

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) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Development of anti-parkinsonian medicine enhancing mitochondrial clearance via autophagy induction.
- 研究開発担当者 (日本語) 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) Prof. Nobutaka Hattori, Department of Neurology, Juntendo University 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) ①PD-iPS のマイトファジー定量方法の確立
②PARK2/6-iPS 細胞の表現型を回復させるオートファジー促進薬剤の探索
- 開発課題名： (英語) ①Development of quantitative mitophagy assay system with PD-iPS cells.
②Exploring autophagy enhancers improving PARK2/6-iPS cells.
- 研究開発分担者 (日本語) 大学院医学研究科ゲノム・再生医療センター 特任教授 赤松 和土
所属 役職 氏名： (英語)
- 分担研究 (日本語) ①孤発性 PD 患者臨床データの集積
②マイトファジー異常を示す症例のスクリーニング
③孤発性 PD 患者由来 iPS 細胞ラインを用いたオートファジー促進薬による薬効評価
- 開発課題名： (英語) ①Clinical data mining of sporadic PD patients、
②Identification and assessment of patients with mitophagy insufficiency detected by iPS-cells oriented assay.

③Analysis of pharmacological effects of mitophagy enhancers on dopaminergic neurons derived from iPS cells of sporadic PD patients.

研究開発分担者 (日本語) 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, Department of Neurology,
Juntendo University Graduate School of Medicine

分担研究 (日本語) ①免疫染色によるマイトファジー定量方法の確立
②検体の iPS 細胞樹立と分化誘導
開発課題名: (英語) ①Immunocytochemical quantitative assessment of mitophagic activity,
②Establishment of dopaminergic neurons from iPS cells.

研究開発分担者 (日本語) 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) PARK2/6-iPS 細胞の表現型を回復させるオートファジー促進薬剤の探索
開発課題名: (英語) Exploring autophagy enhancers improving PARK2/6-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 特任研究員 野中 里紗
所属 役職 氏名: (英語) Research Associate, Juntendo University Graduate School of Medicine

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

パーキンソン病 (以下 PD) は有病率 140 人/10 万人の我が国で 2 番目に多い神経変性疾患で、現在のところ治療は対症療法に留まり、根本的治療法はない。本研究では、我々がこれまで共同研究拠点 (岡野拠点) とともに樹立したミトコンドリアオートファジー (以下マイトファジー) 異常を起因とする遺伝性パーキンソン病患者 PARK2 患者由来 iPS 細胞から誘導した神経細胞を用いて、マイトファジーを定量するスクリーニングシステムを構築した。既に我々はドパミン神経細胞におけるマイトファジーにおいて、PARK2 の原因遺伝子産物 parkin を介さない PINK1/parkin 非介在性マイトファジーの存在を確認しており、本システムを利用し残存するマイトファジーを誘導する創薬シーズを同定すべく創薬スクリーニングを行い、PARK2 患者細胞におけるマイトファジー異常と細胞の脆弱性を改善する新規の PD 治療薬候補を複数同定した。

本研究の成果は下記に詳述する。

I. ハイスループット化合物スクリーニングシステムと評価系構築

PARK2-iPS 細胞を共同研究拠点（岡野拠点）とともに開発した高効率なドパミンニューロン誘導方法（30-60%）を用いて分化誘導し、我々が以前報告した PARK2 由来ニューロンにおけるミトコンドリア内膜蛋白質または蛍光蛋白質を指標としたミトコンドリアクリアランス異常（Imaizumi et al. 2012）をイメージングサイトメーターを用いて定量的に解析するシステムを構築した。本システムは、今後低酸素誘導性マイトファジー・鉄飢餓誘発性マイトファジーという新たな治療ターゲットシステムを調節する化合物のスクリーニングに使用可能であり、さらなるシーズ探索に有用と考えられる。

II. PINK1/parkin 非介在性マイトファジー誘導作用を持つ化合物の同定

I で得られたシステムを用いて、オートファジー誘導化合物 38 種の中から、PARK2-iPS 細胞由来ドパミンニューロンにおいて PINK1/parkin 非依存的マイトファジー促進作用をもち、かつ細胞死抑制作用を持つ既存薬 2 種を同定した。また、同化合物がウェスタンブロットティングおよび免疫染色によるオートファジー活性評価実験により、オートファジーフラックスを促進させることを確認した。現在本化合物の特許取得手続きを進め、非臨床試験・臨床試験を計画している。

III. 孤発性 PD 患者の iPS 細胞由来ドパミン神経細胞を用いた検討

1 年 4 ヶ月の研究期間で、合計 200 症例の孤発性 PD 患者および約 100 名のコントロールおよび疾患コントロールから iPS 細胞樹立用の採血を終え、臨床データの蓄積を終えた。同患者群での iPS 細胞樹立・マイトファジーについてのアッセイを順次進めている。

英文

Parkinson's disease is the second common neurodegenerative disease in Japan. No disease-modifying therapy has been established against this disease. In this research project, collaborating with Okano's group, we aim to establish a high throughput screening system with dopaminergic neurons differentiated from iPS cells and to identify novel chemicals enhancing PINK1/parkin-independent mitophagy with this system. We have completed identification of novel PINK1/parkin-independent mitophagy inducers with dopaminergic neurons derived from PARK2-iPS cells.

- I. Development of a high throughput screening system focusing on mitophagic activity:
Based on a novel inducible method for dopaminergic neurons up to 60 %, we established semi-quantitative system focusing on the amounts of mitochondria unable to be cleared by mitophagy. This system is applicable to drug screening for mitophagic activity induced by hypoxia or iron deficiency.
- II. Identification of chemicals inducing PINK1/parkin-independent mitophagy:
Already, we found 38 chemicals enhancing macroautophagy, which would also enhance non-selective or selective mitophagy. In this context, we checked the effects on mitophagy with the established system and identified 2 chemicals increasing PINK1/parkin-independent mitophagy. We are planning to perform clinical trial of one of them.

III. Analysis of dopaminergic neurons from sporadic PD-iPS cells clinically and experimentally.

We collected T cells from peripheral blood from 200 PD patients and 100 controls and disease controls associated with clinical information. Based on the materials, we are performing phenotype analysis of the dopaminergic neurons from the iPS cells.

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 件、国際誌 件)

1. Ichiyanagi 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, Tsuiji 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, Pooh 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, スポンサーシップシンポジウム (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 Akamatsu, 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クセス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, 石川景一, 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

なし