

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：パーキンソン病における疾患修飾薬候補の同定と precision medicine の実現に向けた
アカデミアと企業の技術融合による新たな創薬エコシステムの開発
Development of a new drug discovery ecosystem by identification of disease modifying
drug candidates and realization of precision medicine in Parkinson's disease
by integration of academia and enterprise technology

研究開発実施期間：令和元年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：赤松 和土
Wado Akamatsu

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
学校法人順天堂 順天堂大学 大学院医学研究科ゲノム・再生医療学 担当教授
Juntendo University School of Medicine, Center for Genomic and Regenerative Medicine, Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

本研究提案では、申請者らが前述のようにこれまでほぼアカデミア単独で構築してきた遺伝性・孤発性 PD-iPS 細胞のリソース・分化誘導と表現型解析および小規模創薬スクリーニング（数百化合物）・特定薬剤評価の手法に、参画企業が持つハイスループットスクリーニング手法を取り入れさらに方法を効率化・高精度化し、iPS 細胞を用いたパーキンソン病に対する革新的新薬開発のための大規模スクリーニング（数万化合物）を参画企業が遂行可能な基盤を構築することを目標とする。同時に参画企業が実際に開発中の候補化合物（臨床ステージに入った化合物またはステージの高い非臨床化合物を含む）や過去に開発を中断した化合物をアカデミア側が有する遺伝性・孤発性 PD-iPS 細胞を用いて評価する（Clinical trial in a dish）ことにより候補薬剤が薬効を示す患者層およびその層別化マーカーを見いだすことを目標とする。メタボローム解析は本研究で提案する Precision Medicine を目指した薬剤開発において、iPS 細胞を用いた解析結果で患者の層別化が行われた後には、創薬モニタリング上全ての参画企業が重要と考えているバイオマーカー同定のために極めて重要である。分担者の斉木が患者血漿メタボローム解析結果を全検体で利用可能に整備を進める一方でメタボローム解析に供された検体のゲノム情報は分担者の船山によってデータベース化される。さらに培養細胞系で効果が確認された治療薬候補を in vivo で評価するために、分担者の今居らが確立しているショウジョウバエモデルと、分担者の波田野らが有している PD モデルマウスによる評価系を用いる。このように本研究は順天堂大学と参画企業がそれぞれの技術とリソースを共有し、これまでアカデミ

ア単独・製薬会社単独では行うことが難しかった高精度で多面的な創薬フローの確立を目指すものである。各研究項目における成果は以下の通り。

1) 遺伝性・孤発性パーキンソン病 iPS 細胞ライブラリーの整備

遺伝性検体に関しては PARK2(2 種類)、PARK4、PARK6、PARK9、PARK14、PARK22 の 7 種類に関しては複数の表現型解析の結果が得られており、その情報は参画企業と共有されている。参画企業に対しても研究期間中に細胞の供与を行った。参画企業での解析によって同様の結果が得られることが確認され、各 iPS 細胞の表現型と遺伝子型の紐付けがより確実なものとなり、パーキンソン病 iPS 細胞を用いた解析の信頼性が大いに高まる結果となった。孤発性症例においても、iPS 細胞の樹立とゲノム解析・表現型解析を進めた。約 200 症例を樹立し、このうち表現型解析が完了している症例は約 70 例となっており企業創薬に使用可能なレベルになっている。表現型解析が終了している孤発性 70 症例についてはパーキンソン病発症に影響及ぼす因子の遺伝子解析が終了している。

2) 参画企業が持つ創薬スクリーニング技術の導入による PD-iPS 細胞表現型解析の高効率化

現在までにスクリーニングのハイスループット化を目指して各ステップの効率化を図ってきた。スクリーニング技術のハイスループット化のため、従来 96well を用いていた表現型検出システムのうち、最終的に重要なリードアウトの一つである細胞死の定量に関して 384-well plate で実施可能か検討し、これまでの検討では従来の 96well を用いた方法と類似性の高い結果を得ることができている。ハイスループット化のための病態検出手順の簡略化として、免疫染色ベースの解析手法の一部を蛍光レポーターなどで簡略化する試みとして、複数種類の蛍光レポーターを使用した評価系の最適化を行い、ミトコンドリア機能障害を定量的に検出することに成功した。

3) 参画企業が持つ PD 治療薬候補化合物の遺伝性・孤発性 PD-iPS 細胞における薬効評価

参画企業との連携に関しては研究員が共同研究員として順天堂に常駐し、スクリーニングシステムの技術移転と企業創薬のための最適化を行った。2021 年 2 月からは新生翔研究員が交替で着任しパーキンソン病 iPS 細胞からの表現型検出方法と分化誘導法の最適化を行った。これまで用いられてきた浮遊培養のニューロスフェアを経由する分化誘導法から、接着培養の神経前駆細胞を経由する分化誘導法を新たに構築した。同誘導法でもマイトファジー異常及び細胞死を安定して検出できることを確認している。マイトファジー異常を示す家族性パーキンソン病 iPS 細胞と α シヌクレイン蓄積を示す家族性パーキンソン病 iPS 細胞を用いて、それぞれの表現型を指標として参画企業が提供した約 100 種類の化合物の作用を評価することに成功した。マイトファジー異常および α シヌクレイン蓄積を改善する候補化合物を同定することに成功している。

4) PD 治療薬候補化合物の動物モデルにおける薬効評価

ショウジョウバエモデルに関しては、PARK8 (LRRK2) モデルでの前シナプスの表現型を指標にし、PARK8 と細胞内小胞輸送に関わるパーキンソン病遺伝子間の遺伝学的位置関係を明らかにした。これにより、遺伝性 PD-iPS 細胞との補完的な対応がほぼ完成した。加えて、PARK2 (Parkin)、PARK6 (PINK1)、PARK9(ATP13A2) モデルショウジョウバエの薬効評価用表現型を確立した。PARK2 に関連しては、ハイスループットなスクリーニングに利用可能な EGFP-Parkin を安定的に発現する iPSCs 系統を樹立した。マウス腸管への胃・十二指腸に α シヌクレインシードを投与し延髄迷走神経背側核へ伝播したことを確認した。一方で、視床下部からさらなる上行への伝播を確認できなかった。マウス嗅球への α シヌクレインシード注入については、注入 6 週間および 12 週間後の検討で、嗅球から神経接続のある前嗅核、梨状皮

質、扁桃体、嗅内皮質への伝播を確認した。患者血清より得られた α シヌクレインシードの伝播様式はパーキンソン病患者由来と多系統萎縮症患者由来で異なることが判明し、病態解明や薬効評価に有用なモデルとして使えることを示した。現在、Nature Medicine 誌に投稿しマイナーリバイス中である。

5) PD 患者血漿のメタボローム解析とバイオマーカー探索

de novo パーキンソン病 25 症例のマルチオミックス解析を完了した。血漿メタボローム解析により甲状腺ホルモンが低下、脂肪酸 β 酸化が低下していることが確認された。血清エクソソーム由来 miRNA トランスクリプトーム解析と先述の血漿メタボローム解析によるマルチオミックス解析にて PPAR α 活性が低下していることを突き止めた。*in vitro* 実験により肝細胞における脂肪酸代謝変化が生じるという一元的な臓器関連メカニズムを特定した。

6) PD 患者血漿のメタボローム解析と参画企業とのデータ共有による創薬

パーキンソン病臨床データの血液検査データ・一部のメタボロームデータ・MIBG 心筋シンチグラフィデータ（具体的には心臓/縦隔比、甲状腺/縦隔比）を用いた統計解析を進めた。PD 患者では早期心臓/縦隔比と早期甲状腺/縦隔比には有意な正の相関が認められることを確認した。中頸神経節の交感神経節後線維の選択的脱落が、PD 診断バイオマーカーになり得ることを示した。参画企業とのパーキンソン病患者 D300 名弱の経時的観察によるデータベース解析により、16 名の症状進行が早い症例群を特定することができた。同症例群のエクソーム解析により、GBA 遺伝子変異を持つ患者が 2 名特定された。この患者について iPS 細胞由来ドパミン神経細胞を作製した。

This research proposal aims to establish a basis for large-scale screening for the development of innovative new drugs for Parkinson's disease using iPS cells by incorporating the high-throughput screening methods of the participating companies into the cell resources and differentiation-inducing phenotype analysis methods that have been established by the applicant and his colleagues. The goal of the project is to establish a platform for large-scale screening for the development of innovative new drugs for Parkinson's disease using iPS cells. The project will develop a system to evaluate candidate compounds under development by the participating companies using iPS cells. At the same time, the results of plasma metabolome analysis will be made available to all samples, and the genome information of the samples used for metabolome analysis will be compiled into a database. In addition, an evaluation system using *Drosophila* and mouse models will be established for in vivo evaluation of therapeutic drug candidates whose efficacy has been confirmed in cultured cell systems. Juntendo University and participating companies will share their technologies and resources to establish a highly accurate and multifaceted drug discovery system, which has been difficult for academia and pharmaceutical companies alone. The results of each research project are as follows.

1) Establishment of familial and sporadic Parkinson's disease iPS cell libraries

Multiple phenotyping results were obtained for the familial specimens, and this information was shared with the participating companies. iPS cells were also provided to the participating companies during the research period. The analysis by the participating companies confirmed that the same results could be obtained, and the linkage between the phenotype and genotype of each iPS cell became more reliable. In sporadic cases, establishment of iPS cells and genomic and phenotypic analyses were also conducted. Phenotypic analysis has been completed for approximately 70 of these cases, so that they can be used for corporate drug discovery.

2) High efficiency of PD-iPS cell phenotyping by introducing drug screening technologies of companies

To achieve the high throughput of screening technology, we have examined the possibility of using 384-well plates for quantification of cell death, which is one of the final essential readouts in the phenotypic detection system that has conventionally used 96-well plates and have obtained results that are highly similar to those of the conventional 96-well method.

3) Evaluation of the efficacy of PD drug candidate compounds from participating companies in hereditary and solitary PD-iPS cells

Using familial Parkinson's disease iPS cells showing abnormal mitophagy and α -synuclein accumulation, we evaluated the effects of approximately 100 compounds provided by the participating companies using each phenotype as an indicator. As a result, they have identified candidate compounds that improve mitophagy abnormalities and α -synuclein accumulation.

4) Evaluation of drug efficacy of PD therapeutic candidate compounds in animal models

Concerning the *Drosophila* model, we established phenotypes of PARK2 (Parkin), PARK6 (PINK1), and PARK9 (ATP13A2) model *Drosophila* cells for drug evaluation. Concerning the mouse model, we confirmed that α -synuclein seeds were administered to the stomach and duodenum into the mouse intestinal tract and propagated to the dorsal nucleus of the medullary vagus nerve. On the other hand, we could not confirm propagation from the hypothalamus to the other ascending line. In the case of α -synuclein seed injected into the olfactory bulb of mice, we confirmed propagation from the olfactory bulb to the anterior olfactory nucleus, piriform cortex, amygdala, and entorhinal cortex with neural connections at 6- and 12-weeks post-injection.

5) Metabolomic analysis of plasma from Parkinson's disease patients and biomarker discovery

We have completed a multi-omics analysis of 25 cases of de novo Parkinson's disease. Plasma metabolome analysis confirmed that thyroid hormone and fatty acid β -oxidation was decreased in Parkinson's disease patients. Multi-omics analysis of serum exosome-derived miRNA transcriptome, and plasma metabolome analysis revealed decreased PPAR activity in Parkinson's disease patients.

6) Drug discovery through metabolomic analysis of plasma from PD patients and data sharing with participating companies

Statistical analysis of Parkinson's disease clinical data using blood test data, some metabolome data, and MIBG cardiac scintigraphy data were conducted. Selective shedding of post-sympathetic ganglion fibers in the middle cervical ganglion was shown to be a potential PD diagnostic biomarker. Database analysis of nearly 300 patients with Parkinson's disease with the participating companies allowed us to identify a group of 16 patients with rapid progression of symptoms.