

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06914

研究課題名(和文)大村天然化合物ライブラリーと疾患特異的iPS細胞を活用した創薬研究

研究課題名(英文) Drug discovery research using Omura natural compounds and disease-specific iPS cells

研究代表者

太田 悦朗(Ohta, Etsuro)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：60508042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大村天然化合物ライブラリーを用いて、I2020T変異Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2)をもつ遺伝性パーキンソン病患者iPS細胞由来神経細胞に対して新規治療薬開発につながる化合物を探索した。まず、神経突起長の短縮、酸化ストレスによるアポトーシスの亢進、リン酸化Tauの増加について評価できる自動定量解析システムをIN Cell Analyzer 6000で構築した。この解析システムを用いて、1stおよび2nd screeningを行い、神経突起長の伸長効果とリン酸化Tauの抑制効果を示す化合物を60種見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞(iPSC)を用いた創薬研究では、新規治療薬となりうる候補薬剤がドラッグリポジショニングの場合、治験への移行がスムーズに開始できることから、iPSC創薬の臨床応用への展開が注目されている。遺伝性パーキンソン病(PD)の原因分子LRRK2に変異をもつPD患者は、臨床症状や治療薬レボドパに対する反応性が孤発性PD患者と類似した特徴を示す。将来的な波及効果として、リード化合物の構造を変化させた合成化合物などアカデミア発iPSC創薬への展開が期待できる。また、Tauを標的とした化合物は、アルツハイマー病を含めた他の神経変性疾患への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for developing novel therapeutic agents using Omura natural compounds and familial Parkinson's disease patient iPS cell-derived neurons harboring the I2020T mutant Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2). First, we constructed an automatic quantitative analysis system using IN Cell Analyzer 6000, which can evaluate shortening of neurite length, acceleration of apoptosis to oxidative stress, and increased Tau phosphorylation. Next, using this analysis system, 1st and 2nd screenings were performed, and 60 compounds were found that showed neurite length elongation and phosphorylated Tau suppression effects.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 LRRK2 iPS細胞 タウ 創薬

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

顕性遺伝パーキンソン病 (PD) の原因分子 Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) に変異をもつ PD 患者は、臨床症状や発症年齢、治療薬レボドパに対する反応性が孤発性 PD 患者と類似した特徴を示す。そのため LRRK2 の解析は、PD の発症機序を理解する上で重要と考えられる。これまでに申請者は、日本の顕性遺伝 PD 家系 (相模原家系) の発症原因が LRRK2 のキナーゼドメイン内の I2020T 変異であることを明らかにした。その後、正常 LRRK2 および変異 LRRK2 に関する生理的機能や生化学的特性、LRRK2 の基質候補分子を明らかにしてきた。これらを踏まえて、共同研究者である慶應義塾大学生理学岡野栄之教授と大阪大学神経内科学望月秀樹教授と共に、I2020T 変異 LRRK2 をもつ相模原家系内 PD 患者 2 名の皮膚線維芽細胞から iPSC 細胞 (I2020T LRRK2-iPSC) を樹立し、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞では健常者 iPSC 由来神経細胞に比べ、ドーパミン放出能の異常や酸化ストレスへの脆弱性、リン酸化 AKT の低下、リン酸化 Tau 増加、オートファジー機能不全がみられることを報告した。さらに、iPSC 樹立の PD 患者剖検脳の神経細胞においてリン酸化 Tau の増加が引き起こす神経原線維変化を確認し、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞は *in vitro* 病態モデルとして有用であることが明らかになった。また近年、ゲノム編集技術で I2020T 変異を修復した iPSC (isogenic-iPSC) を新たに樹立し、I2020T LRRK2-iPSC および isogenic-iPSC 由来神経細胞の比較解析から、新たな異常表現型などの病態へのアプローチが可能であることを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、既報の I2020T LRRK2-iPSC および新規樹立の isogenic-iPSC から誘導した iPSC 由来神経細胞に対し、イベルメクチンなど様々な薬剤のソースとなった大村天然化合物ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングを展開することで、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞の酸化ストレスに対する細胞死を抑制する化合物または神経突起長短縮、リン酸化 Tau 増加などの異常表現型を軽減する化合物の探索を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 疾患特異的 iPSC 由来神経細胞における異常表現型を自動定量する解析システムの構築

I2020T LRRK2-iPSC 2 株、isogenic-iPSC 1 株、健常者 iPSC (control-iPSC) 1 株を使用した。特に、新規樹立の isogenic-iPSC については、characterization の詳細について解析した。各々の iPSC 由来神経細胞は、低分子化合物を用いた既報の分化誘導法で作製した。分化細胞は、神経細胞マーカー Beta-III tubulin 抗体、MAP2 抗体などを用いた免疫細胞化学染色で評価した。まず、薬剤スクリーニングによる評価系システムを構築するために、神経変性疾患でみられる異常表現型の一つである神経突起長の短縮について、レーザー型ラインスキャン共焦点システムを搭載したイメージングサイトメーター IN Cell Analyzer における自動定量解析システムを用いて条件検討を行った。次に、過酸化水素による酸化ストレス応答後の活性化 Caspase-3 を検出できる自動定量解析システムについて条件検討を行った。最後に、異常表現型の一つであるリン酸化 Tau を検出できる自動定量解析システムについて条件検討を行った。また、BZ-X800 蛍光顕微鏡のイメージングサイトメーターモジュールによる簡便な自動定量解析システムの構築を試みた。

#### (2) 大村天然化合物ライブラリーを用いた iPSC 由来神経細胞に対する保護効果化合物の探索

1st screening として、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞群、isogenic-iPSC 由来神経細胞群に 240 種の大村天然化合物を添加し、構築した解析システムを用いて、神経変性疾患でみられる異常表現型の一つである神経突起長の短縮を改善できるか否かを評価した。次に、2nd screening として、異常表現型を改善がみられた大村天然化合物群について、酸化ストレスに対する細胞死、リン酸化 Tau の増加などの疾患特異的な異常表現型を改善できるか否かを評価した。また、異常表現型の改善がみられた大村天然化合物群については、LRRK2 キナーゼ阻害剤との比較解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 疾患特異的 iPSC 由来神経細胞における異常表現型を自動定量する解析システムの構築

新規樹立 isogenic-iPSC の characterization について解析した結果、3 胚葉への分化および正常な核型を示すことを確認した。また、ゲノム編集によるオフターゲット効果がみられないことも確認した。さらに、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞では、isogenic-iPSC 由来神経細胞に比べ、神経突起長の短縮がみられることを確認した。

神経変性疾患でみられる異常表現型の一つである神経突起長の短縮を評価する薬剤スクリーニングのための解析システムを構築するために、イメージングサイトメーターの IN Cell Analyzer 6000 を用いて Beta-III tubulin 抗体陽性神経細胞の神経突起長を自動識別および定量した。その結果、Beta-III tubulin 抗体陽性神経細胞の神経突起長を自動識別して定量する解析システムの条件を構築した。また同様に、過酸化水素による酸化ストレス応答後の活性化

Caspase-3 を検出できる自動定量解析システムと異常表現型のひとつであるリン酸化 Tau を検出できる自動定量解析システムについても最適な解析条件を構築した。さらに、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞および isogenic-iPSC 由来神経細胞に LRRK2 キナーゼ阻害剤 4 種をそれぞれ添加し、免疫細胞化学染色を行った後、BZ-X800 蛍光顕微鏡のイメージサイトメーターモジュールによる酸化ストレス応答後の活性化 Caspase-3、リン酸化 Tau 増加をそれぞれ検出できる簡便な自動定量解析システムも構築した。

(2) 大村天然化合物ライブラリーを用いた iPSC 由来神経細胞に対する保護効果化合物の探索

I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞および isogenic-iPSC 由来神経細胞に大村天然化合物群を添加し、構築したシステムを用いて 1st screening を行った結果、240 種のうち約 80 種の天然化合物において、I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞における神経突起の伸長促進効果を確認した。次に、酸化ストレスに対する細胞死、リン酸化 Tau の増加などの疾患特異的な異常表現型を標的とした 2nd screening を行った結果、約 80 種のうち約 60 種の天然化合物において、PD 患者 iPSC 由来神経細胞における神経突起の伸長促進効果を確認した。I2020T LRRK2-iPSC 由来神経細胞におけるリン酸化 Tau の抑制効果、細胞死抑制効果をそれぞれ示した。また、神経突起の伸長促進効果を示した大村天然化合物群について、現在海外でパーキンソン病の臨床研究で使用されている LRRK2 キナーゼ阻害剤との比較解析を行った結果、同等の神経突起の伸長促進効果を示すことがわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawakami Fumitaka, Imai Motoki, Tamaki Shun, Ohta Etsuro, Kawashima Rei, Maekawa Tatsunori, Kurosaki Yoshifumi, Ohba Kenichi, Ichikawa Takafumi	4. 巻 46
2. 論文標題 Nrf2 Expression Is Decreased in LRRK2 Transgenic Mouse Brain and LRRK2 Overexpressing SH-SY5Y Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 123 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00356	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 Muneshige Kyoko, Inahashi Yuki, Itakura Makoto, Iwatsuki Masato, Hirose Tomoyasu, Inoue Gen, Takaso Masashi, Sunazuka Toshiaki, Ohashi Yoshihisa, Ohta Etsuro, Uchida Kentaro	4. 巻 16
2. 論文標題 Jietacin Derivative Inhibits TNF- $\alpha$ -Mediated Inflammatory Cytokines Production via Suppression of the NF- $\kappa$ B Pathway in Synovial Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 5 ~ 5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ph16010005	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 Hattori Akito, Ohta Etsuro, Nagai Makiko, Iwabuchi Kazuya, Okano Hideyuki	4. 巻 203
2. 論文標題 A new approach to analysis of intracellular proteins and subcellular localization using cellprofiler and imageJ in combination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods	6. 最初と最後の頁 233-241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymeth.2021.04.019	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 Ohta Etsuro, Sone Takefumi, Ukai Hideki, Hisamatsu Tomoko, Kitagawa Tokiko, Ishikawa Mitsuru, Nagai Makiko, Ueda Hiroki R., Obata Fumiya, Okano Hideyuki	4. 巻 49
2. 論文標題 Generation of gene-corrected iPSCs line (KEIUi001-A) from a PARK8 patient iPSCs with familial Parkinson's disease carrying the I2020T mutation in LRRK2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.102073	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hattori A, Onodera K, Hidai R, Shizu M, Shimizu M, Nishigai Y, Hirahara M, Fukuda S, Iwabuchi K, Okano H, Ohta E
2. 発表標題 A new approach to analysis of phagocytosis using CellProfiler
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidai R, Hattori A, Onodera K, Shizu M, Shimizu M, Nishigai Y, Hirahara M, Fukuda S, Satoh M, Iwabuchi K, Ohta E
2. 発表標題 Analysis of physiological function of mutant LRRK2-expressing microglia
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部精人、太田悦朗、永井 真貴子、岩淵 和也、岡野 栄之
2. 発表標題 細胞内輸送関連分子の新規解析手法の開発と病態モデルへの応用
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野寺香奈、服部精人、樋代理子、椎津愛美、清水美穂、西海有希、平原瑞季、福田沙織、岡野栄之、太田悦朗
2. 発表標題 オープンソース画像解析ソフトウェアCellProfilerを用いた免疫担当細胞における貪食能解析ツールの開発
3. 学会等名 第16回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋代理子、服部精人、小野寺香奈、椎津愛美、清水美穂、西海有希、平原瑞季、福田沙織、岩淵和也、太田悦朗
2. 発表標題 遺伝性パーキンソン病原因分子LRRK2の疾患特異的変異がミクログリアに及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第16回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部精人、太田悦朗、永井真貴子、樋代理子、岩淵和也、岡野栄之
2. 発表標題 The influence of I2020T mutant LRRK2, the causal molecule of familial Parkinson's disease, on intracellular membrane trafficking
3. 学会等名 Neuro2022【第45回日本神経科学大会】
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hattori A, Ohta E, Nagai M, Iwabuchi K, Okano H.
2. 発表標題 Analysis of membrane trafficking through Rab proteins in PARK8 iPSC-derived neurons
3. 学会等名 The 19th International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部精人、太田悦朗、永井 真貴子、岩淵 和也、岡野 栄之
2. 発表標題 遺伝性パーキンソン病患者iPS 細胞由来神経細胞のRab を介したメンブレントラフィッキングの解析
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hattori A, Ohta E, Nagai M, Miyoshi H, Iwabuchi K, Okano H
2. 発表標題 Analysis of intracellular membrane traffic using iPSC-derived neurons from familial Parkinson's disease patient
3. 学会等名 The 10th International Conference AD/PD (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hattori A, Ohta E, Nagai M, Miyoshi H, Iwabuchi K, Okano H
2. 発表標題 Analysis of intracellular membrane traffic using iPSC-derived neurons from familial Parkinson's disease patient
3. 学会等名 Neuro2020【第43回日本神経科学大会】
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田悦朗、佐々木晶子、新田龍人、服部精人、岡野栄之
2. 発表標題 ヒト単球系細胞株を用いたLRRK2キナーゼ阻害剤による抗炎症効果の解析
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020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
---------	---------