

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： パーキンソン病 iPS 細胞を用いた疾患解析と治療法開発

2. 研究開発代表者： 高橋 良輔（京都大学大学院医学研究科）

3. 研究開発の成果

(1) パーキンソン病新規治療薬候補の同定

パーキンソン病 (PD) 患者 iPS 細胞を用いた疾患解析の技術的障壁としては、ドパミン神経細胞への分化誘導効率が低く、解析対象とする細胞集団が不均質であることが挙げられる。我々は、ドパミン神経純化技術を *in vitro* の解析系に最適化することにより (4)、70% 以上のドパミン神経細胞の濃縮に成功した。この方法を用いて、LRRK2 変異 PD 患者由来 iPS 細胞 (LRRK2-PD) と健常対照者由来の iPS 細胞をそれぞれ高純度のドパミン神経細胞に分化誘導し、過酸化水素負荷時における LDH アッセイによって、細胞傷害感受性を評価した。その結果、過酸化水素負荷時の LDH 放出量は健常対照に対して LRRK2-PD で有意に高く、また、高純度ドパミン神経細胞モデルでは、より低濃度の過酸化水素負荷で両者の差を検出することができた。上記に並行して、責任遺伝子変異による表現型を正確に解析するため、遺伝子改変技術により解析対象とする責任遺伝子以外の遺伝的背景を同一とした解析対照を作製することも試みた。CRISPR/Cas9 を用いて、LRRK2 (I2020T) の遺伝子修復クローンの候補をクローニングした。

(2) パーキンソン病新規治療薬候補の解析

我々はこれまでに PD モデルメダカとして、Parkin/PINK1 二重欠失メダカ、GBA 欠失メダカが進行性のドパミン神経細胞脱落を起こすことを報告している。iPS 細胞から得られた新規治療薬候補に関して、メダカモデルを用いて *in vivo* での効果を検証することを計画し、これら親世代を用意した。また、マウスモデルを用いて薬効検証の可能性も考え、Engrailed 変異マウスの予備実験を行い、生後 30 日で 60% 程度の黒質緻密部ドパミン神経細胞の脱落が起こることを確認した。さらに、MPTP 投与マウスモデルの確立も行い、投与後 14 日目で黒質緻密部ドパミン神経細胞が 65% 程度脱落することを確認した。

(3) パーキンソン病新規サロゲートマーカーの開発

これまでに我々は、 $\alpha$ -シヌクレイン BAC トランスジェニック (Tg) マウスを作製・解析したが、同マウスは脳内  $\alpha$ -シヌクレインの発現量が野生型の 2~3 倍に増加しているものの、PD 様の表現型を示さなかった。同マウスと、PD の最も強力なリスク因子である GBA (*glucocerebrosidase*) ヘテロ変異を持つ交配マウスの解析を行ったところ、12 ヶ月齢で脳内にリン酸化  $\alpha$ -シヌクレインが蓄積することを見出した。同モデルを用いてサロゲートマーカーを見出すことを目的とし、18 ヶ月齢の同モデルを用いて血漿のメタボローム解析と嗅球を用いたマイクロアレイに着手した。

(4) ドパミン神経純化関連技術の開発

細胞移植を目的として、iPS 細胞からのドパミン神経細胞分化誘導過程で CORIN (floor plate マーカー) を発現する細胞をソートすることによって、ドパミン前駆細胞を濃縮できることが報告されている。我々はこの技術を基に、技術改良を行った。すばわち、*in vitro* での神経成熟の促進を図るためソート後の細胞を接着培養とし、接着培養のタイミングを最適化した。この結果、免疫細胞化学で培養細胞全体の 70% 以上に TH の発現が確認される、*in vitro* での高純度ドパミン神経モデルの作製に成功した。

4. その他

なし