

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07302

研究課題名（和文）家族性パーキンソン病PARK17由来iPS細胞を用いた根幹病態の解明と治療薬開発

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis of Parkinson's Disease using PARK17 patient-derived iPS cell

研究代表者

岡野 ジェイムス洋尚（Okano, Hirotaka James）

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：90338020

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）：VPS35のD620N変異によって発症する家族性パーキンソン病PARK17について患者iPS細胞由来ドパミンニューロンを用い病態解析を行った。変異細胞では細胞が飢餓状態時にRab9を含む小胞との相互作用およびリソソームとの共局在が有意に減少していた。iPS細胞由来ニューロンにおいてATG5をノックダウンしたところ、疾患群特異的にオートファジーが低下し、エストロゲンを添加すると回復することがわかった。さらに、エストロゲンの添加により細胞死およびシヌクレイン蓄積が改善した。本研究の成果は、パーキンソン病におけるエストロゲンの疾患修飾作用における新規オートファジーの関与を証明するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、古典的オートファジーを標的としたパーキンソン病治療が試みられてきたが、本研究結果から新規オートファジーの重要性も明らかになったため、今後の治療薬開発の幅が広がることが期待される。しかし、古典的オートファジーと比較すると新規オートファジーに関与するタンパク質群や分解される基質、両者のオートファジー機序の細胞内での役割の違いなどについて未解明な部分が多く、今後の研究の発展のためには新規オートファジー自体の研究発展が欠かせない。

研究成果の概要（英文）：We isolated iPSCs from two PD patients carrying the VPS35 D620N mutant. We revealed that the number of autophagic vacuoles was significantly decreased in ATG5-knockout fibroblast or ATG5-knockdown iPSCs-derived dopaminergic neurons compared with control cells. Furthermore, estrogen, which activates alternative autophagy pathways, increased the number of autophagic vacuoles in ATG5-knockdown VPS35 D620N mutant dopaminergic neurons. Estrogen induces Rab9 phosphorylation, mediated through Ulk1 phosphorylation, ultimately regulating alternative autophagy. Moreover, estrogen reduced the apoptosis rate of VPS35 D620N neurons, and this effect of estrogen was diminished under alternative autophagy knockdown conditions. In conclusion, Alternative autophagy might be important for maintaining neuronal homeostasis and may be associated with the neuroprotective effect of estrogen in PD with VPS35 D620N.

研究分野：神経科学

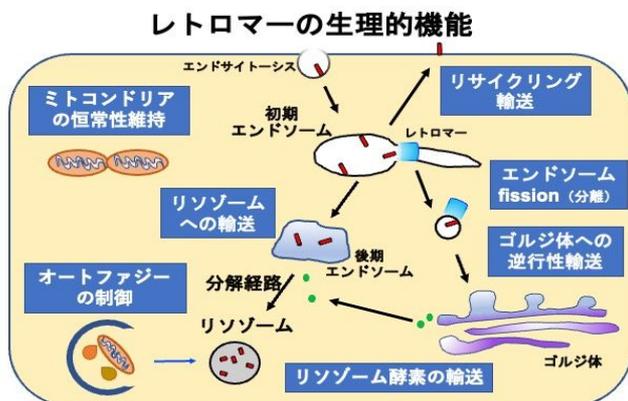
キーワード：パーキンソン病 VPS35 レトロマー 新規オートファジー Rab9

1. 研究開始当初の背景

近年、不治の病とされた様々な神経疾患の原因遺伝子・感受性遺伝子が同定され、その根幹病態にせまる発見が相次ぎ、病態解明に向け新たな知見が蓄積してきている。疾患関連遺伝子から推測される病態経路を疾患モデル細胞やモデル動物を用いて検証することにより、新規治療法の研究・開発が飛躍的に進んでいる。特に iPS 細胞技術は従来不可能であった患者由来の神経系細胞を用いた解析を可能とし、パーキンソン病をはじめとした神経変性疾患の病態研究を加速させている。パーキンソン病の国内患者数は14万人を超え、高齢化に伴い急速に増加しているが、PARK1(α -シヌクレイン)、PARK2 (parkin) など20以上の家族性パーキンソン病家系や、患者の90%を占める孤発性パーキンソン病症例の調査により疾患の原因遺伝子・感受性遺伝子が次々と同定されている。これらの遺伝子の機能から細胞内小胞輸送、リソゾーム機能、ミトコンドリア機能、オートファジーなどの複合的な障害が疾患病態に関与している可能性が強く疑われている。実際に患者脳でこの複合的障害が起こっていることが示されているが、これらの事象をつなぐ共通の根幹メカニズムは未だ不明である。

PARK17は細胞内小胞輸送を担うレトロマーの構成因子VPS35の遺伝子変異(D620N)により引き起こされる常染色体顕性遺伝の家族性パーキンソン病である。レトロマーは、細胞外からの物質の取り込みや細胞表面の受容体の回収を行うエンドサイトーシスによって生じるエンドソームの細胞内輸送を担うが、他にも多彩な生理的機能を持つ。

- 逆行性輸送：初期エンドソームからゴルジ体への物質輸送（積荷のリサイクル）
- リサイクリング輸送：初期エンドソームから細胞膜への膜結合型受容体などの輸送
- リソゾームへの輸送：後期エンドソーム・リソゾームへの物質輸送（分解経路）
- エンドソームの fission（分離）：エンドソームの一部を積荷ごと切り離す。
- リソゾーム酵素の輸送：加水分解酵素をリソゾームに輸送する。
- ミトコンドリアの恒常性維持：ミトコンドリア分離・融合の調節。
- オートファジーの制御：オートファジー関連因子 ATG9A、LIMP2a の輸送。



我々は世界に先駆けて PARK17 患者由来 iPS 細胞を樹立し、ドパミンニューロンなど神経系細胞に分化誘導して細胞内輸送障害の解析を行った。VPS35 変異疾患 iPS 細胞由来ニューロンの解析により、ドパミンニューロンの細胞死をはじめ、以下の形質が観察

された (Bono K. et al. *Mol Brain* 2020)。

エンドソーム輸送障害：レトロマーによって輸送される Ra5a 陽性初期エンドソームおよび Rab7a 後期エンドソームの神経突起内移動速度が低下しており、細胞内物質輸送の障害が明らかになった。

初期、後期エンドソームの fission (分離) および fusion (融合) の障害：エンドソームの一部が出芽しチューブ状に伸びたところを、レトロマーと WASH complex が切断し小胞を分離する (fission) 頻度が低下していた。

リソゾーム加水分解酵素の輸送障害か？：正常細胞では CI-MPR を含む小胞が細胞質に広く分布するが、PARK17 細胞では細胞質における分布が減少し、トランスゴルジネットワーク (TGN) 周囲にのみ集積していた。これは CI-MPR 含有小胞 (リソゾーム酵素) の輸送障害の可能性を示唆している。

PARK17 ドパミンニューロンに α -シヌクレインが蓄積：健常対照群と比較して TH 陽性ドパミンニューロンでは有意に蓄積量が増加していた。

ドパミンニューロン特異的な細胞死： PARK17 ドパミンニューロンではアポトーシスが亢進していたが、MAP2 陽性全ニューロンで比較すると健常群と有意差がなかった。

VPS35 (D620N) を HeLa 細胞に強制発現するとオートファジーの阻害が起こることは以前に報告されている (Zavodszky et al. *Nat Commun.* 2014)。VPS35 変異 PD モデル細胞においても、”古典的”オートファゴソーム成熟障害 (Rahman, et al. *Neurosci.* 2020) やマイトファジー障害 (Hanss, et al. *Mov. Disord.* 2020) が生じることが明らかにされてきた。しかし、古典的オートファジー活性を上昇させるラパマイシンは、オートファジー基質タンパク質 (p62) のクリアランスを改善したものの、マイトファジーを活性化できずミトコンドリア障害は改善しないとされている (Kucera et al. *Traffic.* 2016)。これらの報告から、VPS35 変異は古典的オートファジーに影響を及ぼすものの、その障害は神経細胞死に繋がる機序には関与しない可能性が示唆された。近年、古典的オートファジーよりも、新規オートファジーが主にマイトファジーを担っていることが報告された (Shimizu et al. *Mol and Cells.* 2018)。さらに興味深いことに、エストロゲンが Rab9 依存的新規オートファジー (マイトファジー) を活性化することが示された (Sasaki Y et al. *J Am Heart Assoc.* 2021)。本研究では、VPS35 変異が新規オートファジー障害を引き起こすのかという問いを追求することにより、PARK17 の病態経路の根幹を明らかにする。

2 . 研究の目的

本研究は、家族性パーキンソン病の患者由来 iPS 細胞を利用して疾患の根幹病態を解明し、薬剤による治療介入の可能性を検証することを目的とする。レトロマーの生理機能から考察して、細胞にとって最も基本的な恒常性維持機構である細胞内輸送の障害が、二次的にリソゾーム、ミトコンドリア、オートファジーの機能不全を引き起こす可能性が考えられ、細胞内小胞輸送を司るレトロマーの機能に注目したパーキンソン病の根幹病態の研究が必要である。本研究ではレトロマー機能異常のパーキンソン病発症への寄与メカニズム、パーキンソン病の病態との関連が強く疑われるオートファジー制御の異常とミトコンドリアの恒常性維持機構について詳細に解析する。特に、PARK17 患者 iPS 細胞由来ニューロンの解析で Rab9 依存的新規オートファジーの障害を強く疑わせる知

見が得られている。またエストロゲンが PD モデル細胞のオートファジー障害を是正し細胞死を抑制する可能性が強く示唆されており、さらに詳細な検討が必要である

神経変性疾患の病態解明にはヒトニューロンでの解析が必要不可欠であり、患者由来 iPS 細胞の研究を進め意義は大きい。病理所見を一部反映する細胞モデルを利用することにより異常形質を細胞生物学的に定量評価し、その是正を指標に創薬プラットフォームとして利用することが可能であり、新薬開発を加速する発展が期待できる。

3. 研究の方法

1. VPS35 変異細胞におけるオートファジー障害の検証

PARK17 において ATG5 依存的(古典的)オートファジーおよび ATG5/ATG7 非依存的・Rab9 依存的オートファジー(新規)の障害があるかを明らかにするため、野生型または D620N 変異を持つ VPS35 遺伝子を安定発現する Atg5 ノックアウトマウス線維芽細胞 (MEF Atg5 $-/-$)を作成し、オートファゴソーム形成を観察する。また mCherry-GFP-Rab9 レポータ(酸性環境では GFP 蛍光が失われ mCherry 蛍光のみとなる: Rab9 を含む小胞とリソソームの融合を生細胞でイメージングできる) Cyto-ID により VPS35 変異による新規オートファジー過程における障害メカニズムを明らかにする。

2. エストロゲンの新規オートファジー活性化作用の解析

エストロゲンはパーキンソン病の発症・進行抑止作用があることが複数の臨床研究で明らかにされているが、その機序は解明されていない。エストロゲンが新規オートファジー促進効果を持つという既報告に注目し、D620N 変異 VPS35 遺伝子を安定発現した MEF Atg5 $-/-$ における新規オートファジー障害がエストロゲン投与によって改善するか検証する。

また PARK17 ドパミンニューロンにエストロゲンを添加し、 α シヌクレイン蓄積抑制、細胞死抑制作用が ATG5、ATG7、もしくは Rab9 の抑制下でも起こるか検討する。

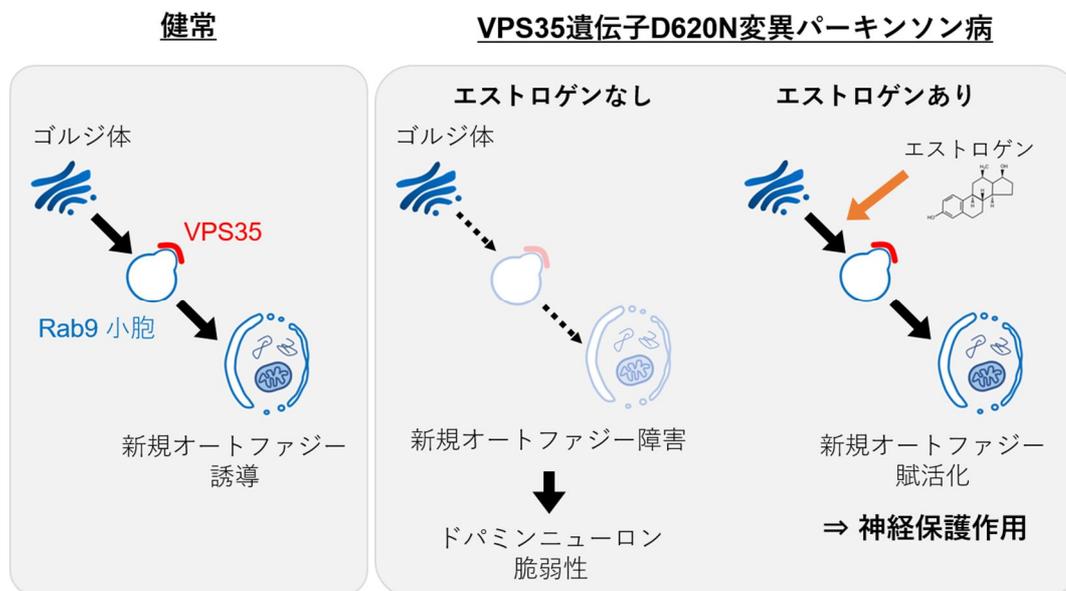
3. PARK17 ドパミンニューロンにおけるミトコンドリア機能の検討

PARK17 ドパミンニューロンを創薬プラットフォームとして活用するために、ドパミンニューロンの細胞死に直接影響すると考えられるミトコンドリア機能の検討(膜電位測定)を行う。エストロゲンの神経保護作用がマイトファジー (Mitophagy Dye で検出)を改善するか検討する。

4. 研究成果

野生型 VPS35 もしくは D620N 変異型 VPS35 を発現する細胞において、細胞が飢餓状態下におかれた時、変異群では健常群と比較して Rab9 を含む小胞との相互作用が優位に低下し、リソソームとの共局在が減少することがわかった。さらに ATG5 の発現を抑制すると Rab9 のリソソームへの取り込みが変異型 VPS35 群で顕著に減少することを示した。これにより VPS35 が何らかのメカニズムで Rab9 を介した新規オートファジー制御に関与していることが強く示唆された。そこで、変異型 VPS35 の細胞内小胞輸送およびオートファジーへの影響について、ヒト iPS 細胞から誘導したニューロンを用いて検証した。PARK17 患者由来 iPS 細胞および健常コントロール iPS 細胞からニューロンを分化誘導し、Cyto-ID 添加によりオートファジーを検出して調べたところ、疾患群・健常コントロール群間で差がなかった。そこで siRNA により ATG5 をノックダウンし conventional オートファジーを特異的に抑制すると疾患群で有意にオートファジーが低下し、エストロゲンを添加すると回復することがわかった。しかし、エストロゲンは健常コントロール群のオートファジーには影響しなかった。これらの結果から、変異型

VPS35は新規オートファジーを抑制することが強く示唆された。さらに、疾患群において Rab9 と ATG5 の両方をロックダウンすると、エストロゲン添加によるオートファジーの回復が阻害されることがわかった。また健康コントロール群においても、Rab9 と ATG5 の両方をロックダウンすると疾患群と同様にエストロゲン不応性にオートファジーが抑制されることが示された。これらの結果から、VPS35 遺伝子変異により新規オートファジーが抑制され、エストロゲンは Rab9 依存的に新規オートファジーを促進することが示された。我々はこれまでに VPS35 D620N 変異ドパミンニューロンにおける脆弱性や α シヌクレインの蓄積を報告しているが、本研究においてエストロゲンの投与が変異群ドパミンニューロンの細胞死を抑制し、 α シヌクレイン蓄積を改善することを示した。さらに、これらのエストロゲンの作用は、古典的オートファジーに關与する ATG5 の発現抑制に影響されない一方、Rab9 や Wipi3 といった新規オートファジーに必須のタンパク質の発現抑制により改善効果が失われることが示された。本研究の成果は、これまで明らかにされてきたパーキンソン病におけるエストロゲンの疾患修飾作用における新規オートファジーの關与を証明するものである (Shiraishi T. et al. *Cell Mol Life Sci.* 2024)。



新規オートファジーは、トランスゴルジ体から発生したオートファゴソームを起点とし、Rab9 や Dram1、Wipi3 などのタンパク質が機構制御に関わるなど、古典的オートファジーとは異なる機構を持つ。また、ATG5、ATG7、ATG9、LC3 などの古典的オートファジーに必須である一部のタンパク質は、新規オートファジーに關与しないことも明らかになっている。本研究では、VPS35 D620N 変異を有する神経細胞をパーキンソン病モデルとして用い、同変異が Rab9 依存性の新規オートファジー障害を引き起こし、新規オートファジーの活性化作用を持つエストロゲンが VPS35 D620N 患者由来ニューロンに対する神経保護作用を持つことを発見した。これまで、古典的オートファジーを標的としたパーキンソン病治療が試みられてきたが、本研究結果から新規オートファジーの重要性も明らかになったため、今後の治療薬開発の幅が広がることが期待される。しかし、古典的オートファジーと比較すると新規オートファジーに關与するタンパク質群や分解される基質、両者のオートファジー機序の細胞内での役割の違いなどについて未解明な部分が多く、今後の研究の発展のためには新規オートファジー自体の研究発展が欠かせない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Simon Christopher, Soga Tomoko, Okano Hiroataka James, Parhar Ishwar	4. 巻 11
2. 論文標題 -Synuclein-mediated neurodegeneration in Dementia with Lewy bodies: the pathobiology of a paradox	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell & Bioscience	6. 最初と最後の頁 196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13578-021-00709-y	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 Shiraishi Tomotaka, Bono Keiko, Hiraki Hiromi, Manome Yoko, Oka Hisayoshi, Iguchi Yasuyuki, Okano Hiroataka James	4. 巻 81
2. 論文標題 The impact of VPS35 D620N mutation on alternative autophagy and its reversal by estrogen in Parkinson's disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-024-05123-4	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡野ジェイムス洋尚
2. 発表標題 iPS細胞技術を利用した難治性神経疾患の病態・創薬研究
3. 学会等名 第1回包括的がん緩和病態生理医療薬学研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡野ジェイムス洋尚
2. 発表標題 iPS細胞技術を利用した神経再生戦略と創薬研究
3. 学会等名 第59回日本神経眼科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡野ジェイムス洋尚
2. 発表標題 iPS細胞技術を利用した疾患モデリングと再生・創薬研究への展開
3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------