

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07873

研究課題名(和文) パーキンソン病 iPS 細胞を用いた老化脳環境モデル作製と病態解明

研究課題名(英文) Generation of an aged Parkinson's disease brain model and elucidation of its pathophysiology using iPS cells

研究代表者

石川 景一 (Ishikawa, Kei-ichi)

順天堂大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90733973

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)：パーキンソン病は中脳のドパミン神経が脱落する疾患であり、老化は最大の発症要因である。本研究はドパミン神経やアストロサイトの老化とPD病態とのかかわりを明らかにすることを目的とした。遺伝性パーキンソン病患者由来iPS細胞から誘導したドパミン神経が老化促進化合物使用により病態異常が増強されることを見だし、さらにその老化促進機序を解明した。またiPS細胞由来アストロサイト誘導法を確立し、ドパミン神経との共培養による神経活動活性化などを確認した。また共培養条件下で老化促進化合物により、ドパミン神経細胞とアストロサイトが混在条件で老化を誘導し、疾患病態に近いモデルの作製を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢性の神経変性疾患のひとつであるパーキンソン病について、患者由来iPS細胞を用いてその細胞老化を誘起することで病態異常発現が促進されることを発見し、その老化促進機序の一端を明らかにした。さらにiPS細胞由来ドパミン神経細胞とアストロサイトの共培養老化モデルを作製した。これらは新たな治療ターゲットとなる可能性があり、また今後の疾患病態解析に広く貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Parkinson's disease is caused by midbrain dopaminergic neural loss and ageing is the most important pathogenic factor. This study aimed to explore the association between the ageing of dopaminergic nerves and astrocytes and Parkinson's disease pathology. We found that the pathological abnormality of dopaminergic neurons induced by iPS cells derived from hereditary Parkinson's disease patients was enhanced by using ageing-accelerating compounds, further clarifying the ageing-accelerating mechanism. We also established a method for inducing astrocytes derived from iPS cells and confirmed the activation of neuronal activity by co-culturing them with dopaminergic neurons. We also induced senescence in dopaminergic neurons and astrocytes under mixed culture conditions using a senescence-promoting compound, which may provide a model close to pathological conditions.

研究分野：脳神経内科

キーワード：パーキンソン病 iPS細胞 ドパミン神経 アストロサイト 老化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病はアルツハイマー病に次いで 2 番目に多い神経変性疾患であり、加齢により発症率が増加することから老化は最大の発症要因であると指摘されている(Lancet Neurol 2006)。有効な治療法は対症療法に留まり、高齢化により患者数の増加と医療費・介護負担の増加が予想されている。

パーキンソン病は中脳黒質ドパミン神経細胞の 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。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から、ミトコンドリア機能異常、蛋白分解機構異常、小胞体ストレス、転写異常などが報告されている。さらに 2009 年からは遺伝性パーキンソン病由来 iPS 細胞により実際の患者神経細胞における病態解明や新規治療薬探索がなされ、申請者自身も複数の遺伝性パーキンソン病(PARK2, PARK6, PARK22)患者 iPS 細胞由来ドパミン神経における病態解明(Hum Mol Genet 2017, BBRC 2017, Hum Mol Genet 2019)や、新規治療候補薬(PNAS 2018, BBRC 2019)を報告した。

しかしながら iPS 細胞を用いた神経疾患研究には、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~360 日と長期間培養を要することが多い。申請者も複数の遺伝性パーキンソン病-iPS 細胞由来ドパミン神経で検討を行うなかで、約 15 日ほどの短期間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、老化を促進し加齢による神経変性を再現できる手法の必要性を実感した。同様の観点から、早老症の原因タンパク質 progerin の導入やテロメア合成酵素の阻害を用いた老化促進法が報告されている(Cell Stem Cell 2013, Cell Reports 2016)が、手技が煩雑かつ神経細胞での有効性が低く普及していない。そこで申請者らは iPS 細胞由来神経細胞を老化促進させる化合物を見いだすべく薬剤スクリーニングを行い、老化促進作用を有する化合物を発見した。

一方で PD 病態研究は病変の首座であるドパミン神経細胞で主に行われてきたが、パーキンソン病剖患者検脳ではアストロサイトおよびオリゴデンドロサイトでも シヌクレイン凝集が指摘されるなど(Acta Neuropathol 2000)、グリア細胞の病態関与が指摘されていた。特に、神経に栄養を供給し神経細胞維持に保護的に働くと考えられているグリア細胞の異常が、疾患神経細胞異常の促進や健常神経細胞異常を誘起することが示されている。マウスモデルでアストロサイトの反応性がパーキンソン病病態に関与するとの報告や(Nat Med 2018)、遺伝性パーキンソン病(PARK8)-iPS 細胞由来アストロサイトにより健常者由来神経細胞にも シヌクレイン凝集や細胞死を来すと報告されている(Stem Cell Rep 2018)。また iPS 細胞から脳の発生初期を模した神経・グリア細胞混在 3 次元脳モデルである脳オルガノイドを用いた疾患研究では、中脳黒質領域オルガノイドで神経細胞異常が検出しやすいと報告されている(Adv Sci 2018, Stem Cell Rep 2019)。

これらの背景から、上述の遺伝性 PD-iPS 細胞研究の実績と、老化促進化合物による iPS 細胞由来神経細胞の老化モデルをさらに発展させ、神経・グリア細胞のクロストーク解析のため共培養を行い、老化促進化合物を組み合わせることでより生理的環境に近い老化脳環境モデルを作製できれば、パーキンソン病発症要因の 1 つとされながらも未だ解明されていないグリア細胞および老化のパーキンソン病病態への関わり的一端をより詳らかにすることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

- (1) パーキンソン病態における老化の影響とその機序を明らかにする。
- (2) iPS 細胞由来ドパミン神経とアストロサイトの共培養下での老化によるパーキンソン病病態再現モデルを確立する。

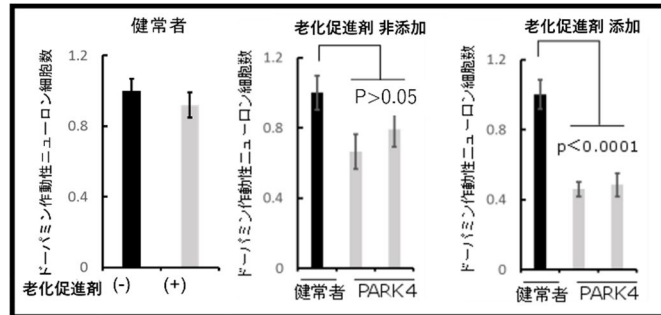
3. 研究の方法

- (1) 遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞をドパミン神経細胞に分化誘導し、さらに老化促進化合物処理による疾患表現型を検出、評価する。
- (2) iPS 細胞由来ドパミン神経細胞における老化促進化合物の作用機序を明らかにし、パーキンソン病病態に関わる機序の一端を明らかにする。
- (3) 遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を用いたより効率的なアストロサイト誘導法を確立する。
- (4) 遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞から、ドパミン神経およびアストロサイトへの誘導を行い、共培養条件下で老化促進化合物を用いることで老化脳内環境モデルを確立する。

4. 研究成果

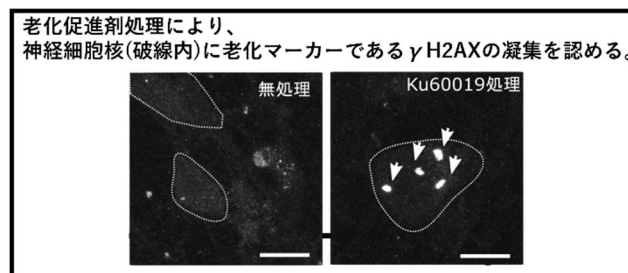
(1) 遺伝性パーキンソン病 iPS 細胞由来ドパミン神経の老化促進化合物による疾患表現型検出

iPS 細胞に SB431542 (TGF- Receptor Inhibitor)、dorsomorphin (AMPK inhibitor)、CHIR99021 (Wnt signal activator) の 3 化合物で処理し、胚葉体類似の状態に誘導し、その後神経幹細胞用培地内で浮遊培養を行うことで、神経幹細胞に誘導した (Stem Cell Rep 2017)。さらに中脳黒質が発生する中の腹側に誘導するため CHIR99021 と Purmorphamine (SHH inhibitor) を添加し、中脳ドパミン神経前駆細胞を作製した。このドパミン神経前駆細胞を神経細胞培地環境下で接着培養にするとドパミン神経細胞に分化し徐々に成熟する。本研究ではドパミン神経分化時に老化促進化合物を添加し、PARK4 を含む複数の遺伝性パーキンソン病患者由来ドパミン神経細胞の異常を解析した。その結果、老化促進化合物処理によってドパミン神経細胞の脆弱性や、細胞内 シヌクレインの蓄積などの異常を、より明確かつ短時間で検出することができた。



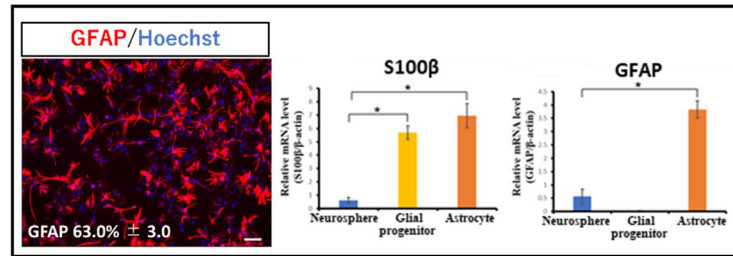
(2) iPS 細胞由来ドパミン神経の老化促進化合物の効果と機序解析

iPS 細胞由来ドパミン神経細胞に老化促進化合物を添加し、その効果と作用機序について検討した。老化促進化合物添加により、ドパミン神経において核内 H2AX 蓄積、SA- Gal の増加、核膜タンパク質 LaminB の局在異常、オートファジー障害などの細胞老化表現型を呈することを確認した。またさらには Senolytic drugs と老化促進化合物との共処理を行い、HSP90 シグナル経路を介して、老化促進機序を呈することを見出した。これらの結果から、上記(1)で示した老化促進化合物による遺伝性パーキンソン病 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の異常表現型発現促進は、一般的な細胞老化機序の少なくとも一部を再現することで誘起されたものであると確認できた。



(3) 遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞からアストロサイト誘導法の確立

iPS 細胞からアストロサイトへの誘導法は、複数の方法が報告されているが、ドパミン神経細胞との共培養と疾患再現モデル作製の観点から、ドパミン神経細胞誘導法となるべく近く、またより短期間で誘導する方法を検討した。神経発生過程では神経幹細胞からまず神経細胞が分化し、その後アストロサイト、さらにオリゴデンドロサイトと順次グリア細胞が誘導される。(1)に述べた方法と同様にして中脳腹側の領域特異性をもった神経幹細胞から、グリア前駆細胞を誘導するため T3, PDGF, IGF, NT3 を含んだ培地で培養し、アストロサイト前駆細胞を誘導。さらに T3, CNTF を含む成熟培地で誘導することで、50 日前後でアストロサイトを比較的効率よく誘導することができた。



(4) 遺伝性パーキンソン病 iPS 細胞由来ドパミン神経とアストロサイトの共培養による老化脳内環境モデル作製

(1)(3)で示した方法で iPS 細胞からドパミン神経およびアストロサイトをそれぞれ誘導し、共培養実験を行った。アストロサイトとの共培養によりドパミン神経の成熟が促進され神経発火の亢進などを確認できた。またこれに老化促進化合物を処理することにより、アストロサイトとドパミン神経細胞が混在するなかで老化も引き起こす、病態環境に近い条件を実現できた。健常 iPS 細胞と遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞からそれぞれこの老化脳内環境モデルを作製し病態解明をすすめている。しかしながら複数の細胞株で複数種類の細胞を誘導する必要から、実験回ごとのバラツキも大きく条件検討に難渋したため、本研究期間内に結論を得られるまでには至らなかった。

以上より、遺伝性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を用いて、細胞老化を誘起することで病態表現型発現を促進することを確認し、パーキンソン病態における細胞老化の関わりの一部を示すことができた。さらに本モデルで誘導した細胞老化経路を明らかにすることで、新たな治療ターゲットの可能性を示すことができた。これはパーキンソン病特異的な経路ではない可能性も高く、他の加齢性の神経変性疾患にも応用できる可能性もある。

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 6件）

1. 著者名 Ishikawa Kei-ichi, Nonaka Risa, Akamatsu Wado	4. 巻 -
2. 論文標題 Differentiation of Midbrain from Human iPS Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Models of Parkinson's Disease. Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 73~80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1495-2_8	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 -

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 14
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 1060~1075
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 Kano Masayoshi, Takanashi Masashi, Oyama Genko, Yoritaka Asako, Hatano Taku, Shiba-Fukushima Kahori, Nagai Makiko, Nishiyama Kazutoshi, Hasegawa Kazuko, Inoshita Tsuyoshi, Ishikawa Kei-ichi, Akamatsu Wado, Imai Yuzuru, Bolognin Silvia, Schwamborn Jens Christian, Hattori Nobutaka	4. 巻 6
2. 論文標題 Reduced astrocytic reactivity in human brains and midbrain organoids with PRKN mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj Parkinson's Disease	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41531-020-00137-8	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 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 オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kataura Tetsushi, Sedlackova Lucia, Otten Elsje G., Kumari Ruchika, Shapira David, Scialo Filippo, Stefanatos Rhoda, Ishikawa Kei-ichi, et al.	4. 巻 57
2. 論文標題 Autophagy promotes cell survival by maintaining NAD levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 2584 ~ 2598.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2022.10.008	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 Ishikawa Kei-ichi, Ishiguro Mayu, Li Yuanzhe, Nishioka Kenya, Hattori Nobutaka, Akamatsu Wado	4. 巻 60
2. 論文標題 Generation of three hiPSC clones from a Parkinson's disease patient with a heterozygous variant of VPS35 p.D620N	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102739 ~ 102739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2022.102739	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Takahiro Shiga, Sakura Miyoshi, Hidetaka Tamune, Avijite KumerSarkar, Kento Nakai, Naoko Kuzumaki, Ke-ichi Ishikawa, Kazuyoshi Baba, Shigeo Okabe, 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 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiro Suzuki, Takahiro Shiga, Kei-ichi Ishikawa, Wado Akamatsu.
2. 発表標題 RAPID AND EFFICIENT REGION SPECIFIC ASTROCYTE INDUCTION FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS WITHOUT EXOGENOUS TRANSCRIPTION FACTORS.
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiki Minobe, Risa Nonaka, Takahiro Shiga, Kei-ichi Ishikawa, Nobutaka Hattori, Wado Akamatsu.
2. 発表標題 Assessment of iPS cell-derived dopaminergic progenitor cells properties with long-term passaging and amplification.
3. 学会等名 ISSCR/JSRM 2021 Tokyo International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>順天堂大学 大学院医学研究科 ゲノム・再生医療センター https://research-center.juntendo.ac.jp/genome/about/</p>

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		
英国	Newcastle University		