

201432021A

厚生労働科学研究委託費

再生医療実用化研究事業

iPS細胞を用いたパーキンソン病の新規創薬システムの開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 服部 信孝

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の再生医療実用化研究委託事業による委託業務として、服部信孝が実施した平成26年度「iPS細胞を用いたパーキンソン病の新規創薬システムの開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）

iPS細胞を用いたパーキンソン病の新規創薬システムの開発

服部信孝	1
------	---

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. ヒトiPS細胞を小スケール・ハイスループットに分化誘導する誘導法の確立に関する研究

赤松和土	4
------	---

2. MPP+添加型パーキンソン病モデル細胞の網羅的代謝産物解析

斉木臣二	6
------	---

3. 高純度なパーキンソン病疾患感受性細胞（ドパミンニューロン）の誘導方法の確立

石川景一	8
------	---

4. 小スケール・ハイスループットに分化誘導したPD患者由来ニューロンを用いた化合物/創薬シーズ添加による薬効評価・分子薬理作用の検証

井本正哉	10
------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷

	12
--	----

I. 委託業務成果報告（総括項目）

iPS 細胞を用いたパーキンソン病の新規創薬システムの開発

業務主任者： 服部信孝 順天堂大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

既に樹立した iPS 細胞（PARK2/6/9）の中で、平成 26 年度は PARK9-iPS 細胞由来ドパミン神経細胞の表現型解析を進め、PARK9 遺伝子産物 ATP13A2 の機能不全によるリソソーム機能低下を確認した。さらに PARK6（原因遺伝子 *PINK1*）モデルである *PINK1* ノックアウト線維芽細胞を用いたミトコンドリア機能の呼吸鎖の詳細な評価を行い、呼吸鎖 I/III の低下を報告した (*Neurosci Lett*, 2014)。これらは PARK6-iPS 細胞モデル細胞を創薬スクリーニングに用いる際の評価系の検証に有用と考えられる。さらに新たな遺伝性 PD 原因遺伝子として *CHCHD2* を同定し報告し (*Lancet Neurol*, 2015)、同変異患者より iPS 細胞樹立を 2 ライン確立し、解析に向けて準備を進めている。

創薬スクリーニング指標の確立についても研究グループ内で検討を進め、分担者赤松・石川によりイメージングサイトメーター（InCellAnalyzer 6000）を用いて神経突起伸長を指標とする高速・大規模なアッセイシステムの確立が進行している。分担者齊木は PD モデル細胞上清の代謝産物から薬剤スクリーニングに適した指標の網羅的検索を行っており、幾つかの候補を挙げることが出来た。また井本は培養細胞 PD モデルを用いて異常蛋白凝集クリアランスを上昇させる化合物を同定した。

以上のように、平成 26 年度は本格的な iPS 細胞を用いた化合物スクリーニングに備えた background data の収集を効率的に進めることが出来た。

A. 研究目的

既報告のない、家族性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を作製し病態を解析するとともに、同解析に有用なアッセイシステムを確立すべく旧来の培養細胞系での病態に基づくバックグラウンドデータを確立することを目的とする。

B. 研究方法

I. 新規家族性 PD 患者由来 iPS 細胞ラインの樹立

①PARK9 患者由来 iPS 細胞ライン

PARK9 患者 1 症例より同意取得後に末梢血液よりリンパ球を回収し、山中 4 因子を導入し、iPS 細胞を樹立した。

②責任遺伝子 *CHCHD2* に病変変異を持つ患者由来 iPS 細胞ライン

CHCHD2 病変変異を持つ患者 1 症例より同意取得後に皮膚線維芽細胞を樹立し、山中 4 因子を導入して iPS 細胞を樹立した。

③PINK1 ノックアウトマウス由来胚性線維芽細胞におけるミトコンドリア呼吸機能評価

既に我々が作製した PINK1^{-/-} マウス線維芽細胞(MEFs)およびそのコントロールラインを培養し、ミトコンドリア呼吸鎖のアッセムブリーを blue native PAGE 並びに各種化合物添加状態での酸素消費量評価などにより、同細胞ラインの詳細な評価を行った。

II. I-①、I-②で樹立した iPS 細胞からの神経細胞分化誘導・病態解析

Iにて樹立した iPS 細胞を連続的に適切な培養環境に置き、神経細胞に分化誘導後、a)ミトコンドリア毒への反応性、b)リソソーム水解酵素阻害薬への反応性、c)フラックスアナライザーを用いたミトコンドリア機能の評価、以上を施行した。

(倫理面への配慮)

平成 18 年 9 月 1 日に施行された厚生科学審議会科学技術部会「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」および平成 22 年 11 月 1 日に告示・施行された改正指針に則り準拠し、実験を行った。全ての遺伝子組み換え実験についても順天堂大学倫理委員会により承認済みであった。

C. 研究結果

I-① 樹立された iPS 細胞コロニーを pick up し、未分化マーカー発現量や神経細胞分化能および導入遺伝子の残存などから解析に用いる 3 クローンを決定した。

I-② 樹立された iPS 細胞コロニーを pick up し、未分化マーカー発現量や神経細胞分化能および導入遺伝子の残存などから解析に用いる 2 クローンを決定した。

I-③ 以前 PINK1 欠乏はミトコンドリア膜電位の低下を来すが、プロトンリークの原因とはならないことを報告した (*Neurobiol Dis* 41: 111-8, 2011)。本研究では呼吸鎖についての詳細な検討を行い、Complex I/III の機能低下を呈することを証明した。

II. PARK9、CHCHD2 関連性 PD とともに選定した iPS 細胞は正常対照 iPS 細胞と同等に神経細胞分化が可能であることを確認した。PARK9 に関しては神経細胞分化後の軸索長、リソソーム異常による異常蛋白質の蓄積を検討中である。CHCHD2 関連性 PD に関しては神経細胞死誘導を検討中である。マウス線維芽細胞を用いた結果からヒト細胞におけるフラックスアナライザーを用いた解析の条件検討を行い、至適培地および培養条件が確定したため、今後は安定的に解析可能になると思われる。

D. 考察

世界的にも希少な家族性パーキンソン病患者 2 例 (PARK9、CHCHD2 関連性 PD) から iPS 細胞を樹立し、神経細胞分化できることを確認した。今後はドパミン神経特異的な神経分化誘導を行うことにより、症例想定される病態に即した、より高精度かつ簡易なアッセイ系を確立し、創薬スクリーニングへの応用を目指す。

E. 結論

世界的にも希少な家族性パーキンソン病患者 2 例 (PARK9、CHCHD2 関連性 PD) から iPS 細胞を樹立し、病態に即したアッセイ系を開発する環境が整った。平行して PARK2 など従来樹立した PD-iPS 細胞を用いて、創薬スクリーニングを効率的に行う方法を当研究グループ内で確立しつつある。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohny RP, Hattori N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by

metabolomics technologies. *J Neurol*

Neurosurg Psychiat. (in press)

2. Amo T, Saiki S, Sawayama T, Sato S, Hattori N. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. *Neurosci Lett* 580: 37-40, 2014

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. ヒト iPS 細胞を小スケール・ハイスループットに分化誘導する誘導法の確立と PD 表現型の定量方法の確立

担当責任者： 赤松和土 順天堂大学大学院医学研究科 特任教授

研究要旨

既に 96-well プレート上で iPS 細胞を神経分化させイメージングサイトメーターを用いて高速に表現型を神経突起進展・細胞死の観点から定量することに成功していたが、平成 26 年度は本技術を複数の iPS 細胞株で検証し、安定した検出系であることを確認した。本成果は赤松が長年開発を進めてきた iPS 細胞由来神経細胞を用いたハイスループット化合物スクリーニングシステムに大きな貢献をするものと期待される。

A. 研究目的

High-throughput な創薬スクリーニングシステムは効率的な創薬シーズ同定には不可欠である。本研究では、平成 26 年 10 月までに確立したイメージングサイトメーターを用いた高速定量法の汎用性を複数の iPS 細胞株で確認することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. 96-well plate での iPS 細胞の分化誘導

本事業開始までに確立していた 96-well plate 上での神経分化誘導法の改良を行った。

2. イメージングサイトメーターを用いた定量評価

家族性パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を 1 の方法で分化誘導し、96-well plate 上でイメージングサイトメーター(InCellAnalyzer 6000)を用いて、①神経細胞突起長、②細胞死誘導率をより定量的に評価できるプロトコルの開発を行った。

（倫理面への配慮）

平成 18 年 9 月 1 日に施行された厚生科学審議会科学技術部会「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する

指針」および平成 22 年 11 月 1 日に告示・施行された改正指針に則り準拠し、実験を行った。

C. 研究結果

1.神経分化誘導法に関しては小分子化合物の併用により、96well プレート上で従来法よりも安定した神経分化方法を確立した。

2.イメージングサイトメーターの使用により、分化誘導から 14 日以内で定量的に細胞突起進展・細胞死を評価するプロトコルを確立した。

D. 考察

今回開発した方法は PD 以外の神経疾患である ALS の研究においても汎用性があることを別の研究計画で示している。今後の課題としては、より病態に即したオートファジー異常やミトコンドリア機能異常・シヌクレイン蓄積などを小スケールで検出する方法を確立し、様々な細胞生物学的病因を持つパーキンソン病の創薬に応用可能な方法を確立していく。

E. 結論

汎用性の高い細胞死や細胞突起進展異常を iPS 細胞由来神経細胞で検出する方法を確立した。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T. Utility of Scalp Hair Follicles as a Novel Source of Biomarker Genes for Psychiatric Illnesses. Biol Psychiatry. [Epub ahead of print] 2014

2. 学会発表

1. 赤松 和土：招待講演：第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会 「精神疾患の解析を目指した疾患 iPS 細胞技術の開発」 2014 年 11 月 21 日 名古屋
2. 赤松 和土：招待講演：第 24 回日本臨床精神神経薬理学会・第 44 回日本神経精神薬理学会合同年会 「iPS 細胞技術を用いた神経疾患・発達障害研究」 2014 年 11 月 22 日 名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. MPP+添加型パーキンソン病モデル細胞の網羅的代謝産物解析

担当責任者： 斉木臣二 順天堂大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

PD 患者由来 iPS 細胞より樹立したドパミンニューロンを用いた創薬スクリーニングを行う際に、研究分担者赤松・石川らはイメージングサイトメーターを用いたハイスループットシステムの樹立を目指している。一方分担者斉木は、iPS 細胞培養上清中の質量分析器を用いた特定代謝産物測定による迅速大量スクリーニングの実現可能性を検討すべく、MPP+添加型 SH-SY5Y 細胞 (PD モデル細胞) 培養上清並びに細胞ライセートのキャピラリー電気泳動-質量分析(CE-TOFMS)を加え網羅的に評価し、創薬スクリーニング指標となる代謝産物の特定を試みた。本実験により、①細胞ライセート両者のミトコンドリア酸化的リン酸化回路の一般的な低下、AcCoA の増加 (carnitine 中間代謝産物の増大を認めないため、脂肪酸β酸化亢進は否定的)、②濃度依存的に培養上清中の choline が増加しており、細胞膜成分などに広く含まれる choline 関連物質の分解促進によるものと推察された。これら特定代謝産物は化合物スクリーニングの指標になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

PD-iPS 細胞由来神経細胞を用いたハイスループット化合物スクリーニングシステムに利用可能な細胞ライセートまたは培養上清中の代謝産物を特定すること。

B. 研究方法

I. 使用した細胞ライン・サンプル抽出

Glioblastoma 由来培養細胞である SH-SY5Y 細胞を 10 cm dish に播種し、翌日に retinoic acid を添加し、24 時間の分化誘導後に H₂O または MPP+ (0.3 mM、0.6 mM) を添加し、24 時間後に培養上清並びに細胞ライセートを得た (細胞ライセートは、RIPA バッファーを添加後、10 分間の 13000 rpm の遠心後、上清を採取した)。コントロール・低濃度 MPP+・高濃度 MPP+の細胞ライセート、培養上清をそれぞれ 3 サンプルずつ準備し測定した。

II. 使用した CE-TOFMS (キャピラリー電気泳動-質量分析器) について

ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ社の CE-TOFMS を用いた網羅的解析セッ

ト”Advanced Scan”を施行し、一部化合物群については標準品との比較を経て絶対的濃度を算出するとともに、各サンプル間での変化量を相対的に定量した。同化合物群の代謝経路毎の変化量並びに連続的代謝変化を定量するため、Heatmap analysis を行った。

(倫理面への配慮)

培養細胞実験並びに遺伝子組み換え実験は全て順天堂大学倫理委員会に承認済みである。

C. 研究結果

以下にコントロール群と比較し、MPP+投与群において有意な変化を示したものを記載する。

1) 培養上清

a) TCA サイクル代謝産物

コントロールに比し有意な変化を大半の中間代謝産物で認めなかった。

b) 必須アミノ酸

glutamine を除く必須アミノ酸は概ね MPP+ 添加により上昇傾向を示した。細胞ライセートでも必須アミノ酸は概ね上昇していることから、オートファジーなどのタンパク分解システムが亢進している可能性が示唆された。

c) choline 代謝経路

GPCholine および Betaine はコントロール群と比較し著変は認めなかったが、choline が dose-dependent に上昇していた。同結果は choline 合成系の増大を示しているとは考えにくく、むしろ choline 含有化合物（細胞膜成分など）の分解促進によるものと推察された。

D. 考察

1) PD モデル細胞（MPP+ 添加型）では、MPP+ によるミトコンドリア酸化的リン酸化回路の機能低下により、TCA サイクル不全が生じていることを確認した。細胞ライセートを用いた本アッセイは、化合物スクリーニングの指標となることが示された。

2) 分解産物としての choline が培養上清中に上昇していることを確認した。同指標は dose-dependent manner を呈したことから、LC-MS によって簡便に測定するアッセイ系を確立すれば、ハイスループットの化合物スクリーニングシステム開発に繋がるものと期待された。

E. 結論

PD モデル細胞の特定代謝産物変化を同定することが出来た。本代謝経路の変化を PD-iPS 細胞由来神経細胞にて再確認を経て、化合物スクリーニング指標として利用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要： なし。

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohney RP, Hattori N. Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomics technologies. *J Neurol Neurosurg Psychiat.* (in press)
 2. Amo T, Saiki S, Sawayama T, Sato S, Hattori N. Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1. *Neurosci Lett* 580: 37-40, 2014
2. 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

3. 高純度なパーキンソン病疾患感受性細胞（ドパミンニューロン）の誘導方法の確立

担当責任者： 石川景一 順天堂大学大学院医学研究科 助教

研究要旨

従来の方法ではヒト iPS 細胞からのドパミンニューロン誘導効率は 5-15%程度であり、同時に大量に分化誘導を完遂することは困難であったが、汎用性の高い化合物スクリーニングシステムの樹立に高速・高純度のドパミンニューロン誘導が必須であることから、本年度には iPS 細胞に神経分化誘導時に加える種々の低分子化合物の濃度と時期を最適化することよりドパミンニューロン誘導効率改善を試みた。本研究により全細胞中で約 30-50%程度、ニューロンの中では約 60%以上にドパミンニューロン誘導効率を高めることに成功した。

本成果は、分担者赤松の成果と合わせ、96-well プレートなどを用いた十分なスケールでの化合物スクリーニングを施行できる礎になると期待される。

A. 研究目的

安価で高速な手法により iPS 細胞からのドパミン神経誘導効率を上昇させることを目的とする。

B. 研究方法

I. iPS 細胞からのドパミン細胞誘導

過去に作成済みの iPS 細胞から、Dual SMAD inhibition による神経分化誘導法をもとに、ニューロスフェア法を用いて分化誘導を行い、その後接着培養にて神経分化を行った。誘導時に中脳腹側化を行うための試薬（GSK-3B 阻害剤、sonic hedgehog、Purmorphamine、FGF-8 など）の添加するタイミングや濃度を検討した。

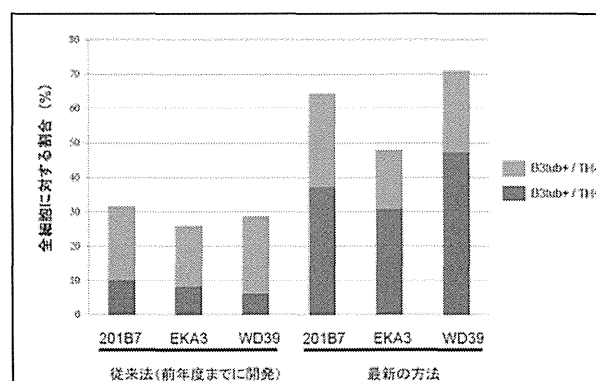
II. ドパミン細胞誘導効率の検定

接着培養 14 日後に 4%パラホルムアルデヒドで固定し、ドパミン神経マーカーとして tyrosine hydroxylase (TH)、神経細胞マーカーとして β III-tubulin (B3tub)を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡およびイメージングサイトメーター

(InCellAnalyzer 6000) を用いて作製したドパミン神経の誘導効率を検討した。

(倫理面への配慮)

平成 18 年 9 月 1 日に施行された厚生科学審議会科学技術部会「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」および平成 22 年 11 月 1 日に告示・施行された改正指針に則り準拠し、実験を行った。



C. 研究結果

各種誘導試薬の濃度および投与時期の最適化により、神経細胞誘導率を改善し、さらに神経細胞中のドパミン神経細胞の割合を 60%以上に高めることができた (図)。

D. 考察

本ドパミン細胞誘導法は既報告に比べて短期間に効率よくドパミン細胞を作製することができる。ドパミン細胞の脱落を特徴とするパーキンソン病

の病態解明や薬剤スクリーニングによる新規治療薬開発に寄与することが期待できる。

E. 結論

iPS細胞からのドパミン細胞誘導効率を大幅に改善することに成功した。

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

4. 小スケール・ハイスループットに分化誘導した PD 患者由来ニューロンを用いた化合物/創薬シーズ添加による薬効評価・分子薬理作用の検証

担当責任者： 井本正哉 慶應義塾大学理工学部 教授

研究要旨

NGFによって神経様細胞に分化させたラット副髄腎質褐色細胞腫 PC12D 細胞に MPP⁺を添加すると 24 時間後に細胞内に斑点形成が観察され、48 時間後に細胞死が観察される。この斑点は Thioflavin S で染色されることからタンパク質の凝集体であることがわかり、またパーキンソン病（以下 PD）においても凝集することが知られている α -synuclein と免疫染色により一致していた。このことから MPP⁺によって誘導される PC12D 細胞の斑点形成を PD 疾患モデル細胞系として、この斑点形成を阻害する化合物を in house の天然化合物ライブラリーおよび擬似糖ライブラリーからスクリーニングした。その結果、SO286 などの muco-イノシトール誘導体に目的の活性を見出した。

A. 研究目的

iPS 細胞由来 PD モデル神経細胞の前段階としての、PD 疾患モデル細胞系で治療薬リード化合物を取得する

B. 研究方法

MPP⁺によって誘導される PC12D 細胞の斑点形成を阻害する化合物を in house 化合物ライブラリーから探索する

C. 研究結果

MPP⁺によって誘導される PC12D 細胞の斑点形成を阻害する化合物として SO286 などの muco-イノシトール誘導体を同定した。またこれらの化合物はすでに形成された細胞内タンパク質凝集をクリアランスすることも分かった。

D. 考察

神経細胞内のタンパク質の凝集が PD の発祥と密接に関わっていることから SO286 などの muco-イノシトール誘導体は iPS 細胞由来 PD モデル神経細胞でも有効性を発揮することが期待できる

E. 結論

SO286 などの muco-イノシトール誘導体は PD 疾患モデル細胞系で凝集タンパク質をクリアランスする活性を有している

F. 健康危険情報

分担研究者報告書のため記載の必要なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Krajang A, Imoto M, Tashiro E, Fujimaki T, Shinjo S, Watanapokasin R. Apoptosis induction associated with the ER stress response through up-regulation of JNK in HeLa cells by gambogic acid. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:26, (2015)
2. Kiga M, Nakayama A, Shikata Y, Sasazawa Y, Murakami R, Nakanishi T, Tashiro E, Imoto M. SMK-17, a MEK1/2-specific inhibitor, selectively induces apoptosis in β -catenin-mutated tumors. *Scientific Report*. 5: 8155 (2015)

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

服部信孝 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Amo T, Saiki S, Sawayama T, Sato S, <u>Hattori N.</u>	Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1.	<i>Neurosci Lett</i>	580	37-40	2014
Hatano T, Saiki S, Okuzumi A, Mohney RP, <u>Hattori N.</u>	Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomics technologies.	<i>J Neurol Neurosurg Psychiat</i>	In press		2015

赤松和土 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C, Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, <u>Akamatsu W</u> , Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T.	Utility of Scalp Hair Follicles as a Novel Source of Biomarker Genes for Psychiatric Illnesses.	Biol Psychiatry.	Epub ahead of print		2014

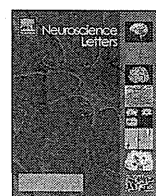
齊木臣二 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Amo T, <u>Saiki S</u> , Sawayama T, Sato S, Hattori N.	Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1.	<i>Neurosci Lett</i>	580	37-40	2014
Hatano T, <u>Saiki S</u> , Okuzumi A, Mohney RP, Hattori N.	Identification of novel biomarkers for Parkinson's disease by metabolomics technologies.	<i>J Neurol Neurosurg Psychiat</i>	In press		2015

井本正哉 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Krajarnng A, <u>Imoto M</u> , Tashiro E, Fujimaki T, Shinjo S, Watanapokasin R.	Apoptosis induction associated with the ER stress response through up-regulation of JNK in HeLa cells by gambogic acid.	<i>BMC Complementary and Alternative Medicine</i>	15	26	2015
Kiga M, Nakayama A, Shikata Y, Sasazawa Y, Murakami R, Nakanishi T, Tashiro E, <u>Imoto M</u> .	SMK-17, a MEK1/2-specific inhibitor, selectively induces apoptosis in β -catenin-mutated tumors.	<i>Scientific Report</i>	5	18155	2015

刷 別 物 行 刊



Detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects caused by loss of PINK1



Taku Amo^{a,*}, Shinji Saiki^b, Tadashi Sawayama^a, Shigeto Sato^b, Nobutaka Hattori^b

^a Department of Applied Chemistry, National Defense Academy, 1-10-20 Hashirimizu, Yokosuka 239-8686, Japan

^b Department of Neurology, Juntendo University School of Medicine, 2-1-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8421, Japan

HIGHLIGHTS

- Complete *PINK1* ablation causes mitochondrial dysfunction.
- Both complex I and complex III are defective in *PINK1*-deficient cells.
- Mitochondrial respiratory chain defects may be associated with PD pathogenesis.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2014

Received in revised form 10 July 2014

Accepted 25 July 2014

Available online 1 August 2014

Keywords:

Parkinson's disease

Mitochondria

PINK1

Respiratory chain

ABSTRACT

Mutations in *PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)* cause recessive forms of Parkinson's disease (PD). *PINK1* acts upstream of parkin, regulating mitochondrial elimination (mitophagy) in cultured cells treated with mitochondrial uncouplers that cause mitochondrial depolarization. *PINK1* loss-of-function decreases mitochondrial membrane potential, resulting in mitochondrial dysfunction, although the exact function of *PINK1* in mitochondria has not been fully elucidated. We have previously found that *PINK1* deficiency causes a decrease in mitochondrial membrane potential, which is not due to a proton leak, but to respiratory chain defects. Here, we examine mitochondrial respiratory chain defects in *PINK1*-deficient cells, and find both complex I and complex III are defective. These results suggest that mitochondrial respiratory chain defects may be associated with PD pathogenesis caused by mutations in the *PINK1* gene.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Mitochondrial dysfunction has been proposed as a major factor in sporadic and familial PD pathogenesis [1]. In the early 1980s, it was discovered that a neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), could inhibit mitochondrial complex I and cause parkinsonian symptoms in humans [17,20]. MPTP and other complex I inhibitors (e.g., rotenone), reproduce clinical features of PD in animals and are commonly used to model PD [5]. Moreover, complex I deficiency is frequently observed in the substantia nigra of PD patients at autopsy [12].

Mutations in the *parkin*, *PINK1* (PTEN-induced putative kinase 1), and *DJ-1* genes lead to autosomal recessive parkinsonism [1]. Although these gene products have not been fully characterized, they are strongly implicated in mitochondrial homeostasis [9]. *PINK1* contains an N-terminal mitochondrial targeting sequence and a serine/threonine kinase domain [28]. Loss of *PINK1* function induces increased vulnerability to various stresses [10,27]. Because parkin can rescue *PINK1* deficiency, but not vice versa, *PINK1* must act upstream of parkin in the same genetic pathway [8,25]. *PINK1* loss-of-function decreases mitochondrial membrane potential [7] and the *PINK1*-parkin pathway is associated with mitochondrial autophagy (mitophagy) in cultured cells treated with the mitochondrial uncoupler, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), which causes mitochondrial depolarization [19,24]. However, the exact function of *PINK1* in mitochondria has not been fully elucidated.

We have previously found that *PINK1* deficiency in cultured cells causes a decrease in mitochondrial membrane potential that is not due to a proton leak, but to respiratory chain defects [3]. Similar respiration defects are observed in *PINK1* knock-out mice [10] and

Abbreviations: BN-PAGE, blue native PAGE; CCCP, carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; mtDNA, mitochondrial DNA; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; PD, Parkinson's disease; *PINK1*, PTEN induced putative kinase 1.

* Corresponding author. Tel.: +81 46 841 3810; fax: +81 46 844 5901.

E-mail address: amo@nda.ac.jp (T. Amo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2014.07.045>

0304-3940/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

complex I deficiency is observed in *PINK1* mutant flies [22] and human fibroblasts from patients with *PINK1* mutations [13]. Interestingly, in flies, some *PINK1* mutant phenotypes are mimicked by downregulation of a complex I component and rescued by Ndi1p, a yeast NADH:ubiquinone oxidoreductase that can bypass complex I [29]. Most recently, it was reported that PINK1 is needed to maintain complex I activity via Ndufa10 phosphorylation [21]. Thus, as a respiration defect is a likely key event of PINK1 deficiency, here, we provide a detailed analysis of mitochondrial respiratory chain defects in our *PINK1*-deficient cell model.

2. Materials and methods

2.1. *PINK1* knock-out mouse embryonic fibroblasts (MEFs)

PINK1 knock-out MEFs were prepared and cultured as previously described [3,19]. Mitochondria were prepared from cultured MEFs as previously described [2].

2.2. Quantitative polymerase chain reaction (PCR) to estimate mitochondrial DNA copy number

Total DNA was prepared from cultured cells by incubating in a solution of 75 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, and 0.5 mg/mL proteinase K at 50 °C for 2 h. DNA was precipitated by adding of an equal volume of isopropanol, then pelleted by centrifugation, and dissolved in TE buffer. Mitochondrial DNA copy number was estimated by quantitative real-time PCR assays using the MyiQ2 Real Time PCR Detection System (Bio-Rad). The sequences of primers and probes were as follows: cytochrome c oxidase I gene (COX1, mitochondrial DNA): forward primer 5'-TGATCCATT-ATTTTCAGGCTTC-3', reverse primer 5'-ACTCCTACGAATATG-ATGGCGAA-3', probe 5'-CCCTAGATGACACATGAGCAAAAGCCCA-3'; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH, nuclear DNA): forward primer 5'-CATCACTGCCACCCAGAAGA-3', reverse primer 5'-ATGTTCTGGGCGAGCCCC-3', probe 5'-TGGATGG-CCCCTCTGAAAGCTG-3'.

2.3. Respiratory chain enzyme assays

Individual enzyme activities of complexes I, II, III, and IV were measured at 30 °C as previously described [4]. Complex I activity was measured by monitoring NADH oxidation at 340 nm (minus background of 425 nm). Rotenone (2 µg/mL) was used to confirm complex I-specific activity. Complex II activity was measured by monitoring 2,6-dichlorophenolindophenol reduction of at 600 nm. Complexes III and IV activities were measured by monitoring reduction or oxidation, respectively, of cytochrome c at 550 nm (minus background of 580 nm). Citrate synthase was assayed by monitoring 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) reduction at 412 nm, as previously described [15].

2.4. Blue native PAGE (BN-PAGE)

BN-PAGE was performed as previously described [30]. Mitochondria prepared from MEFs were solubilized with 1% *n*-dodecyl-β-D-maltoside or 1% digitonin and centrifuged at 20,000 × *g* for 10 min at 4 °C. Supernatants with Coomassie brilliant blue G-250 added (0.2% final concentration), were electrophoresed through 5–13% polyacrylamide gradient gels and were subjected to immunoblotting. Densitometry analysis was performed using ImageJ (NIH).

2.5. Antibodies

Antibodies used in this study as follows: anti-actin (clone C4, Millipore), anti-complex I subunit NDUFA9 (MS111, Mitosciences), anti-complex II subunit 70 kDa Fp (M204, Mitosciences), anti-complex III subunit Core I (MS303, Mitosciences), anti-complex IV subunit IV (MS408, Mitosciences), anti-ATP synthase subunit β (a gift from Dr. Ueno at Juntendo University, Tokyo, Japan), anti-VDAC (MSA03, Mitosciences), and anti-TFAM (a gift from Dr. Kang at Kyushu University, Fukuoka, Japan).

2.6. Statistics

Values are presented as means ± SEM (standard error of the mean). The significance of differences between means was assessed

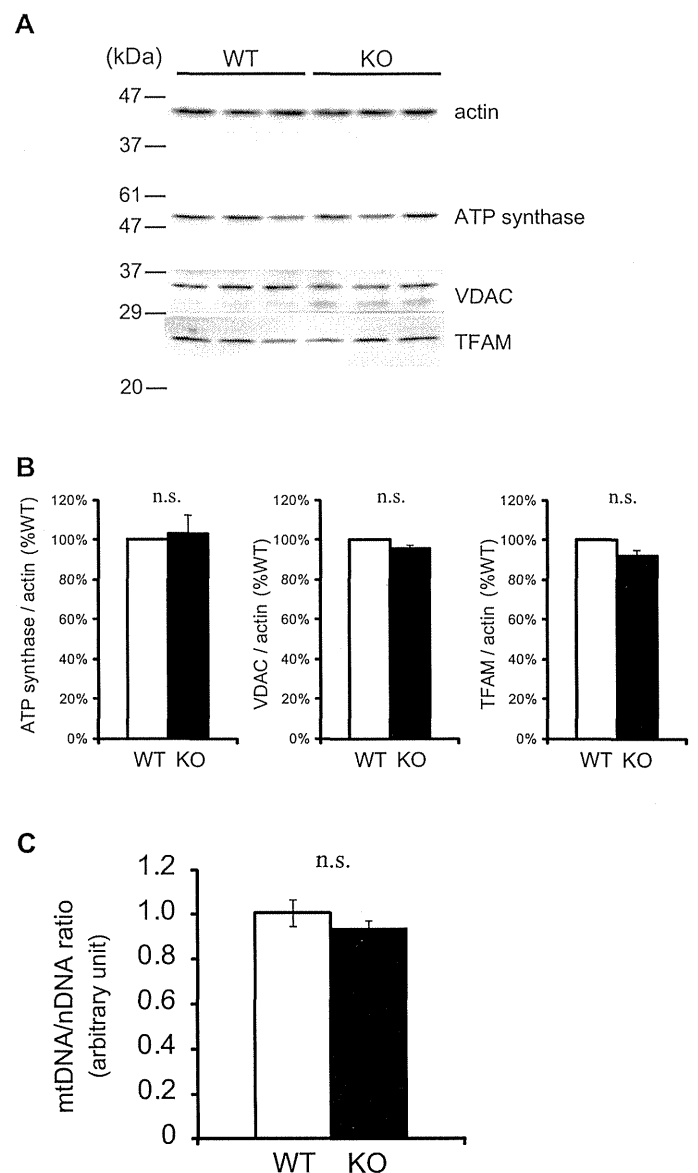


Fig. 1. Mitochondrial protein contents and mtDNA contents of *PINK1*^{+/+} and ^{-/-} MEFs. (A) Representative images of mitochondrial marker proteins analyzed by immunoblotting after SDS-PAGE. (B) Densitometry analysis of mitochondrial proteins to actin ratio was performed using three independent experiments. (C) Mitochondrial DNA copy number of *PINK1*^{+/+} and ^{-/-} MEFs. Open bars, *PINK1*^{+/+} MEFs; closed bars, *PINK1*^{-/-} MEFs. Error bars indicate SEM (n = 3). n.s., not significant.

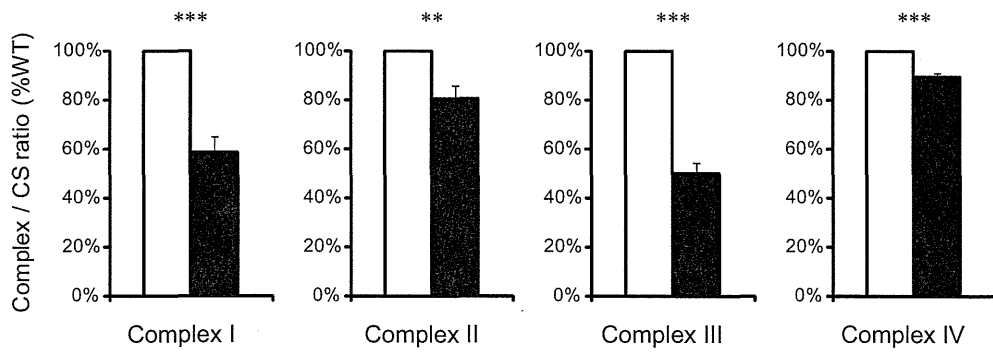


Fig. 2. Respiratory chain complex activities in mitochondria isolated from *PINK1*^{+/+} and *-/-* MEFs. Open bars, *PINK1*^{+/+} MEFs; closed bars, *PINK1*^{-/-} MEFs. Each complex activity was normalized to citrate synthase activity measured in the same samples. Data are expressed as percentages of levels in *PINK1*^{+/+} cells (%WT). Error bars indicate SEM ($n=4$ independent mitochondrial preparations). * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.

by the unpaired Student's *t*-test; P values <0.05 were taken to be significant.

3. Results and discussion

3.1. Mitochondrial content

To estimate mitochondrial content in *PINK1*^{+/+} and *-/-* MEFs, we determined the expression levels of mitochondrial proteins, VDAC (porin) and ATP synthase (complex V). These two proteins are known as relatively stable mitochondrial proteins and often used as SDS-PAGE loading control of isolated mitochondria. Furthermore, we have previously reported that mitochondrial phosphorylating system including ATP synthase was not functionally altered by loss of *PINK1* [3]. As shown in Fig. 1A and B, the mitochondrial proteins were not different between *PINK1*^{+/+} and *-/-* MEFs. We also determined the mitochondrial DNA (mtDNA) copy number. While the mtDNA copy number does not strictly correlate with mitochondrial content, it is usually a good indicator and its determination is rapid and less labor intensive. Mitochondrial DNA copy numbers were similar in *PINK1*^{+/+} and *-/-* MEFs (Fig. 1C). Mitochondrial transcriptional factor A (TFAM), which binds mtDNA in

a sequence-independent manner and their contents finely correlated with mtDNA copy number [14], was also same expression level (Fig. 1A). Therefore, the mitochondrial respiration defect in *PINK1*^{-/-} MEFs is not due to a reduction in mitochondrial content.

Similar to *PINK1*^{-/-} MEFs in this study, fibroblasts from a patient homozygous for the W437X missense mutation of *PINK1*, showed no changes in the mtDNA copy number [26]. Additionally, mitochondrial content was not altered in the striatum of *PINK1*^{-/-} mice [10], consistent with the results of our study. However, *PINK1* dysfunction causes a decreased mtDNA copy number in human SH-SY5Y neuroblastoma cells [11]. This discrepancy might be due to the type of cells. In fact, mtDNA contents of both of the MEFs (Fig. 1C) and the patient fibroblasts [26] were not significantly different from their controls, but showed slightly decreasing tendency.

3.2. Enzymatic activity of each respiratory chain complex

Previously, we found decreased mitochondrial membrane potential caused by loss of *PINK1*, the key event for subsequent mitochondrial elimination, was not due to a proton leak, but to respiratory chain defects [3]. To further investigate this, we determined the enzymatic activities of each respiratory chain complex.

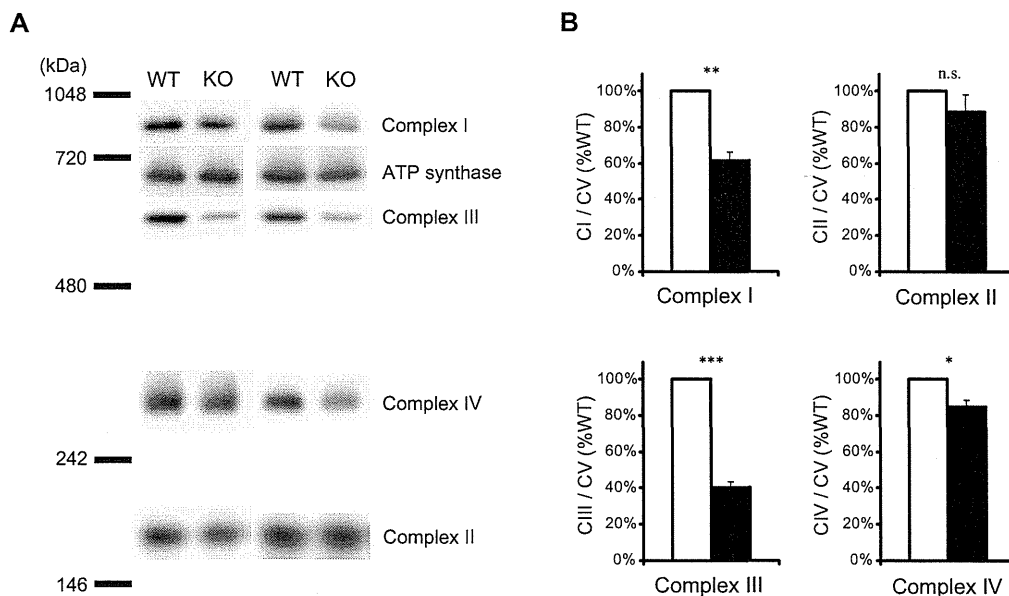


Fig. 3. Respiratory chain complex quantities in mitochondria isolated from *PINK1*^{+/+} and *-/-* MEFs. (A) Representative images of respiratory chain complexes analyzed by immunoblotting after BN-PAGE. (B) Densitometry analysis of respiratory chain complexes to ATP synthase ratio was performed using three independent mitochondrial preparations. Open bars, *PINK1*^{+/+} MEFs; closed bars, *PINK1*^{-/-} MEFs. Error bars indicate SEM ($n=3$). n.s., not significant; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$.