神経疾患における iPS を用いた疾患モデルシステムの構築を行ってきた。しかしながら、申請者以外のグループも含むこれまでの疾患 iPS 細胞を用いた解析は単一遺伝子病を中心として解析が行われている。そのような患者検体からの疾患 iPS 細胞の報告では平均して約 3 症例の患者が解析されており、それぞれの報告において疾患に関連する表現型が結論づけられている。実際の患者検体からの iPS 細胞の作製と解析では極めて多くの作業が必要であり、単一の研究グループの研究としては、10 症例以上の症例を解析するのは実質的には不可能であった。しかしながら、パーキンソン病や ALS (筋萎縮性側索硬化症) を例にとると、その過半数 (~90%) が孤発性であり家族性の症例が占める比率は多いとは言えない。このような神経疾患の孤発性症例の解析においては、iPS 細胞で再現される Genetic, Epigenetic な変化の寄与率を考慮すると、実際の臨床研究で行われるような症例数 ($n > 100$) の解析を行う必要があるのではないかと考えられる。申請者はこの問題を解決すべく、患者検体からの iPS 細胞の樹立と神経分化誘導システムを小スケール・効率化してきた。このシステムでは、従来の 1/1000 程度の細胞数 (1000 個以下) の患者細胞を 96well 上で並列に処理し、28 日以内に神経分化を完了することが出来る。本提案では、申請者が既に開発したハイスループットな神経疾患 iPS 細胞の樹立・解析システムを用いて、100 症例以上の孤発性パーキンソン病の検体を解析し、これまで実現不可能であった iPS 細胞を用いた孤発性疾患の解析システムを構築することを目標とする。申請者がこれまで樹立・解析してきた遺伝性パーキンソン病 iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞での分子機構特異的な表現型を指標として、個々の孤発性患者が細胞内のどの分子機構に異常を来しているかを明らかにし、新たな孤発性パーキンソン病の病態分類を確立し、最適な治療法の開発の基礎とする。

2. 研究の目的

神経疾患に対する創薬・病態解明のツールとして iPS 細胞を用いた疾患モデルが有効であることが近年示されている。これまでの疾患 iPS 細胞を用いた解析は単一遺伝子病を中心として解析が行われているが、これは iPS 細胞樹立と解析に多大な労力を要するからであった。申請者はこの問題を解決すべく、患者検体からの iPS 細胞の樹立と神経分化誘導システムを小スケール・効率化してきた。本提案では 100 症例以上の孤発性パーキンソン病の検体を解析し、これまで実現不可能であった iPS 細胞を用いた孤発性疾患の解析システムを構築する。遺伝性パーキンソン病 iPS 細胞での分子機構特異的な表現型を指標として、個々の孤発性患者が細胞内のどの分子機構に異常を来しているかを明らかにし、新たな病態分類を確立し最適な治療法の開発の基礎とする。

3. 研究の方法

(1) 孤発性患者からの iPS 細胞の樹立と神経分化誘導・表現型解析

孤発性患者検体はすでに順天堂大学に蓄積されつつあるので、項目(2)-(4)の解析方法が最適化され次第、100 症例単位で順次解析を開始する。具体的には 96-well 上にそれぞれの患者の 10^4 個の末梢血単核球をプレートし、センダイウイルスベクターを用いてリプログラミングする。96well 上でそのまま Purmorphamine, FGF-8 その他の小分子化合物を用いてドーパミンニューロンへの神経分化誘導を効率よく行う。In Cell Analyzer を用いて神経突起進展、細胞死 (Cleaved Caspase3 の検出) など一般的な脆弱性の表現型を検出する。これらはすでに PARK2, PARK6-iPS 細胞では小スケールで定量的に表現型が検出されることを確認している。さらに以降に述べるそれぞれの遺伝性パーキンソン病特異的な表現型検出モジュールを開発し、それぞれの症例でどの表現型が検出されたかという情報を症例ごとに蓄積していく。

(2) PARK1,4-iPS 細胞を用いた シヌクレイン蓄積を定量化する解析方法の開発

申請者らはすでに PARK2 患者由来 iPS 細胞のうち、パーキンソン病特有の症状である シヌクレイン蓄積を示す患者を同定しその蓄積を示している (Imaizumi et al. 2012)。しかしながら PARK2 は本来 シヌクレインが蓄積しないタイプのパーキンソン病であるため、非典型例である。申請者らはさらに シヌクレインの遺伝子構造自体に異常がある PARK1, PARK4 の iPS 細胞を樹立中である。これらの シヌクレインが蓄積する細胞を用いて、96well 上で分化させたニューロンを抗 シヌクレイン抗体で免疫染色し、In Cell Analyzer を用いて定量化する手法を確立する。

(3) PARK2,6-iPS 細胞を用いたミトコンドリア機能異常を定量化する解析方法の開発

申請者らはすでに PARK2 患者由来 iPS 細胞を用いて、ミトコンドリア ComplexIII coreI シグナルの減少を指標に、原因遺伝子である Parkin/Pink1 の機能不全によるマイトファジー異常を検

出することに成功している。マイトファジー異常を示す細胞においては、CCCP など細胞へのストレス負荷で損傷されるミトコンドリアを正常に除去できないため、正常では消失するはずの Complex III core1 シグナルが残存する。この手法を 96-well ベースの小スケールで In Cell Analyzer を用いて蛍光強度からマイトファジー異常を定量するシステムを確立する。

(4) PARK9-iPS 細胞を用いたリソソーム異常を定量化する解析方法の開発

申請者らはすでに PARK9 の iPS 細胞を樹立しており、予想されるマイトファジー時のリソソーム機能異常の表現型をリソソーム特異的な細胞内 pH 指示薬 (LysoSensor Yellow/Blue DND-160 など) によって検出する方法を開発中である。PARK9 細胞ではリソソーム機能の異常から pH が酸性にならない表現型が示されると考えられる。これをさらに小スケール解析系に適合させ、In Cell Analyzer を用いて定量化する手法を確立する。

(5) 孤発性患者由来ニューロンにおける表現型の検出とデータベース化

(1) に記載した小スケール樹立・分化誘導法を用いて孤発性患者検体を 1 回の検討で 100 症例程度ずつ、一般的な脆弱性の表現型に加えて上記遺伝性パーキンソン病に特異的な表現型の有無を検出する。孤発性のパーキンソン病は、臨床症状・経過的には一様では無く、ドーパミンニューロンの脆弱性を結果としてもたらず様々な分子機構に異常を来していると考えられる。すでに遺伝性パーキンソン病で知られている、それぞれの孤発性患者検体におけるドーパミンニューロンの脆弱性と関連ある分子の障害が示す表現型の有無を、遺伝性パーキンソン病の細胞をポジティブコントロールとして比較し、その情報を記載し蓄積していく。

4. 研究成果

(1) 孤発性患者からの iPS 細胞の樹立と神経分化誘導・表現型解析

順天堂大学に蓄積された遺伝性症例パーキンソン病患者検体を用いて細胞死・マイトファジー異常・シヌクレイン異常蓄積・ROS 異常産生・リソソーム異常を In Cell Analyzer を用いて検出するシステムを確立した。平行して蓄積された孤発性症例パーキンソン病患者検体から iPS 細胞の樹立を進め、研究期間中に 100 症例以上の iPS 細胞株を樹立した。当初の計画では 96well ベースで樹立を進める計画であったが、24well で樹立した方が樹立成功率が高く、結果的にスループットが向上するため 24well での樹立を行った。iPS 細胞株としてストックし孤発性症例パーキンソン病患者 iPS 細胞ライブラリーを作製した。

(2) PARK1,4-iPS 細胞を用いた シヌクレイン蓄積を定量化する解析方法の開発

PARK4-iPS 細胞を樹立した。その他の シヌクレイン異常蓄積を示すタイプの iPS 細胞も用いて シヌクレイン異常蓄積を In Cell Analyzer を用いて定量化する手法を確立したが、症例によっては シヌクレイン異常蓄積の表現型を検出するまでに 5 週間以上の培養が必要で、それを克服するためにより短期間で シヌクレイン異常蓄積を検出する手法を確立した。

(3) PARK2,6-iPS 細胞を用いたミトコンドリア機能異常を定量化する解析方法の開発

96-well ベースの小スケールで In Cell Analyzer を用いて蛍光強度からマイトファジー異常を安定的に定量するシステムを確立し、PARK2,6 では薬剤スクリーニングを行う体制が整備された。特定の薬剤の評価に関しても安定的に行えており、その結果は Ren et al. PNAS 2018 に発表した。

(4) PARK9-iPS 細胞を用いたリソソーム異常を定量化する解析方法の開発

リソソーム異常の定量を小スケール化することが困難で、別の方法を用いてリソソーム異常を小スケール解析系に適合させ、In Cell Analyzer を用いて定量化する手法を確立した。PARK9 においても薬剤スクリーニングを行う体制が整備された。

(5) 孤発性患者由来ニューロンにおける表現型の検出とデータベース化

樹立した孤発性患者由来 iPS 細胞を順次ニューロンに分化誘導し、複数の種類の表現型をそれぞれの症例で解析しその結果をデータベース化した。孤発性患者は症例によって示す表現型が様々であり、臨床所見同様に細胞の表現型でも多様性があることが明らかになった。一方でそれぞれの表現型が連動して動くために単一の表現型の特異度が低いことが明らかになった。従って、孤発性症例を正確に分類するための指標に関しては、引き続き解析を継続することが必要であると考えられた。しかしながら、本研究で樹立したリソースは今後様々なプロジェクトで活用することができる重要な研究リソースとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

①Ren Q, Ma M, Yang J, Nonaka R, Yamaguchi A, Ishikawa KI, Kobayashi K, Murayama S, Hwang SH, Saiki S, **Akamatsu W**, Hattori N, Hammock BD, Hashimoto K. Soluble epoxide hydrolase plays a key role in the pathogenesis of Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Jun 19;115(25):E5815-E5823.

②Fujimori K, Matsumoto T, Kisa F, Hattori N, Okano H, **Akamatsu W**. Escape from Pluripotency via Inhibition of TGF- β /BMP and Activation of Wnt Signaling Accelerates Differentiation and Aging in hPSC Progeny Cells. Stem Cell Reports. 2017 Nov 14;9(5):1675-1691.

③Shiba-Fukushima K, Ishikawa KI, Inoshita T, Izawa N, Takanashi M, Sato S, Onodera O, **Akamatsu W**, Okano H, Imai Y, Hattori N. Evidence that phosphorylated ubiquitin signaling is involved in the etiology of Parkinson's disease. Hum Mol Genet. 2017 Aug 15;26(16):3172-3185.

〔学会発表〕(計 9 件)

赤松和土「iPS 細胞技術を用いた神経疾患解析と治療法開発」第 58 回日本小児神経学会 シンポジウム 2016.6.4

赤松和土「疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経疾患モデル解析の改良」第 16 回再生医療学会 シンポジウム 2017.3.9

赤松和土「iPS 細胞技術を用いた神経疾患解析」第 28 回日本サイトメトリー学会学術集会 シンポジウム (招待講演、座長) 2018.5.26

6 . 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者：なし

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。