

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

パーキンソン病患者由来 iPS 細胞を中心とする多面的疾患モデルに立脚した革新的医薬品  
の開発に関する研究（孤発性 PD の解析を中心に）

業務主任者 高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科 臨床神経学 教授

研究要旨：パーキンソン病（PD）は我が国で 2 番目に多い神経変性疾患であるが、治療は対症療法に留まり現在のところ根本的治療法はない。本研究では、樹立済み PD 患者由来 iPS 細胞を中心に、多彩な PD モデル動物（マウス・ラット・メダカ・ショウジョウバエ）や細胞モデルを含めた多面的疾患モデルを基礎として、創薬シーズの同定から進行抑制や先制医療に繋がる革新的医薬品を創り出すことを目標とする。なお、本報告書では、総括部分で最終的なターゲットである孤発性 PD に関する研究を記載し、業務項目部分で遺伝性 PD、あるいはデータベースを用いた創薬に関する研究を記載する。

業務項目の担当責任者氏名（分担研究者）

服部信孝（順天堂大学医学部 神経内科（教授））  
岡野栄之（慶應義塾大学医学部 生理学（教授））  
井本正哉（慶應義塾大学理工学部 生命情報学科（教授））  
望月秀樹（大阪大学大学院 医学系研究科 神経内科学（教授））  
青木正志（東北大学大学院 医学系研究科 神経内科学分野（教授））  
戸田達史（神戸大学大学院 医学研究科 神経内科学（教授））  
浅田隆太（名古屋医療センター 臨床研究センター  
臨床研究事業部 研究開発推進室（室長））  
田代 悦（慶應義塾大学理工学部 生命情報学科（専任講師））  
赤松和土（順天堂大学 ゲノム再生医療センター（特任教授））  
駒野 肇（慶應義塾大学医学部 生理学（特任講師））  
山下博史（京都大学大学院医学研究科 臨床神経学（助教））  
山門穂高（京都大学大学院医学研究科 臨床神経学（助教））

## A. 当研究班の研究目的と期待される成果

### 1) 研究目的

パーキンソン病 (PD) は我が国で 2 番目に多い神経変性疾患であるが、治療は対症療法に留まり根本的治療法はない。本研究では、PD 患者由来 iPS 細胞を中心に、多彩な PD モデル動物 (マウス・ラット・メダカ・ショウジョウバエ) を含めた多面的疾患モデルを基礎として、創薬シーズの同定から進行抑制や先制医療に繋がる革新的医薬品を創り出すことを目的とする。

当グループでは遺伝性 PD 責任遺伝子の同定・機能解析とともに、剖検脳での評価やモデル動物作製も行い (*Nature* 1998, *Science* 2001, *Cell* 2001, *Ann Neurol* 2008, *HMG* 2013)、近年ではドパミン細胞死に密接に関わるミトファジー (ミトコンドリア品質管理機構) や小胞輸送の分子機構解明を進めてきた (*JCB* 2010, *Nat Comm* 2013)。また、遺伝性 (PARK1,2,4,6,7,8,9, 未発表新規遺伝子)・孤発性 (GBA 変異含む) PD 患者由来の iPS 細胞樹立と解析を行っている。また臨床データベースの整備とバイオサンプルのバンク化も着手している。これらと神経変性疾患に関する調査研究班 (中野班) で培われた知見を基礎とし、遺伝性から孤発性 PD への応用、メカニズム解明から治療への発展をめざす。特に臨床サンプルの取得や臨床試験に関しては、主に日本神経学会の協力を得る。

具体的には、主に iPS 細胞モデルからパスウェイ解析を含めた発現蛋白・RNA の解析を行い、新規の創薬シーズを同定する (平成 26-7 年度)。特に GBA 変異をもつ孤発性 PD- iPS 細胞 (作製済み) の、ゲノム編集

を用いた解析は未報告であり新規性が高い。次年度に薬剤スクリーニング系を構築し、ヒット化合物を同定する (平成 27 年度)。さらに独自に開発した孤発性・遺伝性・ウイルスベクターを用いた PD マウスモデルや世界に先駆けて開発したメダカモデルなどモデル動物や生体材料での検証を行う (平成 28 年度)。

また、PD で障害されるミトコンドリアや小胞輸送を標的とする薬剤開発は複数のリード化合物を同定するなど先行しており、初年度から分子薬理作用の解明を目指すと同時に、新たなライブラリースクリーニングを行い、孤発性 PD モデルにおいても有効な、さらなるヒット化合物の取得を試みる。

### 2) 期待される成果

孤発性神経変性疾患の原因究明と治療は、高齢化が進む 21 世紀において全世界的な課題である。その中において、PD は有病率が 130-150 人/10 万人 (発症率は 50-59 歳: 1.7 人/10,000 人、70-79 歳: 9.3 人/10,000 人) と高齢者ほど増加することから、今後患者人口の増大およびそれに伴う医療費・介護関連費用の増大が危惧される疾患である。さらに発症機序は完全には解明されておらず、治療は対症療法に限定されており、進行予防・抑制効果を持つ根本的治療法は存在しない。一方で、PD は診断方法が比較的確立されており、患者数も多く、適切な症例選択に基いた中断のない臨床試験への移行が可能である疾患でもある。孤発性神経変性疾患には共通のメカニズムが想定されており、PD 患者由来 iPS 細胞・動物モデルを相補的に用いて、さらに化合物スクリーニングシステムを組み合わせた本研究の

成果次第では、本研究終了時点においてPDに対する革新的医薬品の臨床試験への基盤作りが達成され、長期的には他の孤発性神経変性疾患、ひいては難治性疾患の治療を一変させる可能性を秘めている。この点で、疾患 iPS という我が国発の技術を基にした革新的医薬品開発が成功すれば、新薬開発などの医薬品産業、及び社会福祉・医療介護を含めた医療・福祉行政に極めて大きなインパクトを持つと考えられる。

## B. 研究方法

### 1) PD 患者由来 iPS 細胞を用いた創薬シードの同定と化合物スクリーニング

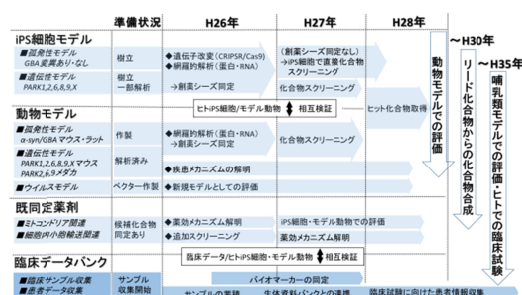
孤発性 PD における解析は、その疾患多様性のため解析が困難である。このため、比較的均一な集団である GBA 変異患者由来 iPS 細胞を対象とし、CRISPR/Cas9 を用いて GBA 変異を正常型に修復したものを比較群とすることで、遺伝的背景の多様性に対応する。さらに、高橋淳らにより確立されたドパミン神経前駆細胞の表目mm抗原である corin sorting を用いるなどの最適な解析を行う。

### 2) 新たなモデル動物を用いた病態解明・評価系確立

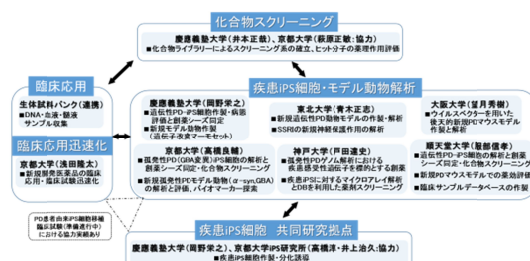
孤発性 PD モデルに関して、-syn BAC Tg マウスと GBA ヘテロ KO の交配マウス、GBA 変異メダカの解析を継続する。また、-3)と同様の網羅的解析も行い、iPS 細胞との相互検証を行う。MPTP 腹腔内投与マウスをドパミン神経細胞死モデルとして、ウイルスベクターを用いて黒質に Syn を導入したマウスは Syn 蓄積・ドパミン細

胞死モデルとして使用する。メダカモデルに関して、孤発性 PD の最も強力なリスク因子である glucocerebrosidase (GBA)の変異メダカの作製・解析を行う。BA リード化合物をこれらのモデルに投与し、in vivo における効果を検証するが、既にミトコンドリア障害を標的として同定された化合物の投与を先行させる。

### (研究計画)



### (研究体制)



### 3) 倫理面への配慮

#### ヒト由来末梢血液・脳脊髄液・剖検脳の取り扱いについて

ヒト由来各種末梢血液成分 (核酸、蛋白質、血球成分) 並びに脳脊髄液・剖検脳の解析については既に各大学倫理委員会の承認を得ている。また研究に用いるヒト細胞に関しては、被験者に対する口頭および書面によるインフォームドコンセントをはじめ、実施計画書など倫理面において十分な配慮を以て作成している。個人の検体採取

の取り扱い（遺伝情報を含む各種検査・測定項目）に関しては、各試料は無作為に割り付けし、個人を特定不能にする。

### iPS 細胞樹立・使用について

ヒト iPS 細胞を使用する研究（ゲノム研究、病態解明研究並びに薬効評価研究）に関しては、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、準拠した研究計画となっている。また京都大学内の倫理委員会の承認も得ている。

### 疾患動物モデルの取り扱いについて

動物実験は全て、動物愛護法・日本学術会議による「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、各大学の動物実験に関する指針にのっとり行う。

## C. 研究結果

### 1) PD 患者由来 iPS 細胞の解析

iPS 細胞からの創薬シーズ同定のために PD 患者由来 iPS 細胞の解析を行った。京都大学神経内科に通院中の PD 患者約 150 名の解析を中心として、GBA 変異患者 4 名（L444P、R120W、RecNC11）を同定し iPS 細胞を作製した。培養細胞（HEK293）を用いて GBA 遺伝子変異の導入・修復を行っており、今後 iPS 細胞に適用する予定である。

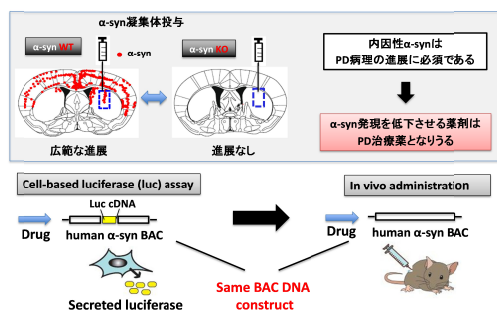
### 2) モデル細胞を用いた創薬シーズの開発

-syn はレビー小体の主要構成成分であ

り、-syn 遺伝子の重複（-syn 発現量増加）のみで家族性 PD を発症することが知られている。さらに、最近の実験では、-syn の進展は、内因性 -syn の発現量に依存する可能性が強く示唆されている。-syn BAC を用いたルシフェラーゼアッセイ系を確立し、-syn の発現を低下させる FDA 承認化合物を得た。この化合物 A は FDA 承認医薬品（良性疾患治療薬）で脂溶性（BBB 通過）であることから、創薬シーズとなりうると思われる。

#### α-synuclein (α-syn)発現を低下させる既存薬スクリーニング

京都大  
\*α-synはレビー小体の主要構成成分である  
\*α-syn遺伝子の重複(α-syn発現量増加)のみで家族性PDを発症する



#### FDA承認化合物A、Bは内因性α-synを低下させる

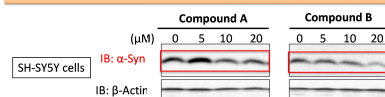
##### 使用ライブラリー

- ① FDA-approved drug library 640 compounds
  - ② Chemical library with known action mechanism 1,960 compounds
- } 2,600 compounds

##### 化合物スクリーニング

stage			2,600 compound
1st	Effect and toxicity	*Luc activity +WST-1 (25 μM)	111 candidates
2nd	Dose dependency	*Luc activity +WST-1 (0.2 -20 μM)	77 candidates
3rd	Dose dependency	*WB (protein expression)	24 candidates

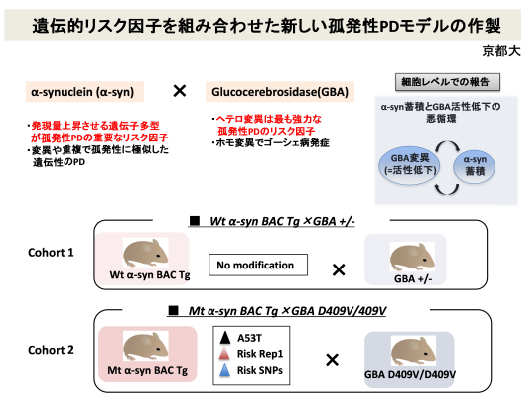
##### ■化合物AはFDA承認医薬品(良性疾患治療薬)で脂溶性(BBB通過)



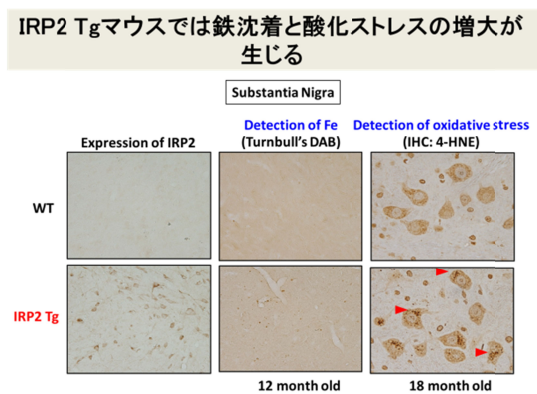
### 3) 動物モデル

a) -syn は発現量上昇させる遺伝子多型が孤発性 PD の重要なリスク因子となり、変異や重複で孤発性に極似した遺伝性の PD を発症する。GBA 遺伝子は、ホモ変異でゴーシェ病を発症するが、そのヘテロ変異は最も強力な孤発性 PD のリスク因子である。

細胞レベルの実験では、 $\alpha$ -syn 蓄積と GBA 活性低下は悪循環を形成するとの報告がある。孤発性 PD により近いマウスの作製を目的として、 $\alpha$ -syn BAC Tg マウスと GBA ヘテロ K0 の交配マウスを作製した。



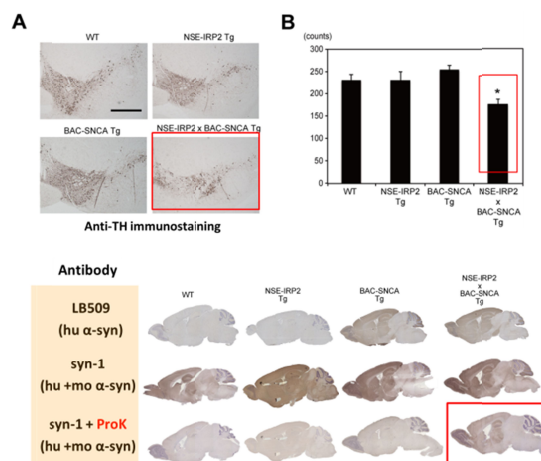
b) 孤発性 PD は  $\alpha$ -syn の発現上昇などの遺伝的要因に、酸化ストレスや老化などの環境要因が加わって発症するとされる。遺伝的に、持続的な酸化ストレスを負荷することが可能な IRP2 (Iron regulatory Protein 2) の過剰発現マウスを用いて、孤発性 PD の病態に近いマウスの作製を試みた。



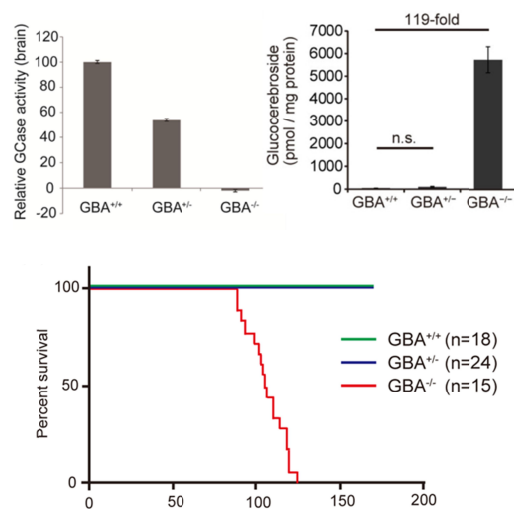
$\alpha$ -syn BAC Tg マウスと IRP2 Tg の交配マウスを作製したところ、交配マウスでのみドパミン神経細胞死、1% Triton insoluble、ProteaseK 抵抗性の不溶化した

$\alpha$ -syn を認め、孤発性 PD の病態を反映したマウスであると判断される。

**交配マウスでのみドパミン神経細胞死、 $\alpha$ -synの不溶化を認める**

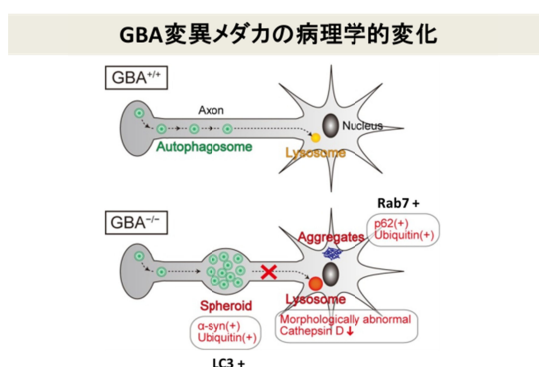
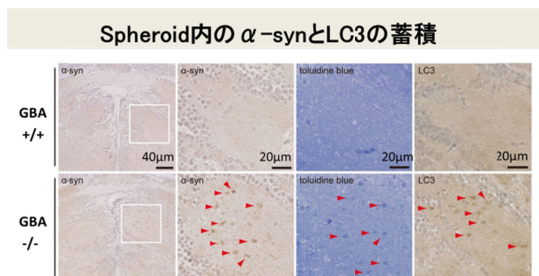


c) GBA 変異メダカを TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 法で作製した。作製したメダカでは、GBA 活性が著明に低下し、GBA の基質である GluCer の蓄積を認めた。しかし、マウスやヒトと異なり、3 - 4 か月生存が可能であった。



この GBA メダカでは、軸索内のオートファゴソームと  $\alpha$ -syn の蓄積を伴う spheroid が形成されることを見出し、PD におけるリ

リソソーム障害を介した GBA 変異と  $\alpha$ -syn 蓄積の関連を解き明かす糸口を見出した (文献 3)



#### D. E. 考察・結論

GBA 関連 PD 患者由来 iPS 細胞の解析に関して、現在 PD 患者由来の iPS 細胞解析結果の再現性が問題となっている。また、ドパミン神経細胞まで分化させた状態における厳密な比較検討がなされた報告はほとんどないといってよい。iPS のゲノム編集は必須条件となっており、早急に行う必要がある。また、ドパミン神経細胞まで分化させた細胞の解析という点からは、corin 以外の細胞表面マーカーである dopamine transporter (DAT)を用いた sorting も考慮が必要である。

マウスを用いたモデル作製に関して、IRP2 を使用した交配マウスに関しては、PD の発症モデルとして有用であり、薬物負荷などのプラットフォームとして使用できる

と考えられる。今後は酸化ストレスによって  $\alpha$ -syn の不溶化を伴う細胞死がなぜ生じるかを、細胞モデルを併用しながら解析を進めていく必要がある。

GBA 遺伝子改変マウスを用いた交配モデルに関しては、現在老化による影響を確認中であり、さらなる解析が必要であるが、非発症であっても網羅的解析などにより発症早期の変化を捉えられる可能性があり、この点から髄液や血液などのバイオサンプルとの比較検討が今後重要となると考えられる。

$\alpha$ -syn の発現を低下させる化合物に関しては、 $\alpha$ -syn BAC Tg マウスに投与し、in vivo の効果を確認していく必要があり、現在準備中である。また、当研究でえられた化合物は FDA 承認化合物であることから、様々な derivative が入手可能であり、より効率の良い化合物をまずは細胞レベルで探索していくことが重要であると考えられる。

GBA 遺伝子変異メダカに関しては、主要な解析が終了している。GluCer 合成酵素阻害剤 (miglustat, GZ 161) や抗炎症薬、免疫抑制剤 (tacrolimus) などの投与により、 $\alpha$ -syn の蓄積を抑制する薬物の探索が可能となった。また、炎症関連分子の遺伝子改変メダカとの交配により、リソソーム障害による神経変性と  $\alpha$ -syn の蓄積に対する、慢性炎症の果たす役割について、遺伝学的な検証が可能となった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. ○Yamakado H. Advance in PD

- research explored a new field on ubiquitin biology. **Mov Disord.** 2014; 10:1243.
2. Matsui H, Uemura N, Yamakado H, Takeda S, Takahashi R. Exploring the pathogenetic mechanisms underlying Parkinson's disease in medaka fish. **J Parkinsons Dis.** 2014; 4:301-310.
  3. Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T,

Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Yamakado H, Takahashi R. Viable neuronopathic Gaucher disease model in medaka (*Oryzias latipes*) displays axonal accumulation of alpha-synuclein. **PLoS Genet.**, in press.

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

なし