

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 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
2. 研究開発代表者： 服部 信孝（学校法人順天堂 順天堂大学大学院医学研究科神経学 教授）
3. 研究開発の成果

2014 年度の当研究開発申請時に既に PARK2/6/9-iPS 細胞樹立を終えており、2014 年度より代表者らが同定した家族性 PD 責任遺伝子 *CHCHD2* による PARK22-iPS 細胞樹立を追加し、同 iPS 細胞群 (PARK2/6/9/22) より分化誘導した神経細胞の表現型を検討し、各病型特異的な病態解明を図ると同時に、新たな iPS 細胞からのドパミン神経細胞誘導効率を上昇させる革新的技術開発、並びに創薬スクリーニングに資する評価系の確立・およびヒット化合物の薬効薬理作用の確認を 2015 年度も行った。研究グループ全体の本年度の成果を下記に列挙する。

- 1) PARK9-iPS 細胞由来ドパミン神経細胞を作製し、その表現型としてリソソームの酸性化維持が十分に図られず、リソソーム pH が上昇する（リソソーム蛋白水解酵素機能不全を招来すると予測される）という異常を検出した。またドパミン分泌能の低下の端緒となるデータを得た。
- 2) 大規模化合物スクリーニングにはハイスループットの定量解析システムの確立が必須である。同技術を iPS 細胞由来神経細胞を用いて開発すべく iPS 細胞由来神経細胞の神経突起長を自動細胞解析装置（BioStation、ニコン製）を用いて測定するシステムを構築した。同システムを用いて PARK2/6・コントロール・筋萎縮性側索硬化症患者由来 iPS 細胞由来神経細胞の神経突起伸長を評価したところ、健常者由来 iPS 脂肪由来神経細胞の神経突起伸長が培養開始後 20 日を経過しても漸増するのに比し、PARK2/6-iPS 細胞由来神経細胞では突起伸長が停止し、40 日後には逆に 50-70%程度まで神経突起長が減少することを確認した。しかし同変化は PARK9-iPS 細胞由来神経細胞では認めないことを確認した。同変化を用いた化合物スクリーニングシステムを構築中である。
- 3) PARK22-iPS 細胞を樹立し、ドパミン神経細胞への分化誘導を完遂した。さらに Crispr/Cas9 を用いた遺伝子編集を用いた PARK22-iPS 細胞の遺伝子改変の条件検討を行った。
- 4) iPS 細胞からのドパミン神経細胞の誘導効率（従来法では 20%前後）を上昇させるため、分化誘導時の添加物の濃度・添加タイミングなどの条件検討を重ね、濃縮（Tyrosine hydroxylase-GFP の強制発現を用いた sorting による）技術を加え、60-70%の純度でドパミン神経細胞を誘導できる技術を確認した。
- 5) 上記の 2)-3) の技術開発と並行し MPP+添加型 PD モデル細胞を用いた化合物スクリーニングを施行し、MPP+によって誘導されるアポトーシスを抑制し、さらに細胞内凝集体形成を阻害する新規化合物 X を同定した。同物質はオートリソソームの産生を促進するという作用を持つことを培養細胞実験にて確認した。
- 6) 厚生労働省科学研究費補助金（2010-2012 年度）により実施した漢方薬スクリーニングにより同定された生薬である甘草に含まれる成分（licopyranocoumarin, glycirurol）などを含む複数のヒット化合物の薬効薬理作用を PARK2/6-iPS 細胞由来神経細胞を用いて検証を開始した。