

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15466

研究課題名（和文）パーキンソン病におけるドーパミン神経細胞特異的な新たな病態発症機構の解明

研究課題名（英文）iPSC studies for understanding the pathogenesis of dopaminergic neuron death in Parkinson' disease

研究代表者

横田 睦美（Yokota, Mutsumi）

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10647415

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではドーパミン神経マーカーTyrosine Hydroxylase（TH）遺伝子にGFP遺伝子をノックインしたTH-GFP iPSC細胞株を作出し、ドーパミン神経細胞に特化した光顕・電顕相関観察やライブイメージングが可能であることを示した。さらに、近接ライゲーションアッセイやカルシウムイメージングによりPRKN変異患者においてミトコンドリアと小胞体との接触が構造及び機能的に低下していることを明らかにした。本研究結果は、パーキンソン病におけるドーパミン神経細胞特異的な細胞死の機序解明につながる重要な知見といえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ドーパミン神経細胞においてGFPを発現するパーキンソン病患者iPS細胞株が得られた。これまでTH遺伝子にレポーターをノックインしたiPS細胞株は健常者についてのみ報告されており、PRKN変異患者TH-GFP iPSC細胞の樹立については未だ報告がなかった。TH-GFP iPSC細胞株を用いることによりドーパミン神経細胞特異的なオルガネラの形態学的解析やライブイメージングが可能となり、パーキンソン病に至るオルガネラの形態・機能的特徴を見出す可能性があるため本研究結果は重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：Parkinson's disease with PRKN mutations is characterized by the preferential degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. However, ultrastructural changes of mitochondria specifically in dopaminergic neurons derived from iPSC have rarely been analyzed. I established tyrosine hydroxylase reporter (TH-GFP) iPSC lines from a PD patient with a PRKN mutation to perform correlative light-electron microscopy analysis and live cell imaging in GFP-expressing dopaminergic neurons. In addition, a proximity ligation assay and mitochondrial calcium imaging using TH-GFP iPSCs showed that ER-mitochondrial contact sites were significantly reduced in PRKN-mutant patient dopaminergic neurons compared to the control. This study using TH-GFP iPSC lines would contribute to further understanding of the mechanisms of dopaminergic neuron degeneration in patients with PRKN mutations.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア iPSC細胞 ドーパミン神経細胞 PRKN

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの形態変化はミトコンドリアの機能制御のみならず、細胞死や神経変性疾患との関連も示唆されている。*PRKN* はミトコンドリアの形態変化を含む様々なミトコンドリア品質管理機構に関わることが知られている。*PRKN* 変異起因性パーキンソン病は中脳黒質におけるドーパミン神経細胞の変性を病理学的所見の一つとする神経変性疾患であり、その神経変性の主因としてミトコンドリアの異常が示唆されているが、これまでの先行研究においてパーキンソン病患者由来ドーパミン神経細胞における超微形態学的解析は十分になされていなかった。その理由として、iPS 細胞からドーパミン神経細胞への現分化誘導方法においてはドーパミン神経細胞とその他の細胞が混在しており、電子顕微鏡上ではドーパミン神経細胞を識別できないという状況があった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ドーパミン神経細胞への GFP 標識と超微形態学的解析を組み合わせ、ミトコンドリアの機能・形態についてドーパミン神経細胞とその他細胞の比較解析や健常者と *PRKN* 変異患者との比較解析を行うことにより、パーキンソン病におけるドーパミン神経細胞特異的な細胞死の発症機構解明を目指した。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムを用いてドーパミン神経細胞特異的に発現する Tyrosine Hydroxylase (TH) 遺伝子へ GFP 遺伝子をノックインするため、TH 遺伝子への GFP 遺伝子ノックインに必要な Cas9、sgRNA、Donor plasmid DNA を作製した。これらの plasmid DNA を健常者 (2 名) および *PRKN* 変異患者 (1 名) 由来 iPS 細胞へエレクトロポレーションにより導入後、薬剤処理により GFP 配列が挿入されたクローンのみを選別した。

当大学のゲノム・再生医療センターにおいて確立されたドーパミン神経細胞への誘導方法 (Imaizumi et al., Stem Cell Reports, 2015; Matsumoto et al., Stem Cell Reports, 2016; Fujimori et al., Stem Cell Reports, 2017; Yamaguchi et al., Stem Cell Reports, 2020) を用いて、健常者および *PRKN* 変異患者 TH-GFP iPS 細胞からドーパミン神経細胞への分化誘導を行った。分化誘導後の神経細胞をグリッド番地付きのカバーガラスに播種し、光学顕微鏡により GFP 蛍光を撮像し、ドーパミン神経細胞の位置情報を得た。固定後に樹脂包埋し、超薄切片からグリッド番地や細胞の形態を元にドーパミン神経細胞を探し、超微形態学的解析を行った (光顕・電顕相関観察)。また、分化誘導を行った神経細胞に対してミトコンドリア膜電位インジケータである TMRM や Mitotracker を用いたライブイメージングや、ミトコンドリアカルシウムインジケータである CEPIA3 mt を用いたカルシウムイメージング、ミトコンドリアや小胞体の抗体を用いた近接ライゲーションアッセイも行った。

4. 研究成果

(1) TH-GFP iPS 細胞株の樹立

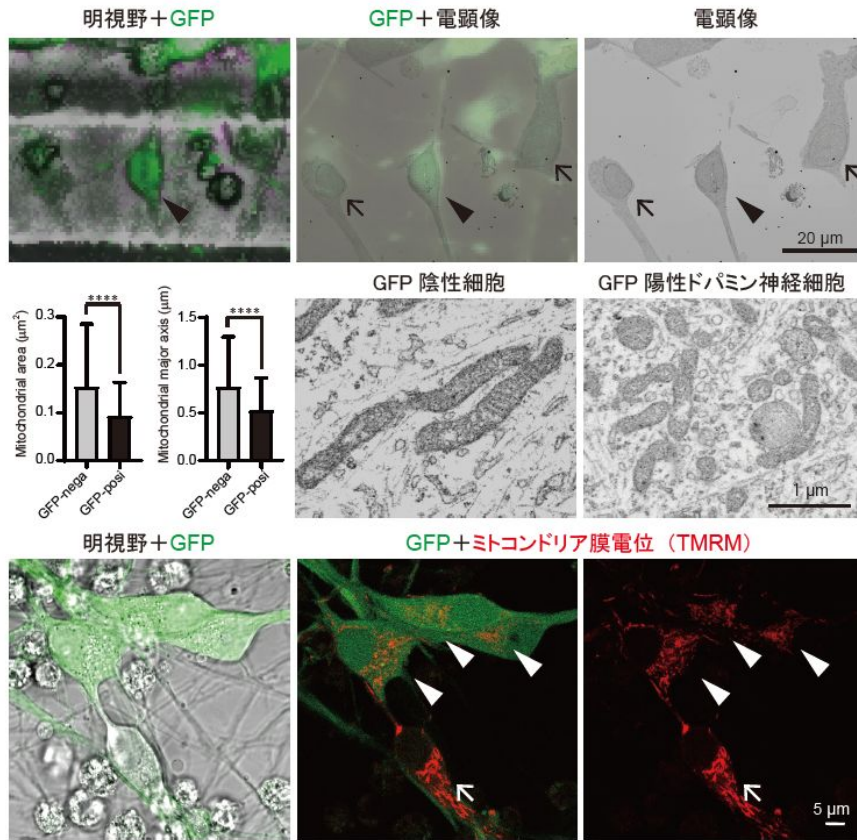
ドーパミン神経特異的なマーカー TH 遺伝子へ GFP 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムによりノックインするため、まずヒト TH 遺伝子エクソン 12 内ターゲット配列を含む sgRNA 発現ベクターを作製した。また、切断部位に隣接した相同配列を含むドナーベクターを作製した。作製したこれらのベクターと Cas9 ベクターを健常者及び *PRKN* 変異患者 iPS 細胞へ導入し、薬剤セレクションと PCR を行った結果、標的部位に GFP 遺伝子が挿入された TH-GFP iPS 細胞が健常者、患者共に複数クローン得られたことが明らかになった。これらの TH-GFP iPS 細胞から分化誘導させたドーパミン神経細胞において GFP の発現を確認した。さらに、TH-GFP iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞の TH 抗体と GFP 抗体による免疫染色の結果、同じパターンの染色像が得られた。これらの結果から、ドーパミン神経細胞特異的に GFP を発現する健常者及び *PRKN* 変異患者 iPS 細胞株の獲得に成功したことが確かめられた。

(2) TH-GFP iPS 細胞を用いた光顕・電顕相関観察法の確立

健常者及び *PRKN* 変異患者 TH-GFP iPS 細胞から分化誘導を行った神経細胞をグリッド付きのカバーガラスに播種した。その後の光学顕微鏡による撮像で GFP 陽性神経細胞、GFP 陰性神経細胞の位置情報を得た後、そのまま包埋・薄切し、電子顕微鏡観察を行った。その結果、GFP 陽性であるドーパミン神経細胞は GFP 陰性であるその他サブタイプ神経細胞と比較してミトコンドリアのサイズが有意に小さいことが明らかになった。この傾向は健常者、患者どちらにおいても同様の傾向であった (図上段、中段)。

(3) GFP 陽性ドーパミン神経細胞のミトコンドリアライブイメージング

さらに、健常者及び *PRKN* 変異患者 TH-GFP iPS 細胞由来神経細胞に対してミトコンドリア膜電位インジケータ TMRM を用いてミトコンドリア膜電位の評価を行ったところ、GFP 陽性ドーパミン神経細胞はその他サブタイプ神経細胞と比較してミトコンドリア機能も低い状態



TH-GFP iPS 細胞由来 GFP 陽性ドーパミン神経細胞 (矢頭) 及び陰性細胞 (矢印) の光顕・電顕相関観察 (上・中) とライブイメージング (下)

CCCP 処理を行った患者ドーパミン神経細胞は健常者ドーパミン神経細胞や患者その他細胞と比較して有意に細胞死が増加しており、パーキンソン病患者におけるドーパミン神経特異的な細胞死が再現された。

以上の結果は Molecular Brain 誌に投稿し、受理されている (Yokota et al., Mol. Brain, 2021)。

(5) 小胞体とミトコンドリアの接触部位の解析

ミトコンドリアと小胞体の接触部位 (ERMCS) はミトコンドリア動態やカルシウムシグナリング、オートファジーに重要であることが近年言われている。パーキンソン病を含む神経変性疾患において ERMCS の破綻が示唆されている。そこで、健常者と患者間での小胞体とミトコンドリアの接触部位 (ERMCS) の変化を明らかにするため、GFP 陽性ドーパミン神経細胞において小胞体とミトコンドリアの抗体を用いた近接ライゲーションアッセイを行った。その結果、*PRKN* 変異患者において ERMCS の減少が認められ、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP 処理によりさらに ERMCS が減少することが明らかになった。

また、小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオン流入について解析するため、GFP 陽性ドーパミン神経細胞においてレンチウイルスを介して *CEPIA3mt* を発現させ、ヒスタミン刺激による *CEPIA3mt* の蛍光強度変化を測定した。その結果、患者ドーパミン神経細胞においてヒスタミン刺激によるミトコンドリアへのカルシウムイオン流入の減少も明らかになった。従って、*PRKN* 変異患者ドーパミン神経細胞において ERMCS 減少による小胞体からミトコンドリアへのカルシウムイオン流入が減少していることが示唆された。現在これらの結果をまとめた論文を投稿中である。

TH-GFP iPS 細胞を用いた本研究の結果は、*PRKN* 変異患者で認められるドーパミン神経変性機序解明につながる重要な知見といえる。

あることも見出された (図下段)。これらの解析結果から、iPS 細胞由来ドーパミン神経細胞において細胞種特異的にミトコンドリアが小さく低機能であることが明らかになり、このことがドーパミン神経細胞の脆弱性の要因の一つとなっている可能性が示唆された。

(4) TH-GFP iPS 細胞株における細胞死の評価

PRKN 変異患者におけるドーパミン神経細胞特異的な細胞死を確認するため、ミトコンドリア脱共役剤である CCCP を分化誘導後の神経細胞に対して処理した結果、24 時間の

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokota Mutsumi, Kakuta Soichiro, Shiga Takahiro, Ishikawa Kei-ichi, Okano Hideyuki, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado, Koike Masato	4. 巻 14
2. 論文標題 Establishment of an in vitro model for analyzing mitochondrial ultrastructure in PRKN-mutated patient iPSC-derived dopaminergic neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00771-0	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横田睦美、角田宗一郎、吉野佑太郎、志賀孝宏、石川景一、岡野栄之、服部信孝、赤松和土、小池正人
2. 発表標題 Ultrastructural analysis of GFP-labeled dopaminergic neurons derived from control and PRKN-mutated patient TH-GFP iPSC lines. (PRKN変異患者TH-GFP iPS細胞由来ドパミン神経細胞の超微形態学的解析)
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田睦美、角田宗一郎、吉野佑太郎、志賀孝宏、石川景一、岡野栄之、服部信孝、赤松和土、小池正人
2. 発表標題 PRKN変異患者ドパミン神経細胞におけるミトコンドリアスフェロイド化応答の電子顕微鏡解析
3. 学会等名 日本解剖学会第109回関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田睦美、角田宗一郎、吉野佑太郎、志賀孝宏、石川景一、岡野栄之、服部信孝、赤松和土、小池正人
2. 発表標題 TH-GFP iPS細胞を用いたGFP陽性ドパミン神経細胞のRNA-seq解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横田睦美、角田宗一郎、吉野佑太郎、志賀孝宏、石川景一、岡野栄之、服部信孝、赤松和土、小池正人
2. 発表標題 PARK2 iPS細胞由来ドーパミン神経細胞における酸化ストレス下ミトコンドリア形態変化の電子顕微鏡観察
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横田睦美、角田宗一郎、志賀孝宏、石川景一、服部信孝、赤松和土、小池正人
2. 発表標題 iPS細胞由来GFP標識ドーパミン神経細胞の光顕-電顕相関観察
3. 学会等名 日本解剖学会第108回関東支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田睦美、角田宗一郎、志賀孝宏、服部信孝、赤松和土、小池正人
2. 発表標題 Tyrosine HydroxylaseレポーターPARK2 iPS細胞を用いた光顕-電顕相関観察
3. 学会等名 第125回日本解剖学会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田睦美、吉野佑太郎、小池正人
2. 発表標題 TH-GFP iPS細胞由来ドーパミン神経細胞のミトコンドリアカルシウムイメージング
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------