

I. 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、神経細胞突起長、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

1. 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： 齊木臣二 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。一方分担者齊木は、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、細胞ライセート両者のミトコンドリア酸化リン酸化回路の全般的な低下、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) 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

GPCCholine 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, 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

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-3β 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 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

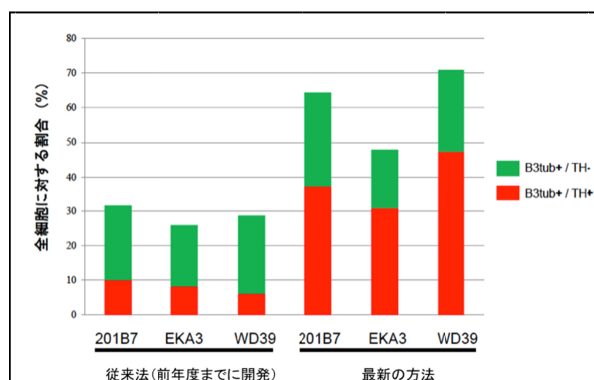
分担研究者報告書のため記載の必要なし

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. Krajarng 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

