

## 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。分担者斉木は 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事が出来た。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

PARK9 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。

責任遺伝子 *CHCHD2* に病因変異を持つ患者由来 iPS 細胞ライン

*CHCHD2* 病因変異を持つ患者 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。

*PINK1* 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*<sup>-/-</sup> 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<sup>+</sup>、I<sup>-</sup> 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- 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- 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- 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

