

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06697

研究課題名(和文) ダウン症脳における神経前駆細胞の運命制御の破綻

研究課題名(英文) Studies on molecular mechanisms underlying abnormal differentiation of neural progenitors in a mouse model of Down syndrome

研究代表者

倉林 伸博 (Kurabayashi, Nobuhiro)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・助教

研究者番号：40581658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト21番染色体のトリソミーが原因となるダウン症の脳では、神経細胞数の顕著な低下およびグリア細胞の増加が認められる。この一因として、神経細胞やグリア細胞を生み出す神経前駆細胞の分化異常が考えられるが、これら異常に寄与する遺伝子の実体は不明である。本研究ではダウン症モデルマウスを用いた解析により、神経前駆細胞の分化異常が引き起こされる分子基盤の解明を目指した。その結果、モデルマウスにおけるDYRK1Aの過剰発現が転写因子STATの異常な活性亢進を引き起こし、これが神経前駆細胞におけるアストロサイト分化の亢進に寄与する可能性を見出した。

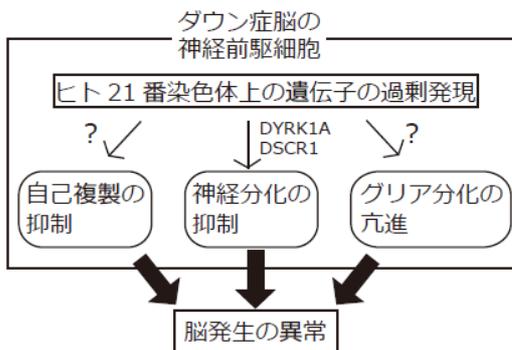
研究成果の概要(英文)：Down syndrome, caused by triplication for human chromosome 21, is associated with abnormalities in brain development such as reduced production of neurons and increased generation of astrocytes. Previous studies suggest that both neuronal and astroglial differentiation of progenitors in Down syndrome brains are deregulated and that the deregulation coordinately contributes to impaired brain development. However, very little is known about the molecular mechanisms underlying abnormal differentiation of Down syndrome progenitors. In this study, we identifies DYRK1A-STAT as a signaling pathway responsible for the enhanced astrocytic differentiation of progenitors observed in a Down syndrome mouse model.

研究分野：発生神経科学

キーワード：ダウン症 神経前駆細胞 アストロサイト DYRK1A STAT

1. 研究開始当初の背景

ダウン症はヒト第 21 番染色体のトリソミーによって誘発され、およそ 800 人の新生児あたり 1 人の割合で発症する。ダウン症は知的障害の最も主要な原因となっており、ダウン症患者の脳は健常者と比較すると顕著に小さい。また、大脳新皮質においては神経細胞の密度および数が減少し、一方でグリア細胞の数が増加している。このことから、神経細胞やグリア細胞の発生異常が知的障害の主要な要因となっていると推察される。また近年、ヒト 21 番染色体の相同領域の一部を 3 倍体化したダウン症モデルマウスが作製され、これらマウスの発生期の脳において、神経細胞やグリア細胞を産生する神経前駆細胞の分化異常が認められることが明らかになった。すなわち、神経前駆細胞から神経細胞への分化が抑制されているのに対し、グリア細胞への分化が亢進していた。さらに神経前駆細胞が分裂し、自らの数を増殖させるプロセス（自己複製）にも異常が認められた。これらのことから、ダウン症の脳においては神経前駆細胞の正常な分化メカニズムが破綻しており、これによって適切な数の神経細胞やグリア細胞が産生されない可能性が高い（図）。しかしながら、ヒト 21 番染色体上のいずれの遺伝子の発現量の増加によって神経前駆細胞の分化プロセスが影響を受けているのか、その理解は殆ど進んでいない。私共はこれまでに、ダウン症モデルマウスの神経前駆細胞において 3 倍体化している遺伝子である DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1A) と DSCR1 (down syndrome critical region 1) が過剰発現することによって、神経分化が抑制されていることを見出した (Kurabayashi and Sanada, Genes Dev. 2013)。しかし、自己複製やグリア細胞への分化といった局面において、制御異常に寄与する遺伝子の実体は不明であった（図）。



図：ダウン症脳の神経前駆細胞における分化異常

従来より、ダウン症モデルマウスを使用した解析の多くには、Ts65Dn マウス（約 104 遺伝子が 3 倍体化）や Ts1Cje マウス（約 81 遺伝子が 3 倍体化）が用いられている。これまでに、Ts65Dn マウスの大脳新皮質においてグリア細胞の数が増加していることが知られていたが (Lu et al., PLOS One 2011)

私共は研究開始より以前の段階で、Ts1Cje マウスを用いた解析により、同様の知見を得ていた。また、Ts1Cje マウスの神経前駆細胞を用いた分化解析から、グリア細胞への分化の亢進が認められた。以上から、Ts1Cje マウスにおいて 3 倍体化している遺伝子群の中に、グリア細胞への分化亢進に寄与する遺伝子が存在すると推察できた。さらに、神経分化期以外の脳発生の時期において DYRK1A (Ts65Dn マウスや Ts1Cje マウスにおいても過剰発現している遺伝子) の役割を解析したところ、神経前駆細胞からグリア細胞が産生される脳発生の後期において DYRK1A を過剰発現させると、グリア細胞への分化が亢進することを突き止めた。以上から、Ts1Cje マウスにおいて見られるグリア分化の亢進の一因として、DYRK1A の過剰発現が寄与している可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ダウン症モデルマウスの神経前駆細胞において観察される分化異常のなかで、発生前期-中期の「自己複製」および発生後期の「グリア分化」という局面に焦点を当てて研究を進める。これらの分化制御の破綻は、ヒト 21 番染色体上のいずれかの遺伝子の発現量が増加することによって起こっている可能性が高い。そこで、野生型マウス脳の神経前駆細胞に遺伝子を導入するという実験を脳発生期の様々な時期において実施し、神経前駆細胞の自己複製やグリア分化に影響を及ぼすヒト 21 番染色体上の遺伝子を同定する。さらに、同定した遺伝子を介した分子シグナリングを解析することにより、目的遺伝子の過剰発現がどのようにして神経前駆細胞の分化異常に寄与するのかを理解する。一方で、見出した遺伝子の過剰発現が、ダウン症モデルマウスにおける神経前駆細胞の分化異常に寄与するかを調べる。そのため、ダウン症モデルマウスにおいて、同定した遺伝子や、その遺伝子を介したシグナリングの機能を人為的に操作することによって、神経前駆細胞において見られる自己複製の異常や分化異常が緩和されることを示す。以上の野生型とダウン症モデルの 2 種類のマウスを用いたアプローチから、ダウン症脳における神経前駆細胞の運命制御異常に寄与するメカニズムの理解を目指す。本研究により、ダウン症における脳形成異常、特に神経前駆細胞の運命制御異常についての分子基盤の理解が飛躍的に前進すると考えられ、これと同時に、ダウン症の治療戦略に重要な示唆を与えることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 神経前駆細胞のグリア分化の亢進に寄与する分子機序の解析

本研究では、ダウン症モデルマウスの脳において、DYRK1A の過剰発現、およびそれに伴う DYRK1A を介した分子シグナリングの制御異常が、神経前駆細胞のグリア分化異常を誘発する可能性に迫る。

従来の研究から、神経前駆細胞のグリア細胞への分化制御において、STAT3 という転写因子の活性が重要な役割を果たしていることが知られる (He et al., Nat. Neurosci. 2005)。STAT3 の転写活性化能はリン酸化によって制御されることが知られ、STAT3 の二量体化や核移行に必要な Tyr705 のリン酸化に加えて、Ser727 がリン酸化されると、STAT3 の転写活性化能が亢進する (Wen et al., Cell 1995)。興味深いことに、DYRK1A は *in vitro* において STAT3 の Ser727 をリン酸化することが知られている (Matsuo et al., J. Immunol. Methods 2001)。しかし、生体においても DYRK1A が STAT3 のリン酸化に重要な役割を果たすかは不明である。さらに、STAT3 Ser727 のリン酸化がグリア細胞への分化制御において果たす役割は明らかになっていない。そこで本研究では、『ダウン症脳の神経前駆細胞において、DYRK1A の過剰発現が STAT3 の転写活性化能の異常亢進を引き起こし、グリア細胞への分化を亢進する』という作業仮説を検証し、ダウン症脳の神経前駆細胞における DYRK1A-STAT3 シグナリングの寄与を明らかにする。具体的には、野生型マウスの神経前駆細胞に DYRK1A 遺伝子を *in vivo* において導入し、脳切片や培養した神経前駆細胞の解析から STAT3 の Ser727 リン酸化レベルや STAT3 の転写活性化能が上昇するかを検証する。さらに、Ser727 のリン酸化状態を模倣した S727D 型の STAT3 を神経前駆細胞に遺伝子導入し、神経前駆細胞のグリア細胞への分化が亢進するかをグリア細胞のマーカー分子の発現解析によって調べる。これと並行して、遺伝子導入した神経前駆細胞を *in vitro* において分化させ、個々の神経前駆細胞がどのような分化様式をとるかを精査する (クローン解析)。以上の実験から、グリア細胞分化における STAT3 Ser727 のリン酸化の重要性を明らかにする。

以上に加えて、ダウン症モデルマウスの神経前駆細胞で認められるグリア分化の亢進において、DYRK1A の過剰発現や STAT3 の活性化が寄与するかを解析する。そのため、Ts1Cje マウス (DYRK1A を含む約 81 遺伝子が 3 倍体化) を用いた実験を展開する。具体的には、前年度と同様の手法を用い、このモデルマウスの神経前駆細胞において DYRK1A の発現量を shRNA によって低下させ、グリア細胞への分化が抑制される可能性を検証する。さらに、この現象と並行して

STAT3 の Ser727 リン酸化レベルや STAT3 の転写活性化能が減少するかを調べる。

(2) 神経前駆細胞の自己複製異常を担う分子の探索

ダウン症モデルマウスの Ts65Dn マウス (約 104 遺伝子が 3 倍体化) や Ts1Cje マウス (約 81 遺伝子が 3 倍体化) に共通してみられる異常として、神経前駆細胞における神経分化の抑制やグリア分化の亢進のみならず、自己複製の障害が知られる (Chakrabarti et al., J Neurosci 2007; Ishihara et al., Cereb Cortex 2010)。そのため、これらマウスに共通して 3 倍体化している遺伝子群の中に、神経前駆細胞の自己複製障害に寄与する遺伝子が存在すると推察できる。そこでまず、以下の基準によって候補遺伝子を絞る。

Ts65Dn マウスと Ts1Cje マウスの両方で 3 倍体化している遺伝子のうち、その遺伝子の容量 (dosage) が細胞機能に重要であると考えられる dosage-sensitive な遺伝子が約 20 遺伝子存在することが知られる (Makino & McLysaght, PNAS 2010)。そこで、これら遺伝子に特に着目して研究を実施する。

これら遺伝子の中で、神経前駆細胞に発現する遺伝子を RT-PCR 解析や *in situ* ハイブリダイゼーション解析によって選定する。

さらに、上記の条件を満たす遺伝子を野生型マウスの神経前駆細胞に *in vivo* で導入することによって過剰発現し、細胞周期のマーカー分子の発現解析によって神経前駆細胞の自己複製に及ぼす影響を精査する。

さらに、ダウン症モデルマウスの神経前駆細胞で認められる自己複製の異常において、同定した遺伝子の過剰発現が寄与するかを解析するため、Ts1Cje マウスを用いた実験を実施する。まず、Ts1Cje マウスの神経前駆細胞において、目的遺伝子が過剰発現していることを確認する。また、shRNA 等を導入して Ts1Cje マウスの神経前駆細胞において目的遺伝子の機能を阻害し、神経前駆細胞の自己複製への影響を精査する。これと併せて、目的遺伝子を介した分子シグナリングの活性を Ts1Cje マウスの神経前駆細胞において人為的に操作し、自己複製の障害が緩和されることを示す。

4. 研究成果

(1) DYRK1A の過剰発現による神経前駆細胞のアストロサイト分化の亢進

研究開始当初における申請者の研究結果から、Ts1Cje マウスにおいて認められるグリア分化の亢進の一因として、DYRK1A の過

剰発現が寄与している可能性が高いと考えられた。これを検証するため、DYRK1A shRNA 発現プラスミドを Ts1Cje マウスの神経前駆細胞に導入し、DYRK1A の発現量低下がアストロサイト分化に及ぼす影響を解析した。その結果、DYRK1A shRNA を導入すると、アストロサイトへ分化する神経前駆細胞の割合が低下することを見出した。これらの結果から、Ts1Cje マウスにおいて認められるアストロサイト分化の亢進において、DYRK1A の過剰発現が寄与することが示唆された。

さらに、「ダウン症脳神経前駆細胞において、DYRK1A の過剰発現が STAT3 の転写活性化能の異常亢進を引き起こし、グリア細胞への分化を亢進する」という作業仮説を検証した。そのためにまず、野生型マウス胎仔脳の神経前駆細胞に DYRK1A 発現プラスミドを導入し、導入細胞における STAT3 のタンパク質レベルおよびリン酸化レベルを培養条件下において解析した。その結果、DYRK1A の過剰発現によって、STAT3 の Ser727 リン酸化レベルが亢進することが判明した。次に、DYRK1A を過剰発現させた神経前駆細胞における STAT の活性を評価しようと考えた。そこで、STAT 結合サイトをもつ Gfap 遺伝子の発現レベルをモニターするためのプロモーターの制御下で短寿命型 GFP を発現するレポータープラスミドを製作した。このレポータープラスミドを子宮内胎仔電気穿孔法によってマウス胎仔脳の神経前駆細胞に導入し、GFP の発現レベルによって STAT 活性を見積もった結果、DYRK1A 発現プラスミドの導入によって STAT 活性が上昇することを見出した。以上から、神経前駆細胞における DYRK1A の過剰発現は、STAT3 のリン酸化レベルや活性を亢進することが示唆された。

神経前駆細胞における DYRK1A の過剰発現によって STAT3 Ser727 リン酸化レベルや STAT 活性が亢進したことから、Ts1Cje マウスにおいても STAT の制御が異常になっている可能性が考えられた。これを検証するため、Ts1Cje マウス的大脑新皮質における STAT3 のリン酸化レベルをウエスタンブロット解析によって調べた結果、STAT3 の Ser727 リン酸化レベルが亢進していることを見出した。さらに、STAT 活性のレポータープラスミドを用いた解析から、Ts1Cje マウスの神経前駆細胞における STAT 活性が異常に亢進していることを見出した。以上の結果を基に、Ts1Cje マウス的大脑新皮質において認められた STAT3 Ser727 リン酸化レベルや STAT 活性の上昇に、DYRK1A の過剰発現が寄与するか否かを調べた。これを検証するため、Ts1Cje 胎仔脳における神経前駆細胞に

DYRK1A shRNA 発現プラスミドを導入し、導入細胞における STAT3 のタンパク質レベルおよびリン酸化レベルを培養条件下において解析した。その結果、DYRK1A の発現抑制によって、STAT3 の Ser727 リン酸化レベルが低下することが判明した。さらに、STAT 活性のレポータープラスミドと DYRK1A shRNA 発現プラスミドを同時に導入した解析から、DYRK1A の発現抑制に伴って STAT の活性が低下することが判明した。以上の結果は、Ts1Cje マウスの神経前駆細胞において認められる STAT3 Ser727 リン酸化レベル、および STAT 活性の亢進において、DYRK1A の過剰発現が寄与することを示唆している(図2)。

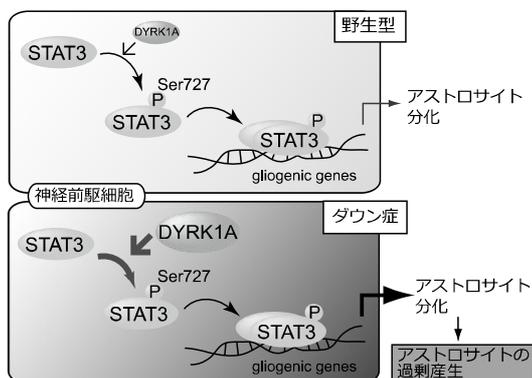


図2 : DYRK1Aの過剰発現による神経前駆細胞のアストロサイト分化の亢進 (モデル)

(2) Ts1Cje マウスにおける神経前駆細胞の自己複製異常のメカニズム

以上から、Ts1Cje マウスの神経前駆細胞における運命制御異常の中で、グリア細胞への分化プロセスの異常と、それが引き起こされる分子基盤を同定した。一方で、神経前駆細胞の自己複製というプロセスにおいては、その異常の詳細や、寄与するメカニズムはほとんど理解されていない。神経細胞に分化することが運命づけられた神経前駆細胞は中間前駆細胞という細胞に変化する。中間前駆細胞は神経細胞数の決定に重要な役割を果たしているため、この細胞の挙動を調べることは、ダウン症脳における発生異常のメカニズムを理解する上で極めて重要である。申請者は本研究において、中間前駆細胞の制御が、Ts1Cje マウス的大脑新皮質において異常になっている可能性を見出した。具体的には、ダウン症モデルマウス脳において、中間前駆細胞の密度が変化しており、これに伴って、中間前駆細胞の細胞周期の制御が異常になっていることが示唆された。また、中間前駆細胞の神経細胞への分化が Ts1Cje マウスにおいて遅延している可能性を示唆するデータを得た。さらに、ヒト 21 番染色体上の遺伝子の中で、過剰発現によってこれら中間前駆細胞の挙動の異常を模倣できる因子を同

定した。これらの結果をさらに発展させることにより、ダウン症モデルマウス脳において、中間前駆細胞の挙動異常が引き起こされる分子基盤の解明が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kurabayashi N and Sanada K. (2017) Molecular Mechanism Underlying Abnormal Differentiation of Neural Progenitor Cells in the Developing Down Syndrome Brain. *Yakugaku Zasshi*. 137, 795-800. doi: 10.1248/yakushi.16-00236-1 【査読有】

2. Takeo Y, Kurabayashi N, Nguyen MD and Sanada K. (2016) The G protein-coupled receptor GPR157 regulates neuronal differentiation of radial glial progenitors through the Gq-IP₃ pathway. *Sci. Rep.*, 6, 25180. Doi: 10.1038/srep25180. 【査読有】

3. Kurabayashi N, Nguyen MD and Sanada K. (2015) DYRK1A overexpression enhances STAT activity and astroglialogenesis in a Down syndrome mouse model. *EMBO Rep.* 16, 1548–1562. doi: 10.15252/embr.201540374. 【査読有】

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Aiki Tanaka Extracellular LPA-mediated regulation of neocortical neuronal migration. International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells 2018, 2018 年

2. 田中 合紀 リゾフォスファチジン酸を介したシグナリングは発生期の脳新皮質における神経細胞の形態変化および移動に必要である 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム2017, 2017年

3. Nobuhiro Kurabayashi DYRK1A overexpression contributes to enhanced astroglialogenesis in a Down syndrome mouse model. Dyrk conference, 2017 年 【invited speaker】

4. 倉林 伸博 ダウン症関連因子 DYRK1A の過剰発現による神経前駆細胞のアストロサイト分化異常 第39回日本分子生物学会年会, 2016年【招待講演】

5. 倉林 伸博 ダウン症脳における神経幹細胞のニューロン分化異常を引き起こす分子基盤 日本薬学会第136年会, 2016年【招待講演】

6. Nobuhiro Kurabayashi Increased dosage of DYRK1A enhances STAT activity and astrocytic differentiation of neocortical progenitors in a mouse model of Down's syndrome. *Neuroscience*2015, 2015年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

アウトリーチ活動の一環として、2015, 2016, 2017年度 東京大学理学部オープンキャンパスにて、申請者が所属する施設の研究紹介を行った。

以下の研究室ホームページにて、申請者らの研究の目的や成果を掲載している。

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/mgrl/sanada/index.html>

また、以下のサイトにて、申請者らの発表した論文のプレスリリースを閲覧できる。

<http://www.s.u-tokyo.ac.jp/ja/press/2015/38.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉林 伸博 (Kurabayashi Nobuhiro)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：40581658

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし