

PARK2 iPS 細胞を用いたドパミン神経特異的な病態機序解明 —GFP 標識ドパミン神経の形態学的研究—

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ヨコタ ムツミ 横田 睦美
所属等	順天堂大学医学部 神経生物学・形態学講座 助教
プロフィール	ミトコンドリア病モデルマウスの作製・解析やミトコンドリア病患者由来 iPS 細胞を用いた研究を経て、現在はパーキンソン病患者由来 iPS 細胞を用いた研究を行っている。ミトコンドリアを含めたオルガネラの形態学的解析から多様な疾患の発症機構解明を目指している。

1. 研究の概要

本研究では iPS 細胞由来ドパミン神経細胞を GFP 標識することにより、ドパミン神経特異的なミトコンドリア機能・形態解析を通じたパーキンソン病病態機序の解明を目指した。本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いてドパミン神経細胞が GFP 標識された健常者及び患者 iPS 細胞の樹立に成功した。これらの iPS 細胞の樹立により、光顕電顕相関観察法を用いたドパミン神経特異的なオルガネラの超微形態学的解析が可能となったと言える。

2. 研究の動機、目的

パーキンソン病は中脳黒質におけるドパミン神経の変性を特徴とする神経変性疾患であり、本邦でも 10 万人以上のパーキンソン病患者がいると推定される。家族性パーキンソン病の原因因子の 1 つである PARKIN (*PARK2* 遺伝子) は、マイトファジーに代表される損傷したミトコンドリアの分解 (良質なミトコンドリアを維持する機構) に関与している。病態発症の要因としてこの損傷ミトコンドリア分解機構の破綻が示唆されているが、ドパミン神経細胞特異的な変性機序についてはほとんど明らかにされていない。

そこで、CRISPR/Cas9 システムを用いて健常者及び *PARK2* 変異を有するパーキンソン病患者 iPS 細胞内のドパミン神経細胞特異的に発現する Tyrosine Hydroxylase (TH) 遺伝子へ GFP 遺伝子をノックインし、iPS 細胞から誘導したドパミン神経細胞を特異的に GFP 標識する。分化誘導した神経細胞に対して健常者と患者間、GFP 陽性ドパミン神経と GFP 陰性その他サブタイプの神経細胞間で電子顕微鏡の比較解析を行う。これにより、パーキンソン病におけるドパミン神経特異的な形態学的変化を明らかにする。

3. 研究の結果

(1) CRISPR/Cas9 システムを用いた健常者及び患者 TH-GFP iPS 細胞の樹立

ドパミン神経に特徴的なマーカーである TH 遺伝子へ GFP 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムによりノックインするため、ヒト TH 遺伝子エクソン 12 内ターゲット配列を含む sgRNA 発現ベクターを作製した。また、切断部位に隣接した相同配列を含むドナーベクターを作製した。作製したこれらのベクターと Cas9 ベクターを健常者及び *PARK2* 患者 iPS 細胞 (Imaizumi *et al.*, *Mol. Brain*, 2012) へ導入し、薬剤セクションと PCR を行った結果、標的部位に GFP 遺伝子が挿入された TH-GFP iPS 細胞が健常者、患者共に複数クローン得られたことが明らかになった (図 1)。

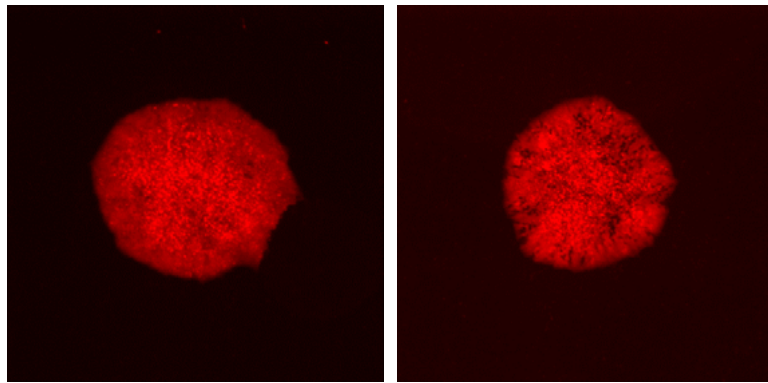


図1. ドナー遺伝子の挿入により RFP を発現している健常者（左）と患者（右） iPS 細胞コロニー

(2) 樹立した TH-GFP iPS 細胞からドパミン神経への分化誘導と有用性の評価

樹立した健常者及び PARK2 患者 TH-GFP iPS 細胞を本学のゲノム再生医療センターで確立された分化誘導方法 (Imaizumi *et al.*, *Stem Cell Reports*, 2015; Matsumoto *et al.*, *Stem Cell Reports*, 2016) に従ってドパミン神経細胞へと分化誘導を行った結果、GFP を発現する細胞が認められた (図 2、左)。さらに、この TH-GFP iPS 細胞由来ドパミン神経細胞に対して TH 抗体と GFP 抗体による免疫染色を行うと、同じパターンの染色像が得られた。これらの結果から、ドパミン神経細胞特異的に GFP を発現する健常者及び患者 iPS 細胞株の獲得に成功したことが確かめられた。これらの iPS 細胞株は光顕電顕相関観察による GFP 発現細胞におけるオルガネラの超微形態学的解析に大変有用である。

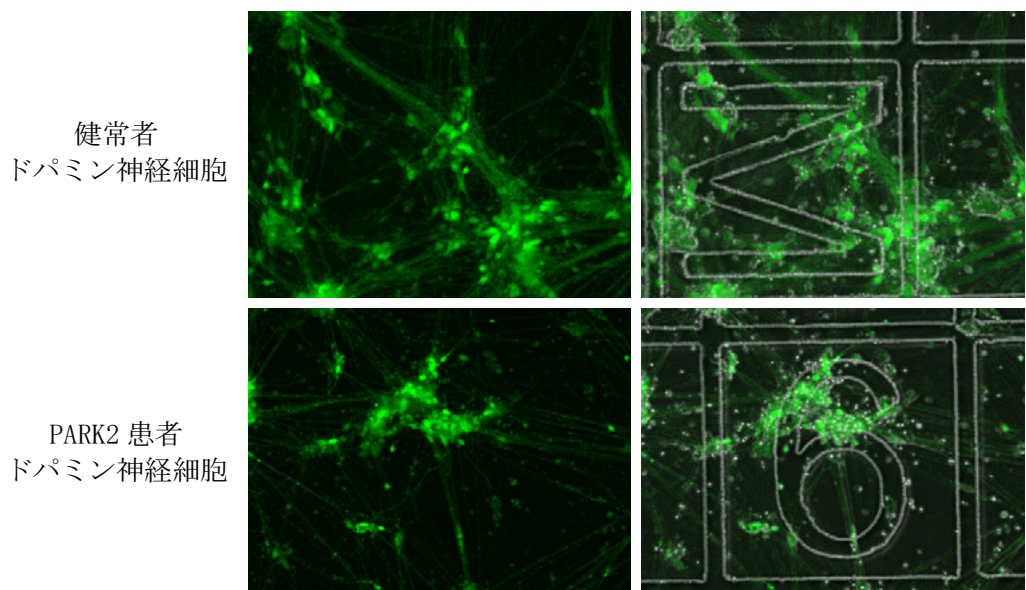


図2. TH-GFP iPS 細胞由来ドパミン神経の蛍光像(左)とグリッドが写る明視野像と統合させた蛍光像 (右)

4. これからの展望

(1) 本研究の今後の展開

本研究で得られた TH-GFP iPS 細胞由来ドパミン神経をグリッド付のカバーガラスに播種して (図 2、右) GFP 陽性ドパミン神経の位置情報を得た後、包埋、電子顕微鏡観察を行う。健常者、患者における GFP 陽性ドパミン神経と GFP 陰性その他サブタイプの神経細胞を比較解析することにより、パーキンソン病におけるドパミン神経特異的なオルガネラの変化を見出す。

(2) 研究者としての今後の目標

緻密に制御された細胞内の生命現象に興味を持ち、ミトコンドリアの研究を続けてきている。細胞内の新しい現象や生命活動におけるミトコンドリアを含めたオルガネラの役割を解明し

ていくことが目標である。

5. 社会に対するメッセージ

本奨励金のご支援のおかげで本研究を遂行することができた。本研究により得られた iPS 細胞株を用いた研究はパーキンソン病の発症機構解明や治療法探索に効果的である。様々な疾患に苦しんでいる患者様や生命現象の知的理解に少しでも貢献できるよう、今後も研究活動に励み、適宜報告を行っていく所存である。