

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15463

研究課題名(和文) 老化によるパーキンソン病iPS細胞由来ドパミン神経異常発現機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of Parkinson's disease iPS cell-derived dopaminergic neurons due to aging

研究代表者

石川 景一 (Ishikawa, Kei-ichi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90733973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性パーキンソン病(PD)患者由来iPS細胞(PARK2/4/6/9/22)をドパミン神経細胞に分化誘導して解析し、神経細胞脆弱性、ミトコンドリア異常、オートファジー異常、シヌクレイン蓄積などを再現し、PD病態機序を提示した。PARK2/6-iPS細胞由来ドパミン神経細胞の化合物スクリーニングにより4種類の候補化合物を同定した。さらに孤発性PD-iPS細胞由来ドパミン神経細胞でも一部遺伝性と共通の病態と薬剤反応性を示すことを報告した。老化促進化合物の神経老化促進機序を解析し、PARK4-iPS細胞由来神経で再現困難だったシヌクレイン蓄積を短期間培養で再現し老化とPD病態の関連を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞を用いて、患者神経における老化を含めた複数の病態機序を示すことができた。薬剤スクリーニングシステムを確立したこと、本システムにより治療候補化合物を見だし、さらに孤発性パーキンソン病患者由来細胞でも一部は遺伝性と共通の異常を呈すること、さらに遺伝性パーキンソン病のスクリーニングから得られた治療候補化合物に同様の効果があることを示したことは、今後の新たな治療薬開発に繋がる成果である。

研究成果の概要(英文)：The dopaminergic neurons differentiated from iPS cells derived from hereditary Parkinson's disease (PD) patients (PARK2/4/6/9/22) were represented the pathological mechanism of PD such as their vulnerability, mitochondrial abnormality, abnormality of autophagy, -synuclein accumulation. Four kinds of candidate compounds were identified by compound screening in PARK2/6-iPS cell-derived dopamine neurons. Furthermore, we reported that some dopaminergic neurons derived from sporadic PD-iPS cells also showed some common pathomechanisms and drug responsiveness with hereditary PD-iPS cells. We also analyzed the mechanism of senescence-promoting compounds in neuronal senescence, and reproduced the accumulation of -synuclein in PARK4-iPS cell-derived neurons, which was difficult to reproduce in a short-term culture. This result indicates the relationship between senescence and PD pathology.

研究分野：神経学

キーワード：パーキンソン病 iPS細胞 薬剤スクリーニング 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は有病率 150 人/10 万人の我が国で 2 番目に多い神経変性疾患である。加齢により発症率が増加するが、有効な治療は対症療法に留まり、高齢化が進む我が国では患者数の増加と医療費・介護負担の増加が危惧されている。PD は中脳黒質ドパミン神経細胞の α シヌクレイン蓄積と進行性脱落により運動症状を呈し、その発症機序は主に遺伝性 PD の原因遺伝子産物の機能解析による解明が進み、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 年から主に遺伝性 PD 由来 iPS 細胞から分化させたヒト神経細胞による病態解明の報告がなされている。申請者の所属教室も PARK2-iPS 細胞由来神経細胞の酸化ストレス増加とマイトファジー異常による異常ミトコンドリアの蓄積 (Mol Brain 2012)、PARK8-iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の酸化ストレス脆弱性などを報告し (Hum Mol Genet 2015)、申請者自身も PARK2/6-iPS 細胞を用いたドパミン神経特異的なリン酸化ユビキチンシグナルの異常 (Hum Mol Genet 2017) や、iPS 細胞からの高効率ドパミン神経誘導法による詳細な PARK2-ドパミン神経のマイトファジー異常検出手法 (Biochem Biophys Res Commun 2017) を報告している。

一方で iPS 細胞由来の細胞は生体由来の体細胞と比べ分化成熟が遅いことが知られている。iPS 細胞を用いた神経変性疾患の研究報告は多いが、PD など高齢発症の神経変性疾患モデルでは表現型検出に 40 日~200 日と長期間培養を要していることが多い。申請者も複数の遺伝性 PD-iPS 細胞 (PARK2/4/6/9/22) をドパミン神経誘導し検討を行うなかで、短期間 (約 15 日) の培養で異常を呈する表現型もあれば、患者病理や疾患モデル細胞などの検討でよく知られていながらも短期間培養では再現できない、あるいは可能な限りの長期培養でも再現できない異常表現型もあり、老化を促進し培養期間を短縮できる手法の必要性を実感してきた。そこで申請者らは、低分子化合物で簡便に神経細胞老化を調節できれば、遅発性疾患研究が飛躍的に進むと考えた。そこで iPS 細胞由来神経細胞を老化促進させる化合物を見い出すべく薬剤スクリーニングを行い、老化促進作用の可能性のある化合物を発見した。本化合物を遺伝性 PD 由来 iPS 細胞に用いることで、PD における老化の影響を解明できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

(1) 遺伝性および孤発性 PD 由来 iPS 細胞から誘導したドパミン神経における異常を解明するとともに、薬剤スクリーニングによりその異常を改善する治療候補薬を同定すること。

(2) 発見した細胞老化促進化合物による神経細胞への効果発現機序を同定し、さらに PD-iPS 細胞への影響を検討することで、PD 病態に細胞老化が寄与するメカニズムを解明すること。

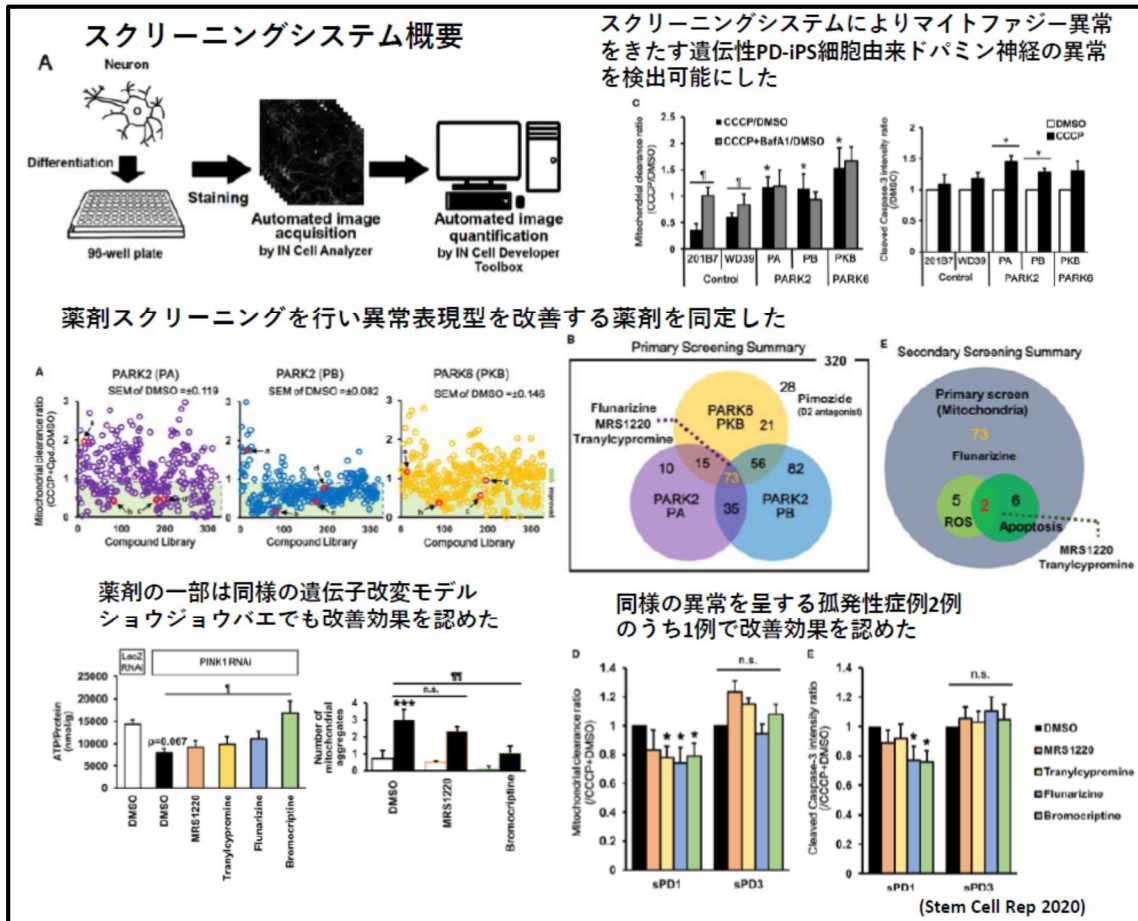
3. 研究の方法

(1) 遺伝性 PD である PARK2/4/6/9/22 神経由来 iPS 細胞をドパミン神経に分化誘導し、ドパミン神経異常を解明する。さらに薬剤スクリーニングを行い治療候補薬の同定を行う。

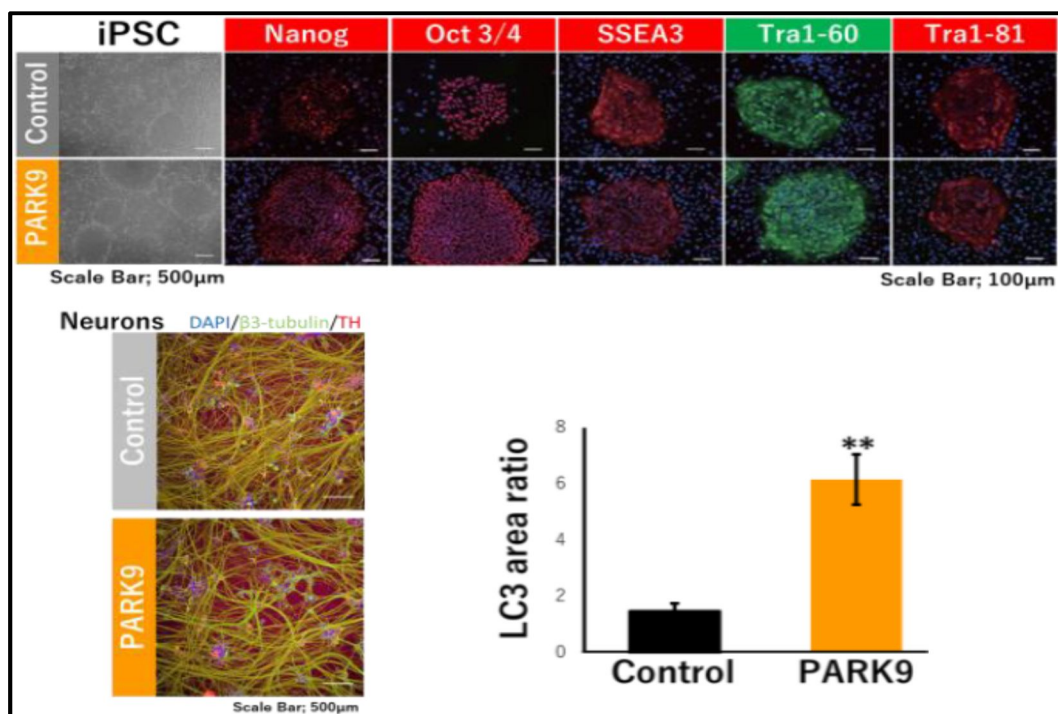
(2) 老化促進化合物を iPS 細胞由来ドパミン神経に処理し、老化発現機序の解明と遺伝性 PD-iPS 細胞への効果を評価する。

4. 研究成果

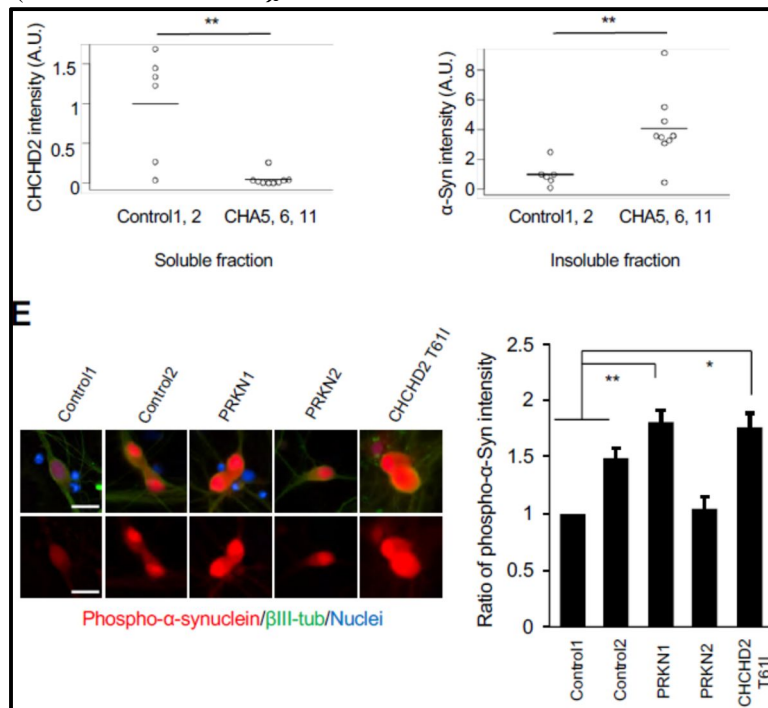
(1) 遺伝性 PD である PARK2/6-iPS 細胞由来ドパミン神経はミトコンドリア除去異常を呈する。これに加えてこれらの遺伝子変異を有する iPS 細胞由来ドパミンにおいては活性酸素種蓄積、細胞死増加呈することを見いだすことができた。さらにこれらのドパミン神経細胞異常を検出できる小スケールスクリーニングシステムを確立した。本スクリーニングシステムを用いて、既存薬を含む化合物ライブラリーで薬剤スクリーニングを行うことにより、これらの異常を改善させる 4 種類の化合物 (MRS1220, Tranylcypromine, Flunarizine, Bromocriptine) を同定することに成功した。これらの化合物のは PARK6 遺伝子をノックダウンしたショウジョウバエモデルに投与することで運動機能とミトコンドリア機能の改善傾向を示し、中でも Bromocriptine は統計学的に有意な改善を認めた。さらに 4 人の孤発性 PD 患者さんから新たに iPS 細胞を樹立し、ドパミン神経に分化させて同様の解析を行うことにより、4 人中二人の孤発性 PD-iPS 細胞由来ドパミン神経で同様のミトコンドリア除去異常と細胞脆弱性を示すことを見いだした。そのうち 1 人の孤発性 PD-iPS 由来ドパミン神経においては、PARK2/6-iPS 細胞由来ドパミン神経を用いた薬剤スクリーニングで同定した化合物の有効性を示すことができた。これらの結果は遺伝性 PS-iPS 細胞を用いた薬剤スクリーニングシステムを確立したのみならず、孤発性 PD においても一定の割合で遺伝性 PD と共通の病態機序を有している可能性があること、さらにその一部には遺伝性 PD を用いた薬剤スクリーニングで得られた知見からの創出された治療薬が効果を示す可能性があることを示すことができた。これらの成果は学会発表するとともに国際誌に発表した (Stem Cell Rep 2020)。



(2) 遺伝性PDである PARK9(*ATP13A2* 遺伝子変異)はリソソーム異常を来することが知られている。PARK9 患者血液サンプルから樹立した iPS 細胞をドーパミン神経細胞に分化誘導し、PARK9-iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞においてもリソソームの pH 異常があることを見いだした。さらにリソソーム異常に起因すると考えられるオートファジー異常を呈することも発見することができた。これらの結果は国際幹細胞学会(ISSCR2019)で発表し Merit Award を受賞した。



(3) 遺伝性 PD である PARK22 患者から iPS 細胞を樹立してドパミン神経細胞に誘導し、ドパミン神経内に不溶性の シヌクレインおよびリン酸化 シヌクレインが蓄積していることを見いだした。これらの結果は PARK22 変異患者の剖検脳で シヌクレインの蓄積を認めたことと合致する結果であり、さらにショウジョウバエモデルの検討から PARK22 の原因遺伝子 *CHCHD2* の変異により シヌクレインの蓄積が促進されることを示すことができた。これらの結果は国際誌に発表した(Hum Mol Genet 2019)。



(4) 独自に見いだした老化促進化合物を iPS 細胞由来神経および一般培養細胞に処理し、ATM 阻害による老化促進を来すシグナル機序を概ね解明することができた。また遺伝性 PD の 1 つである PARK4 は シヌクレインタンパク質が過剰になり PD 病態を来することが知られているが、PARK4-iPS 細胞をドパミン神経誘導を行い長期に培養しても細胞内に シヌクレインが蓄積することを確認することは困難であった。しかし本老化促進化合物で処理することにより、神経誘導後約 7 日で シヌクレイン蓄積を再現することが可能となった。この結果は シヌクレイン蓄積には我々が同定した老化促進シグナルも関与することを示しており、PD 発症病態機序と老化シグナルとの関係を明らかにすることができた。現在更なる詳細な解析を加えて国際誌に発表すべく論文準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ren Qian, Ma Min, Yang Jun, Nonaka Risa, Yamaguchi Akihiro, Ishikawa Kei-ichi, Kobayashi Kenta, Murayama Shigeo, Hwang Sung Hee, Saiki Shinji, Akamatsu Wado, Hattori Nobutaka, Hammock Bruce D., Hashimoto Kenji	4. 巻 115
2. 論文標題 Soluble epoxide hydrolase plays a key role in the pathogenesis of Parkinson's disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E5815 ~ E5823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1802179115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ueno Shin-Ichi, Saiki Shinji, Fujimaki Motoki, Takeshige-Amano Haruka, Hatano Taku, Oyama Genko, Ishikawa Kei-Ichi, Yamaguchi Akihiro, Nojiri Shuko, Akamatsu Wado, Hattori Nobutaka	4. 巻 8
2. 論文標題 Zonisamide Administration Improves Fatty Acid β -Oxidation in Parkinson's Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 14 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8010014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ishikawa Kei-ichi, Saiki Shinji, Furuya Norihiko, Imamichi Yoko, Tsuboi Yoshio, Hattori Nobutaka	4. 巻 690
2. 論文標題 p150glued deficiency impairs effective fusion between autophagosomes and lysosomes due to their redistribution to the cell periphery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 181 ~ 187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.10.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ikeda Aya, Nishioka Kenya, Meng Hongrui, Takanashi Masashi, Hasegawa Iwao, Inoshita Tsuyoshi, Shiba-Fukushima Kahori, Li Yuanzhe, Yoshino Hiroyo, Mori Akio, Okuzumi Ayami, Yamaguchi Akihiro, Nonaka Risa, Izawa Nana, Ishikawa Kei-ichi, et al.	4. 巻 28
2. 論文標題 Mutations in CHCHD2 cause α -synuclein aggregation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3895 ~ 3911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddz241	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Akihiro, Ishikawa Kei-ichi, Inoshita Tsuyoshi, Shiba-Fukushima Kahori, Saiki Shinji, Hatano Taku, Mori Akio, Oji Yutaka, Okuzumi Ayami, Li Yuanzhe, Funayama Manabu, Imai Yuzuru, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado	4. 巻 -
2. 論文標題 Identifying Therapeutic Agents for Amelioration of Mitochondrial Clearance Disorder in Neurons of Familial Parkinson Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.04.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirano Kazuoki, Fujimaki Motoki, Sasazawa Yukiko, Yamaguchi Akihiro, Ishikawa Kei-ichi, Miyamoto Kengo, Souma Sanae, Furuya Norihiko, Imamichi Yoko, Yamada Daisuke, Saya Hideyuki, Akamatsu Wado, Saiki Shinji, Hattori Nobutaka	4. 巻 518
2. 論文標題 Neuroprotective effects of memantine via enhancement of autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 161 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oji Yutaka, Hatano Taku, Ueno Shin-ichi, Funayama Manabu, Ishikawa Kei-ichi, et al.	4. 巻 143
2. 論文標題 Variants in saposin D domain of prosaposin gene linked to Parkinson's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1190 ~ 1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/brain/awaa064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kataura Tetsushi, Shinji Saiki, Ishikawa Kei ichi, Akamatsu Wado, Sasazawa Yukiko, Hattori Nobutaka, Imoto Masaya	4. 巻 -
2. 論文標題 BRUP 1, an intracellular bilirubin modulator, exerts neuroprotective activity in a cellular Parkinson's disease model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Valentine Matthew N. Z., Hashimoto Kosuke, Fukuhara Takeshi, Saiki Shinji, Ishikawa Kei-ichi, Hattori Nobutaka, Carninci Piero	4. 巻 6
2. 論文標題 Multi-year whole-blood transcriptome data for the study of onset and progression of Parkinson's Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Data	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41597-019-0022-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 野中里紗、石川景一、志賀孝宏、城崇之、中村亮太、大山彦光、斉木臣二、岡野栄之、服部信孝、赤松和土
2. 発表標題 フィーダーフリー培養系iPS細胞を用いた中脳特異ドパミン作動性ニューロンの分化誘導法の検討
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志賀孝宏、三好さくら、葛巻直子、石川景一、服部信孝、岡野栄之、赤松和土
2. 発表標題 老化を加速する低分子化合物を用いた神経変性疾患iPS解析システムの構築
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 志賀孝宏、三好さくら、葛巻直子、石川景一、服部信孝、岡野栄之、赤松和土
2. 発表標題 ATM阻害はヒトiPS細胞由来神経細胞の老化を加速させる
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野中里紗、石川景一、志賀孝宏、中村亮太、城崇之、大山彦光、服部信孝、赤松和土
2. 発表標題 フィーダーフリー培養系iPS細胞を用いた中脳特異ドパミン作動性ニューロンの分化誘導法の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口昂大、石川景一、斉木臣二、船山学、金井数明、岡野栄之、服部信孝、赤松和土
2. 発表標題 パーキンソン病iPS細胞を用いた病態解明・創薬スクリーニング
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志賀孝宏、三好さくら、葛巻直子、石川景一、服部信孝、岡野栄之、赤松和土
2. 発表標題 老化を加速する低分子化合物を用いた神経変性疾患iPS解析システムの構築
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kei-ichi Tsukiboshi, Akihiro Yamaguchi, Kei-ichi Ishikawa, Kazuaki Kanai, Hideyuki Okano, Nobutaka Hattori, Wado Akamatsu
2. 発表標題 iPSC-based drug screening for PARK9, a familial Parkinson's disease with impaired autophagy
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Shiga, Sakura Miyoshi, Naoko Kuzumaki, Ke-ichi Ishikawa, Nobutaka Hattori, Hideyuki Okano, Wado Akamatsu
2. 発表標題 iPSC-based disease modeling for late onset neurodegenerative diseases using a chemical compound accelerating senescence.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Yamaguchi, Kei-ichi Ishikawa, Tsuyoshi Inoshita, Kahori Shiba-Fukushima, Yuzuru Imai, Hideyuki Okano, Nobutaka Hattori, Wado Akamatsu
2. 発表標題 Identification of potential therapeutic agents for impaired mitophagy in Parkinson's disease
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考