

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： オートファジー促進によるミトコンドリアクリアランス上昇を薬理作用とする新たなパーキンソン病治療薬開発
2. 研究開発代表者： 服部信孝（順天堂大学大学院医学研究科神経学）
3. 研究開発の成果

本研究開発の目的は、既存薬スクリーニングから独自に同定したマクロオートファジー誘導作用を持つ 38 種類の薬剤が PARK2/PARK6-iPS 細胞から誘導したドパミン作動性神経細胞において一部残存している PINK1/parkin 非介在性マイトファジーを促進させることによりミトコンドリア機能回復をもたらす、引いては細胞死の回避に繋がるかを検証することである。さらにそのような作用を持つヒット化合物について PARK2/PARK6 患者由来 iPS 細胞由来神経細胞での薬効の証明を図る。

2015 年度は下記の各研究開発項目を実施し成果を得たので列挙する。

(1) PD-iPS のマイトファジー定量方法の確立  
オートファゴソームのマーカータンパク質である LC3 を GFP 標識した GFP-LC3、mt-Keima-Red それぞれを安定的に発現する PD-iPS 株を作成し、オートファジーの経時的・安定的な可視化のツール確立を開始しており GFP-LC3 および mt-Keima-Red のプラスミド構築を終えた。2016 年 3 月 31 日現在 PD-iPS 細胞への過剰発現・安定発現細胞のセレクションを進めている。

(2) オートファジー促進薬の PD-iPS 細胞におけるマイトファジー異常改善効果の検証  
マイトファジー誘導時にはミトコンドリア外膜・内膜蛋白の経時的な分解がウェスタンブロッティング・免疫細胞染色にて観察されるため、通常培養細胞を用いてミトコンドリア内膜タンパク質に対する免疫染色によるオートファジー評価を多検体・小スケール化するべく条件検討を行った。

(3) マイトファジー異常改善効果を有するオートファジー促進薬の PD-iPS 細胞における表現型改善効果の検証

PARK2/PARK6-iPS 細胞より分化誘導した神経細胞に対して、ミトコンドリア脱分極剤である CCCP 添加によるマイトファジー異常検出を InCellAnalyzer2200 により検出できるアルゴリズム (96-well plate を使用) を完成した。

(4) 孤発性 PD 検体由来 iPS 細胞のうちマイトファジー異常を示す症例における薬効評価  
順天堂医院に通院する孤発性 PD 患者など 200 名より iPS 細胞を樹立準備 (T 細胞回収・保存完了) を終え、同患者群の臨床データ (遺伝的背景・性別・発症年齢・内服薬 (levodopa equivalent dose)・罹病期間・合併症の有無など) の入力を完遂しデータベース構築を終えた。

4. その他  
特記すべきこと無し。