

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830055

研究課題名(和文)パーキンソン病患者由来 iPS より誘導したドパミン神経特異的障害の多角的解析

研究課題名(英文) Multiple analysis of intracellular responses in intractable disease related to dopaminergic neuron vulnerability with the use of Parkinson's Disease specific iPS cells

研究代表者

葛巻 直子 (Kuzumaki, Naoko)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10507669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、パーキンソン病(PD)発症に繋がる器質的な変化の抽出を目的とし、ヒト疾患特異的iPS細胞技術を用いて、メタボローム解析を中心としたマルチオミクス解析を試みた。本研究では、パーキンソン病患者iPS細胞由来ドパミン神経細胞において、メタボローム解析を行ったところ、種々の代謝経路に変動が認められた。特に、エピジェネティクス制御と関連性の強い代謝物質の産生が亢進していることが明らかとなった。以上の結果より、PD病態においてエネルギー代謝変動に関連したエピゲノム変化が起きている可能性が推察され、新たな病態の理解に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, iPSCs were generated from two Parkinson's patients and two control subjects. All of the clones differentiated into neurons included tyrosine hydroxylase-positive neurons. Under the present condition, I found differences in gene expression between control and patients. Among those, the expression level of PGC-1^α, which plays a key role in mitochondrial biogenesis and energy metabolism, in Parkinson's specific-iPS cell (PD-iPSCs)-derived dopaminergic (DA) neurons was significantly lower than that in control. Using CE-MS-system, I found the change in the expression of several metabolites in glycolysis and glutathione metabolism pathways in DA neuron-derived from PD-iPSCs. Interestingly, the expression of S-adenosylmethionone, which can lead to methylation of DNA, was significantly increased in PD-iPSCs-derived DA neurons. These findings suggest that metabolic abnormality in DA neurons could lead to neuronal dysfunction in PD.

研究分野：神経科学

キーワード：iPS細胞 パーキンソン病 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病を始めとする疾患研究においてゲノム解析は著しく進んでいるため、疾患の原因となる関連遺伝子の同定は進んでいる。しかしながら、その細胞生物学的あるいは生化学的な病態解析は、患者ならびに正常人からの病変に関するサンプル生検の困難さから、これまで HeLa 細胞などの非神経系の培養株化細胞への原因遺伝子の強制発現や、原因遺伝子のノックアウトマウスを用いた解析が主体であった。しかしながら、*PARKIN* ノックアウトマウスにおいてパーキンソン病が発症しないことから明らかのように、これらの解析が必ずしも病態を反映しているとは限らない。また、死後脳を用いた解析は勿論重要であるが、発症初期あるいは発症前の細胞生物学的、生化学的变化をとらえることは出来ない。一方、疾患特異的 iPS 細胞の実現は、特に様々な構成細胞を有する神経系においては、これまで患者の成体内で起きていた現象を生体外で再現する唯一の手段であると言っても過言では無い。こうしたことから、パーキンソン病患者より、iPS 細胞を樹立し、目的の細胞に分化誘導を行い、その解析を行うことは、パーキンソン病の本態に迫ることができる非常に重要なアプローチであると考えられる。また、このようなメカニズム解析から、新しい治療法の開発にも繋がる。

2. 研究の目的

パーキンソン病は、神経変性疾患としてはアルツハイマー病に次いで頻度が高く、60 歳以上の高齢者において 1 %程度の頻度であり、高齢化とともに患者数の急増が予想される。パーキンソン病患者の 90% 以上は家族歴が明らかでない孤発性であり、5-10% は家族性である。家族性パーキンソン病については、家系に関する連鎖解析により、 α -synuclein (SNCA)、*PARKIN* (PARK2)、*PINK1* (PARK6)、*DJI* ならびに *LRRK2* (PARK8) などが原因遺伝子として報告されている。これら原因遺伝子の機能解析により、 α -synuclein タンパクの過剰発現・病的蓄積、ミトコンドリアの機能障害、ユビキチン・プロテアソーム系の障害、酸化ストレスなどが孤発性パーキンソン病とも共通する病態機序として推測され、病態解明・治療法開発に向けた研究が行われている。一方、申請者らは家族性パーキンソン病のうち、常染色体劣性遺伝によってパーキンソン病を発症することが明らかとなっている *PARKIN* (PARK2) 遺伝子に変異の認められる家系の患者より得た皮膚線維芽細胞より、iPS 細胞の樹立に成功している。さらに、*PARK2* iPS 細胞より、神経分化誘導を行ったところ、*PARK2* 変異 iPS 細胞より誘導した神経細胞において、ミトコンドリアの形態異常が認められ、酸化ストレスが亢進して

いることと明らかとした。しかしながら、これまでの検討により、患者のフェノタイプを反映する iPS 細胞ならびに iPS 細胞由来神経細胞へ誘導することには成功しているものの、家族性ならびに孤発性パーキンソン病に共通して認められる主な病変部である中脳ドパミン神経をターゲットとした、パーキンソン病の本態に迫る研究には至っていない。そこで、本研究では、パーキンソン病発症に繋がる器質的な変化の抽出を目的とし、ヒト疾患特異的 iPS 細胞技術を用いて、疾患感受性細胞であるドパミン神経細胞に誘導を行い、メタボローム解析を中心としたマルチオミクス解析を試みた。

3. 研究方法

本研究課題のヒト疾患特異的 iPS 細胞の使用ならびに解析に関して、慶應義塾大学医学部の倫理委員会の承認に準じて、星薬科大学倫理委員会の承認を得て研究を遂行している。健常者由来 iPS 細胞として、201B7 ならびに WD39 を用いた。また、*Parkin* に変異の認められる家族性パーキンソン病 (PARK2) 患者由来 iPS 細胞として、PA ならびに PB を用いた。iPS 細胞を、TrypLE select 処理にてシングルセルに分離し、FGF8b ならびに Shh を含む MHM+B27 培地にて 12 日間浮遊培養することによりドパミン神経前駆細胞を含む神経幹細胞の誘導を行った。神経幹細胞の継代は、TrypLE select 処理にて行い、実験には、3-5 継代 (36 日-60 日培養後) の神経幹細胞を使用した。ドパミン神経細胞への分化誘導は、poly-ornithine ならびに fibronectin コーティング後のディッシュに細胞を播種し、BDNF をはじめとする栄養因子を添加した MHM+B27 培地を用いて 10 日間接着培養した。cDNA マイクロアレイは、Affimetrix 社の GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて遺伝子発現の網羅的解析を行なった。また、網羅的なメタボローム解析に関しては、定量性の高い CE-MS を用いて、iPS 細胞由来ドパミン神経細胞における代謝変動について検討を行った。

4. 研究成果

まず、cDNA マイクロアレイ法に従い、健常者ならびにパーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞における遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、両群間において大きな遺伝子発現変動が認められ、なかでも、パーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞において、代謝やミトコンドリアの産生に重要な *PGC1 α* mRNA の著明な発現低下が認められた。また、ドパミン神経細胞の代謝系の変化について、CE-MS を用いて、網羅的なメタボローム解析を行ったところ、パーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞において、種々の代謝経路に変動が認められた。特に、エピジェネティクス制御と関連性の強い代謝物質の産生が亢進していることが明らかとなった。そこで、*PGC1 α*

転写開始点直上における DNA メチル化の解析を行ったところ、パーキンソン病患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞において、DNA メチル化の亢進が認められた。以上の結果より、PD 病態においてエネルギー代謝変動に関連したエピゲノム変化が起きている可能性が推察され、新たな病態の理解の提案に繋がると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain.: Yamashita A, Hamada A, Suhara Y, Kawabe R, Yanase M, Kuzumaki N, Narita M, Matsui R, Okano H, Narita M. Synapse., 8, 235-247 (2014). doi なし: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24488840> 査読有り
2. Changes in circadian rhythm for mRNA expression of melatonin 1A and 1B receptors in the hypothalamus under a neuropathic pain-like state.: Odo M, Koh K, Takada T, Yamashita A, Narita M, Kuzumaki N, Ikegami D, Sakai H, Iseki M, Inada E, Narita M. Synapse., 68(4):153-8 (2014). doi なし: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24382790> 査読有り
3. κ -Opioids inhibit tumor angiogenesis by suppressing VEGF signaling.: Yamamizu K, Furuta S, Hamada Y, Yamashita A, Kuzumaki N, Narita M, Doi K, Katayama S, Nagase H, Yamashita JK, Narita M. Sci Rep., 3:3213 (2013). doi: 10.1038/srep03213. 査読有り
4. Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain.: Imai S, Ikegami D, Yamashita A, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura

A, Araki A, Omi K, Nakamura M, James Okano H, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T, Narita M. Brain., 136 (Pt 3):828-843 (2013) doi: 10.1093/brain/aww330. Epub 2013 Jan 30. 査読有り

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 次世代型”包括的がん緩和医療”への取り組み-抗がん剤による耐性獲得およびがん増悪化の分子理解, 葛巻直子, 成田道子, 池上大悟, 成田年, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25 日-28 日, 神戸
2. ヒト疾患特異的 iPS 細胞技術を用いたドパミン神経依存性難治性疾患における細胞内応答の多角的解析, 葛巻直子, 岡野栄之, 服部信孝, 成田年, 第 89 回日本薬理学会年会, 2015 年 3 月 18 日-21 日, 名古屋
3. Parkinson 病患者由来 iPS 細胞から分化誘導した神経細胞にみられる特異的な細胞エネルギー代謝異常とドパミン代謝変動, 須田雪明, 葛巻直子, 岩澤千鶴, 松尾美里, 成田道子, 末松誠, 服部信孝, 岡野栄之, 成田年, 第 44 回日本神経精神薬理学会, 2014 年 11 月 20-22 日, 名古屋
4. 抗がん剤耐性獲得ヒト非小細胞肺癌細胞の形質転換に伴う増悪化機構の解析, 葛巻直子, 第 8 回日本緩和医療薬学会年会, 2014 年 10 月 3-5 日, 愛媛
5. パーキンソン病患者 iPS 細胞由来神経細胞におけるドパミン受容体の発現変化の解析, 葛巻直子, 須田雪明, 成田道子, 岩澤千鶴, 松尾美里, 赤松和土, 服部信孝, 岡野栄之, 成田年, 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日, 横浜
6. Parkinson 病患者 iPS 細胞由来神経細胞における代謝変動の解析, 岩澤千鶴, 葛巻直子, 須田雪明, 松尾美里, 成田道子, 池上大悟, 五十嵐勝秀, 末松誠, 服部

- 信孝, 岡野栄之, 成田 年, 2014 年 7 月 5 日, 星薬大、第 130 回日本薬理学会関東部会
7. Parkinson 病患者 iPSC 細胞由来神経細胞における Parkin-PGC-1 α 経路の障害, 須田雪明, 葛巻直子, 岩澤千鶴, 松尾美里, 森田加奈, 成田道子, 池上大悟, 五十嵐勝秀, 末松 誠, 服部信孝, 岡野栄之, 成田 年, 2014 年 7 月 5 日, 星薬大、第 130 回日本薬理学会関東部会
 8. 多能性幹細胞の分化指向性におけるオピオイドの役割, 葛巻直子, 山水康平, 岡野栄之, 成田 年, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19-21 日, 仙台
 9. Analyses of metabolic dynamics in iPSC-derived neurons from patient with familial Parkinson's disease, Naoko Kuzumaki, Yoichi Imaizumi, Wado Akamatsu, Yohei Okada, Nana Izawa, Takuya Matsumoto, Takako Hishiki, Yukari Suda, Minoru Narita, Makoto Suematsu, Nobutaka Hattori and Hideyuki Okano, Neuroscience2013, Nov. 9-13, San Diego, California
 10. パーキンソン病患者 iPSC 細胞由来神経細胞における酸化ストレス応答ならびに代謝動態の解析, 葛巻直子, 今泉陽一、赤松和土、岡田洋平、伊澤奈々、松本拓也、菱木貴子、長畑善子、須田雪明、成田年、末松誠、服部信孝、岡野栄之、第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日-23 日, 京都
 11. Role of opioid system in the cell differentiation from pluripotent stem cells, Naoko Kuzumaki, Kohei Yamamizu, Michiko Narita, Hideyuki Okano and Minoru Narita, International Narcotics Research Conference 2013 meeting, July 14-19, Cairns
 12. Analyses of oxidative stress and metabolic

dynamics in PARK2 iPSC-derived neurons, Naoko Kuzumaki, Yoichi Imaizumi, Wado Akamatsu, Yohei Okada, Nana Izawa, Takuya Matsumoto, Takako Hishiki, Yoshiko Nagahata, Yukari Suda, Minoru Narita, Makoto Suematsu, Nobutaka Hattori and Hideyuki Okano, International society for stem cell research 11th annual meeting, 2013 June12-15, Boston

〔図書〕(計 1 件)

1. がん疼痛緩和ケア, 葛巻直子, じほう, 2014, p.41-46

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
 特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

葛巻 直子 (KUZUMAKI, Naoko)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号： 10507669