

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19524

研究課題名(和文) 遺伝性パーキンソン病由来iPS細胞を用いたドパミン神経特異的疾患モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of dopamine neuron specific disease model using iPS cells derived from hereditary Parkinson's diseases

研究代表者

石川 景一 (ISHIKAWA, KEI-ICHI)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：90733973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：複数の遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞をドパミン神経に分化させドパミン神経機能異常を見いだすことで、ドパミン神経特異的疾患モデルを確立し、病態解明と治療法開発に繋げることを目的に研究を行った。主な成果として、高純度なiPS細胞由来ドパミン神経誘導方法の確立。PARK2細胞由来ドパミン神経のミトコンドリア異常の高感度検出方法を確立。PARK2/4/6/8/9を用いてそれぞれオートファジー異常、アルファシヌクレイン蓄積、細胞脆弱性の検出方法の確立。PARK2/6-ドパミン神経特異的なリン酸化ユビキチン化シグナル異常検出。これらの結果は適宜学会で発表し、一部は国際誌に報告した。

研究成果の概要(英文)：We conducted this research aimed at establishing dopamine neuron specific disease models by discovering dysfunctions of dopaminergic neurons using iPS cells derived from hereditary Parkinson's disease patients, leading to clarification of the pathology and development of therapeutic methods. It was. As main results, (1) established a highly pure iPS cell-derived dopamine nerve induction method. (2) Autophagic abnormality, alpha synuclein accumulation, and cell vulnerability were detected in PARK2/4/6/8/9-neurons. (3) We established a more sensitive mitochondrial anomaly detection method in dopaminergic neurons derived from PARK2 cells. (4) PARK2/6-dopamine neuron-specific phosphorylated ubiquitination signal abnormality was detected. These results were announced at conferences as appropriate, and some were reported to international journals.

研究分野：神経学

キーワード：パーキンソン病 iPS細胞 ドーパミン神経 オートファジー マイトファジー

### 1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病は中脳黒質ドーパミン神経細胞のアルファシヌクレイン蓄積と進行性脱落により運動症状を呈する神経変性疾患である。パーキンソン病発症機序は主に遺伝性パーキンソン病の原因遺伝子産物の機能解析により解明が進み、培養細胞モデルやモデル動物の検討から黒質神経細胞の小胞体ストレス、転写異常、ミトコンドリア機能異常、小胞体ストレス、蛋白分解機構異常などが報告されている。さらに2009年の最初のパーキンソン病患者由来iPS細胞は孤発性だったが、その後遺伝性パーキンソン病由来iPS細胞からヒト神経細胞を用いた病態解明がなされている。PARK4-iPS細胞由来ドーパミン神経における酸化ストレス増加とアルファシヌクレイン増加、PARK6-iPS細胞由来ドーパミン神経におけるミトコンドリアオートファジー（以下マイトファジー）異常とミトコンドリア機能低下、PARK8-iPS細胞由来ドーパミン神経における神経突起の減少、オートファジー障害、アルファシヌクレイン蓄積などの報告がある。しかしながら、理論上はヒトドーパミン神経細胞での病態解明ができるというものの、iPS細胞の樹立や分化及び解析には多大な作業が必要で、論文によって誘導法も異なるため論文間での比較も困難で、ドーパミン神経誘導効率も低いいためドーパミン神経でない神経細胞での報告も多く、ヒトドーパミン神経を使用できつつある状況でも、なぜドーパミン神経のみが障害され何がパーキンソン病発症の根本原因なのか未解明であり、パーキンソン病の治療法は現在も不足したドーパミン補充による対症療法に留まっている。真のパーキンソン病病因解明と治療法開発には優れた疾患モデル確立が求められる。

### 2. 研究の目的

本研究計画では複数の遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞を用い、独自に改良した方法により純度の高いドーパミン神経細胞および運動神経細胞を分化誘導し、種々のストレスを負荷することでドーパミン神経機能異常に基づいたヒトドーパミン神経疾患モデルを確立し、さらにドーパミン神経以外の神経と比較することでパーキンソン病病態のドーパミン神経特異性の原因にも迫ることを目的とする。確立したヒトドーパミン神経疾患モデルは、神経機能異常に基づいた治療薬開発や、バイオマーカー探索、あるいはドーパミン神経特異性をターゲットにした新たな治療薬開発などに寄与できる可能性があると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 高純度なiPS細胞由来ドーパミン神経誘導方法の確立。

高純度なドーパミン神経を得るため、神経幹細胞の表面抗原によりセルソーターで抽

出する方法を用いて、ドーパミン神経誘導効率を上げることを検討した。

(2) PARK2-iPS細胞由来ドーパミン神経における高感度な神経異常検出方法の確立。

(1)で確立した誘導法を用いることで、ミトコンドリア異常が知られているPARK2-iPS細胞由来神経におけるドーパミン神経特異的な異常について、免疫染色および、マイトファジー検出のためKeimaを導入することで検討を行った。

(3) PARK2/4/6/8/9-iPS細胞由来ドーパミン神経における神経機能異常の検討。

PARK2/4/6/8/9-iPS細胞をドーパミン神経に誘導し、ドーパミン神経における神経異常を、主に免疫染色法を用いて検討した。

(4) PARK2/6-iPS細胞由来ドーパミン神経特異的なマイトファジー異常の検討。

PARK2およびPARK6はマイトファジー異常を来することが知られている。iPS細胞からドーパミン神経を誘導し、ドーパミン神経以外の神経細胞と比較しながらマイトファジー異常経路を検討することにより、ドーパミン神経特異的な異常を検出できるか、またマイトファジーのどの部分に異常を呈するのかを検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 高純度なiPS細胞由来ドーパミン神経誘導方法の確立。

高純度なドーパミン神経細胞を得るため、細胞表面マーカーに着目し、過去の方角等から神経誘導マーカーを何種類か検討を行った。その中で、CD184を高発現し、CD44を発現しない神経幹細胞を、セルソーターで抽出することにより、ドーパミン神経細胞誘導効率が上昇することを見いだした。

(2) PARK2-iPS細胞由来ドーパミン神経における高感度な神経異常検出方法の確立。

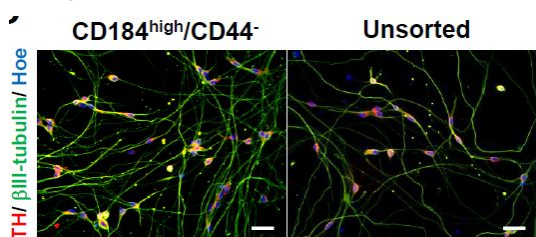
(1)で確立した誘導法を用いて、ドーパミン神経誘導後の神経異常について検討を行い、さらに以前の誘導法（セルソーターを行わずドーパミン神経誘導効率が低い方法）との比較を行った。

PARK2ではミトコンドリア異常を来することが知られているため、酸化ストレスを示す蛍光試薬CellROXによる検討を行った。ドーパミン誘導効率が高い方が、以前の方法と比べより明確に酸化ストレス状態を示すことが明らかになった。さらに細胞死をしめすcleaved caspase-3を用いた免疫染色においても、ドーパミン神経細胞誘導効率が高い方が誘導効率が低い場合に比べて、薬剤による酸化ストレス誘導による細胞脆弱性がより顕著に現れることが確認できた。

さらに、マイトファジー異常を詳細に検討するため、ミトコンドリア移行シグナルをつ

けた蛍光標識 Keima を、レンチウイルスを用いて誘導後のドーパミン神経に導入した。本蛍光標識によって、ミトファジーでリソソームに取り込まれたミトコンドリアは酸性条件となるため蛍光反応が変わるため、ミトファジー過程におけるリソソームによる分解をより明確に評価することができる。脱共役剤 CCCP 処理によるミトファジー異常を、細胞表面マーカーでドーパミン神経誘導効率を上げた場合と、それを行わなかった場合で比較検討を行った。やはりドーパミン神経誘導効率が高い神経の方が、低い神経に比べて鋭敏かつ明確に障害ミトコンドリアのリソソームによる分解が行われていることを検出することができた。

これらの結果は、少なくとも遺伝性パーキンソン病の原因の一つである PARK2 においては、ドーパミン神経においてより顕著にミトファジー異常、酸化ストレス誘導、酸化ストレス脆弱性を示すことを確認することができた。本研究成果は国際誌に報告した (Suzuki et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017)。



(3) PARK2/4/6/8/9-iPS 細胞由来ドーパミン神経における神経機能異常の検討。

申請者らのグループは PARK2-iPS 細胞由来の神経細胞において、ミトファジー異常を示すことを報告している (Imaizumi et al. *Mol Brain* 2012, Ishikawa et al. *Methods in Molecular Biology*, 2017)。しかしながら本報告はドーパミン神経での検討は行っており、また 1 つ 1 つの神経免疫染色画像を手動で計測し評価するため、非常に手間と時間がかかるものであった。

より簡便に多くの検体を繰り返し検討するために、96 well plate を用いて免疫染色法により見られた異常を、イメージングアナライザー (In Cell Analyzer 2200) を用いて半自動的に画像撮影・解析を行う方法を開発しつつ、ドーパミン神経におけるミトファジー異常検出を試みた。さらにミトファジー異常の他にパーキンソン病の病態として報告されているアポトーシスの亢進、オートファジー異常、リソソーム異常、酸化ストレス亢進、病因たんぱく質アルファシヌクレインの蓄積、等についても、PARK2 のみでなく PARK4, PARK6, PARK8, PARK9 といった複数種類の以前整パーキンソン病患者由来 iPS 細胞から誘導したドーパミン神経において検討し、同様の手法で検出する方法の確立を行った。

まず、アルファシヌクレイン遺伝子の重複変異である PARK4 については、iPS 細胞の樹立を行った。患者から文書による同意を得て取得した血液細胞から、血球を分離し T 細胞を培養。培養した T 細胞にレンチウイルスを用いて山中 4 因子を導入 (Cyto-tune 2.0) し、CiRA のプロトコルに準じて iPS 細胞の樹立を行った。樹立できた iPS 細胞コロニーをピックアップして拡大培養し、未分化マーカー発現、染色体検査、神経細胞誘導能などでセクションを行い、病態解析に用いる iPS 細胞ラインを決定した。

正常対照の iPS 細胞とともに、遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞をドーパミン神経に誘導し、96 well plate に播種し、解析毎に必要な試薬で処理した後に固定し、免疫染色、イメージングアナライザーでの解析を行い、条件検討の結果、半自動的な解析が可能になった。

本方法を用いて、アポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 による免疫染色では、正常対照に比べて全ての遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞から誘導したドーパミン神経において、アポトーシスが亢進していることが確認できた。

さらにミトコンドリア内膜マーカーである complex III core1 の免疫染色により、脱共役剤 CCCP 負荷時のミトファジー異常を PARK2 および PARK6-iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞で確認した。

また、オートファゴソームマーカーである LC3 の免疫染色により、PARK8 および PARK9 患者由来 iPS 細胞から誘導したドーパミン神経におけるオートファゴソームの蓄積を検出し、オートファジーに何らかの異常を来していることが示唆された。さらにリソソームの pH 指標試薬である Lysosensor を用いた検討から、PARK9-iPS 細胞由来ドーパミン神経ではリソソームの pH が上昇していることを見いだした。これらの結果から PARK9-iPS 細胞由来ドーパミン神経においては、リソソームの異常によりオートファゴソームが蓄積していることが予想された。

さらに、PARK4 および PARK8 患者由来 iPS 細胞から誘導したドーパミン神経においては、アルファシヌクレインが蓄積していることも確認することができた。

これらの結果は、これまでの培養細胞モデルや動物モデルなどから報告されている異常と合致し、各異常表現型が実際のヒト患者ドーパミン神経細胞でも再現されることが確認できたことに意義がある。更なる研究を行うことによって、これらの異常表現型を来す原因解明および薬剤スクリーニング等による新たな治療薬開発に繋がることが期待できる。

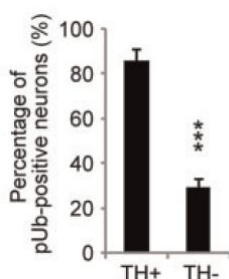
(4) PARK2/6-iPS 細胞由来ドーパミン神経特異的なミトファジー異常の検討。

傷害されたミトコンドリアのミトファ

ジーによる除去には、PARK2 原因遺伝子産物である parkin が損傷ミトコンドリアにユビキチンを付加し、さらに PARK6 原因遺伝子産物である PINK1 がユビキチン鎖をリン酸化することが必要である。

順天堂大学の柴らは、ショウジョウバエによる PARK2 および PARK6 モデル、および PARK2 および PARK6 患者剖検脳による検討から、同疾患患者の神経においては、ミトコンドリアにおけるユビキチンのリン酸化状態が変化していることを確認した。ヒト神経細胞、特にドーパミン神経において同様のことが確認できれば、パーキンソン病の病態解明に繋がることが予想され、iPS 細胞を用いた検討を行った。

正常対照の iPS 細胞と、PARK2 および PARK6 患者由来 iPS 細胞をドーパミン神経に分化させ、免疫染色を行うことでドーパミン神経細胞内のミトコンドリアにおけるリン酸化ユビキチンの状態と、マイトファジーを評価した。この結果、PARK2 患者由来 iPS 細胞から分化した神経細胞におけるリン酸化ユビキチンシグナルが増強していることを発見した。さらにミトコンドリアを傷害する valinomycin で処理したところ、パーキンソン病ではミトコンドリアが十分に除去されず、マイトファジー障害を来していることを見いだした。さらに重要なことに、これらリン酸化ユビキチンの増加とマイトファジー異常は他の神経細胞に比べ、ドーパミン神経においてのみ増強されていることを確認した。



これらの結果は、ミトコンドリアの維持に重要な parkin あるいは PINK1 が障害されているパーキンソン病患者のドーパミン神経細胞においては、常に parkin および PINK1 が異常に活性化していること、ドーパミン神経において特に活性化およびマイトファジー異常が起こることで、パーキンソン病が発症する原因となっている可能性を示すことができた。

本研究において、以上(1)~(4)の結果を得ることで、iPS 細胞を用いたパーキンソン病研究を行う上でのドーパミン神経に特化した異常を検出することの重要性と有用性を示すことができた。その為の高純度なドーパミン神経細胞誘導方法の確立、ドーパミン神経を使って解析することによる高感度な神経異常の検出法および、ドーパミン神経

を用いた多検体の半自動ハイスループットな異常検出方法を確立することができた。さらにドーパミン神経特異的なマイトファジー異常をその機序を含めて証明することができた。本研究成果として得られた遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を用いたドーパミン神経病態モデルは、今後のパーキンソン病を含めた神経疾患研究および治療薬開発にも貢献できるものと考えられる。

#### 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. Shiba-Fukushima K, Ishikawa K, 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.* 26:3172-3185 (2017). doi: 10.1093/hmg/ddx201
2. Suzuki S, Akamatsu W, Kisa F, Sone T, Ishikawa K, Kuzumaki N, Katayama H, Miyawaki A, Hattori N, Okano H. Efficient induction of dopaminergic neuron differentiation from induced pluripotent stem cells reveals impaired mitophagy in PARK2 neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 483:88-93 (2017). doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.188.

[学会発表](計 10 件)

1. Kei-ichi Ishikawa, Akihiro Yamaguchi, Koki Fujimori, Keiko Sakai, Hideyuki Okano, Nobutaka Hattori, Wado Akamatsu. A high throughput assay system to detect mitophagy in iPSC-derived neurons from Parkinson's disease. 第 57 回日本神経学会学術大会. 2016 年 05 月 神戸コンベンションセンター
  2. Kei-ichi Ishikawa, Akihiro Yamaguchi, Koki Fujimori, Hideyuki Okano, Nobutaka Hattori, Wado Akamatsu. A high-throughput disease-specific phenotype detection system of Parkinson's disease for drug screening. XXIII World Congress of Neurology. 2017 年 9 月 京都国際会館
- 他 8 件

[図書](計 1 件)

1. Ishikawa K, Yamaguchi A, Okano H, Akamatsu W. Assessment of Mitophagy in iPS Cell-Derived Neurons. *Methods in Molecular Biology.* Berlin: Springer-Verlag (2017). doi:

10.1007/7651\_2017\_10.

〔その他〕

順天堂大学 プレスリリース

<https://www.juntendo.ac.jp/news/20170602-01.html>

6. 研究組織

研究代表者 石川 景一 (Ishikawa, Kei-ichi)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：90733973