

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) 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
(英語) Development of chemical screening system for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells

研究開発担当者 (日本語) 順天堂大学大学院医学研究科神経学 教授 服部 信孝
所属 役職 氏名：(英語) Nobutaka Hatori, Professor and Chairperson, Juntendo University Graduate School of Medicine

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) ヒト iPS 細胞を小スケール・ハイスループットに分化誘導する方法と
開発課題名： PD 表現型の定量方法の確立
(英語) Development of quantitative methods of dopaminergic neurons established from iPS cells with a small scale, high-throughput system

研究開発分担者 (日本語) 順天堂大学大学院医学研究科神経学 准教授 斉木 臣二
所属 役職 氏名：(英語) Shinji Saiki, Associate Professor, Juntendo University Graduate School of Medicine

分担研究 (日本語) 各種 PD-iPS 細胞病態に即した評価系の構築
開発課題名：(英語) Development of assessment system with dopaminergic neurons established from each familial PD-iPS cells

研究開発分担者 (日本語) 順天堂大学大学院医学研究科神経学 助教 石川 景一
所属 役職 氏名：(英語) Kei-Ichi Ishikawa, Assistant Professor, Department of Neurology, Juntendo University Graduate School of Medicine

分担研究 (日本語) 高純度なパーキンソン病疾患感受性細胞 (ドパミンニューロン) の
開発課題名 : 誘導方法の確立
(英 語) Establish of high efficiency inducible method for dopaminergic neurons from
iPS cells

研究開発分担者 (日本語) 順天堂大学大学院医学研究科神経学/ゲノム・再生医療センター
所属 役職 氏名 : 特任教授 赤松 和土
(英 語) Wado Akamatsu, Project Professor, Center for Genomic and Regenerative Medicine,
Juntendo University School of Medicine

分担研究 (日本語) 小スケール・ハイスループットに分化誘導した PD 患者由来ニューロンを
開発課題名 : 用いた化合物/創薬シーズ添加による薬効評価・分子薬理作用の検証
(英 語) Confirmation of pharmacological effects of hits detected by the high throughput
screening system developed by this project

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学理工学部 教授 井本 正哉
所属 役職 氏名 : (英 語) Masaya Imoto, Professor, Faculty of Science and Technology, Keio University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

和文

本研究開発の目的は、不可逆的神経細胞死によって発症し、治療法が対症療法にとどまるパーキンソン病(PD)に対
する根本的治療薬の開発のため、家族性 PD 患者由来 iPS 細胞由来神経細胞を用いたハイスループット化合物スク
リーニングシステムを構築することである。以下、各プロジェクトについて成果を述べる。

1. 遺伝性 PD-iPS 細胞由来モデル細胞(PARK2/6/9、及び新規同定に成功した原因遺伝子 CHCHD2 による常
染色体優性遺伝性 PD)を用いた病態解明
PARK2/6/9 患者由来 iPS 細胞由来神経細胞では、ミトファジー不全を、PARK22-iPS 細胞由来神経細胞
ではレビー小体構成成分である α -synuclein 貯留という表現型を得、孤発性 PD との共通病態の一端を解明
に繋がる端緒を得た。
2. ヒト iPS 細胞を小スケール・ハイスループットに分化誘導する方法と PD 表現型の定量方法の確立
96-well plate 上にて iPS 細胞を播種し、分化誘導したドパミン神経細胞を用いて、ミトファジーをアッセ
イするシステムを確立し、PARK2/6-iPS 細胞由来ドパミン神経細胞での表現型であるミトファジー不全
を確認し、定量化できることを証明した。
3. 各種 PD-iPS 細胞病態に即した評価系の構築
 α -synuclein 凝集メカニズムについての評価系構築は、染色方法の困難さから代替方法を検討しているが、
その他の表現型解析を終えた。
4. 高純度なパーキンソン病疾患感受性細胞 (ドパミンニューロン) の誘導方法の確立
培養条件の最適化・sorting を用いることにより、40-50%の誘導効率を得た。

5. 小スケール・ハイスループットに分化誘導した PD 患者由来ニューロンを用いた化合物創薬シーズ添加による薬効評価・分子薬理作用の検証
本研究開発で構築したスクリーニングシステムを用いて市販阻害薬ライブラリーのスクリーニングを完了し、PINK1/parkin 非介在性マイトファジーを誘導する治療薬候補となる 3 つの薬剤を同定した。

英文

In this research project, we aim to establish a high-throughput chemical screening system with induced-pluripotent stem cell (iPS cell) from familial Parkinson's disease patients to develop novel medicines for the disease.

1. Research on pathogenesis of familial PD (PARK2/6/9/22) using iPS cell-derived dopaminergic neurons:
We detected insufficient PINK1-parkin-dependent mitophagy in dopaminergic neurons from PARK2/6/9-iPS cells, and cytoplasmic alpha-synuclein accumulation in dopaminergic neurons from PARK22-iPS cells, implying of common pathogenesis with sporadic PD.
2. Development of quantitative methods of dopaminergic neurons established from iPS cells with a small scale, high-throughput system:
Using dopaminergic neurons differentiated from iPS cells initially split a 96-well plate, we reconfirmed insufficient mitophagic flux and developed semi-quantitative methods.
3. Development of assessment system with dopaminergic neurons established from each familial PD-iPS cells:
Except for dopaminergic neurons from PARK22-iPS cells presenting with α -synuclein accumulation, which is unable to be detected by normal immunofluorescent methods, we completed development of assessment systems for each dopaminergic neuron from PARK-iPS cells.
4. Establish of high efficiency inducible method for dopaminergic neurons from iPS cells:
Using a FACS sorting system based on endogenous surface marker expression, we improved the inducible efficiency up to 40-50 %.
5. Confirmation of pharmacological effects of hits detected by the high throughput screening system developed by this project:
Using the developed high throughput screening system focusing on mitophagic flux, we identified 3 promising chemicals to enhance PINK1/parkin-independent mitophagy from commercially available 400 chemical library.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2 件、国際誌 13 件)

1. Ichianagi N, Fujimori K, Yano M, Ishihara-Fujisaki C, Sone T, Akiyama T, Okada Y, **Akamatsu W**, Matsumoto T, Ishikawa M, Nishimoto Y, Ishihara Y, Sakuma T, Yamamoto T, Tsuji H, Suzuki N, Warita H, Aoki M, Okano H. Establishment of In Vitro FUS-Associated Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Model Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2016, 6(4), 496-510.
2. Bamba Y, Shofuda T, Kato M, Poo RK, Tateishi Y, Takanashi J, Utsunomiya H, Sumida M, Kanematsu D, Suemizu H, Higuchi Y, **Akamatsu W**, Gallagher D, Miller FD, Yamasaki M, Kanemura Y, Okano H. In vitro characterization of neurite extension using induced pluripotent stem cells derived from lissencephaly patients with TUBA1A missense mutations. *Mol Brain*. 2016, 9(1), 70.
3. **赤松 和土**. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経疾患研究. *実験医学*. 2016, 34, 524-233.
4. **赤松 和土**. iPS 細胞を用いた神経・精神疾患の研究. *分子精神医学*. 2016, 16, 227-233.
5. Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, Tada H, Matsumoto T, Isoda M, Hashimoto R, **Hattori N**, Takahashi T, Morishita S, Tsuji S, **Akamatsu W**, Okano H. Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines. *Mol Brain*. 2016, 9(1), 88.
6. Toyoshima M, **Akamatsu W**, Okada Y, Ohnishi T, Balan S, Hisano Y, Iwayama Y, Toyota T, Matsumoto T, Itasaka N, Sugiyama S, Tanaka M, Yano M, Dean B, Okano H, Yoshikawa T. Analysis of induced pluripotent stem cells carrying 22q11.2 deletion. *Transl Psychiatry*. 2016, 6(11), e934.
7. Hoashi Y, Okamoto S, Abe Y, Matsumoto T, Tanaka J, Yoshida Y, Imaizumi K, Mishima K, **Akamatsu W**, Okano H, Baba K. Generation of neural cells using iPSCs from sleep bruxism patients with 5-HT2A polymorphism. *J Prosthodont Res*. 2016, S1883-1958(16)30106-2.
8. **赤松 和土**. ヒト多能性幹細胞から脳・脊髄の任意領域のニューロンへの誘導技術, *医学のあゆみ*. 2016, 259, 1148-1149.
9. Ouchi T, Morikawa S, Shibata S, Fukuda K, Okuno H, Fujimura T, Kuroda T, Ohyama M, **Akamatsu W**, Nakagawa T, Okano H. LNGFR+THY-1+ human pluripotent stem cell-derived neural crest-like cells have the potential to develop into mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2016, 92(5), 270-280.
10. Okuno H, Nakabayashi K, Abe K, Ando T, Sanosaka T, Kohyama J, **Akamatsu W**, Ohyama M, Takahashi T, Kosaki K, Okano H. Changeability of the fully methylated status of the 15q11.2 region in induced pluripotent stem cells derived from a patient with Prader-Willi syndrome. *Congenit Anom (Kyoto)*. 2016, doi: 10.1111/cga.12206.
11. Hosoya M, Fujioka M, Sone T, Okamoto S, **Akamatsu W**, Ukai H, Ueda HR, Ogawa K, Matsunaga T, Okano H. Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. *Cell Reports* Jan. 2017, 18(1), 68-81.
12. Suzuki S, **Akamatsu W**, Kisa F, Sone T, **Ishikawa KI**, Kuzumaki N, Katayama H, Miyawaki A, **Hattori N**, Okano H. Efficient induction of dopaminergic neuron differentiation from induced pluripotent stem cells reveals impaired mitophagy in PARK2 neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017, 483(1), 88-93.
13. Andoh-Noda T, **Akamatsu W**, Miyake K, Kobayashi T, Ohyama M, Kurosawa H, Kubota T, Okano H. Differential X Chromosome Inactivation Patterns during the Propagation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Keio J Med*. 2017, Jan 20.
14. Takayama Y, Wakabayashi T, Kushige H, Saito Y, Shibuya Y, Shibata S, **Akamatsu W**, Okano H, Kida YS. Brief exposure to

small molecules allows induction of mouse embryonic fibroblasts into neural crest-like precursors. FEBS Lett. 2017, 591(4), 590-602.

15. Nakazawa T, Kikuchi M, Ishikawa M, Yamamori H, Nagayasu K, Matsumoto T, Fujimoto M, Yasuda Y, Fujiwara M, Okada S, Matsumura K, Kasai A, Hayata-Takano A, Shintani N, Numata S, Takuma K, **Akamatsu W**, Okano H, Nakaya A, Hashimoto H, Hashimoto R. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. Schizophr Res. 2017, 181, 75-82.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. iPS 細胞技術を用いた神経疾患解析と治療法開発, シンポジウム (招待講演), **赤松和土**, 第 58 回日本小児神経学会, 2016/6/4, 国内.
2. iPS 細胞技術を用いた神経疾患研究, スポンサーDシンポジウム (招待講演), **赤松和土**, 日本線維筋痛症学会第 8 回学術集会, 2016/9/17, 国内.
3. iPS 細胞技術を用いた神経疾患の病態解明と治療法開発, シンポジウム (招待講演), **赤松和土**, 第 39 回小児遺伝学会, 2016/12/9, 国内.
4. A high throughput assay system to detect mitophagy in iPSC-derived neurons from Parkinson's disease. ポスター, **Kei-ichi Ishikawa**, Akihiro Yamaguchi, Koki Fujimori, Keiko Sakai, Hideyuki Okano, **Nobutaka Hattori** and **Wado Akamastu**, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18, 国内.
5. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経疾患モデル解析の改良, シンポジウム, **赤松和土**, 第 16 回再生医療学会, 2017/3/9, 国内.
6. 神経変性疾患 iPS 細胞モデルの表現型の発現を加速する低分子化合物の探索と評価, ポスター, 志賀 孝宏, 三好 さくら, 葛巻 直子, **石川 景一**, **服部 信孝**, 岡野 栄之, **赤松 和土**, 第 16 回再生医療学会, 2017/3/7, 国内.
7. パーキンソン病 iPS 細胞由来神経細胞を用いた創薬スクリーニング: ハイスループットアッセイ系の構築とその利用, ポスター, 山口 昂大, **石川 景一**, 藤森 康希, 岡野 栄之, **服部 信孝**, **赤松 和土**, 第 16 回再生医療学会, 2017/3/7, 国内.
8. パーキンソン病患者 iPS 由来ドパミン神経細胞を用いた神経保護化合物の薬効評価, ポスター, 寺尾 梢, 志賀 孝宏, 山口 昂大, 田代 悦, **石川 景一**, **斉木臣二**, 岡野 栄之, **服部 信孝**, 井本 正哉, **赤松 和土**, 第 16 回再生医療学会, 2017/3/7, 国内.
9. フィーダーフリー培養系 iPS 細胞を用いた中脳特異神経細胞分化誘導検討, ポスター, **野中里紗**, **石川景二**, 志賀孝宏, **斉木臣二**, **服部信孝**, **赤松和土**, 第 16 回再生医療学会 2017/3/9, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. **赤松和土** 「iPS 細胞を使って神経系の病気に苦しむ患者さんを助けられるか？」 順天堂大学医学部 基礎研究医養成プログラム主催 高校生のための夏休み医学教室: 研究医とのサイエンストーク 2016 年 7 月 26 日

(4) 特許出願

該当なし