

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01932

研究課題名(和文) 神経変性疾患への適用を目指した神経新生を促進する低分子化合物の開発

研究課題名(英文) Development of neurogenesis inducer for neurodegenerative disorders

研究代表者

小林 亜希子 (KOBAYASHI, Akiko)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80649046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではダウン症(21トリソミー)で神経細胞数の増加を抑えている遺伝子を特定し、その機能を妨げることで神経細胞を正常に増やすことができる化合物アルジャーノンを発見しました。また、ダウン症のモデルマウスがまだ胎仔の時期に母マウスを通してアルジャーノンを投与したところ、大脳皮質の異常や学習行動の低下といった症状が改善されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病やアルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性軸索硬化症(ALS)などの疾患は、脳あるいは脊髄における特定の神経細胞群が徐々に死ぬことで、運動・知覚などの脳の高次機能に異常をきたす。現在のところこれらの疾患に対する根本的治療は存在しない。このような神経変性疾患に対し、特定の低分子化合物により脳・脊髄内に存在する神経幹細胞の増殖を促して新しく神経細胞を産生し、新生した神経細胞に失われた脳の高次機能を代替させることができれば、新たな治療法へと繋がると期待される。また神経新生の低下は精神発達疾患においても示唆されており、本研究による低分子化合物シーズの開発は適用拡大が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Down syndrome (DS) is the most frequent genetic cause of intellectual disability, affecting one in 1,000 live births worldwide. DS is caused by the extra chromosome 21, the prenatal diagnosis of DS is now feasible. Yet, no therapy is currently available. We screened for neurogenesis inducers which can restore impaired proliferation of neural stem cells in DS/DS models and identified ALGERNON (altered generation of neurons) as an inhibitor against DYRK1A encoded in DS critical region of chromosome 21. Treatment of pregnant dams with ALGERNON normalized the morphological abnormal brain development, and most remarkably, impaired neurocognitive behaviors in DS-offspring. These data suggest that the neurogenic phenotype of DS can be prevented by ALGERNON prenatal therapy.

研究分野：神経科学

キーワード：神経新生 ダウン症 シーズ探索

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長らく神経細胞の産生は発達期のみ起こり、成体では起こらないと考えられてきた。しかしながら、近年ヒトの成体脳における神経幹細胞の存在が明らかになり (Eriksson et al., Nature Neuroscience 1998)、さらにヒト脳海馬において一日 700 個の新生神経細胞が産生され、年間 1.75%、生涯でヒト海馬の 1/3 は神経新生により入れ替わっていることが明らかになった (Spalding et al., Cell 2013)。このようにヒトを含む哺乳類成体脳において神経新生が継続しているという発見から、いまだに根幹的治療法のない神経変性疾患に対して神経新生の活性化の適用が期待される。パーキンソン病やアルツハイマー病、筋萎縮性軸索硬化症 (ALS) などの神経細胞が失われていく症候群に対して、神経新生の活性化により、失われた部位を補完させることができれば新たな治療法となり得、その意義は非常に大きい。

2. 研究の目的

本申請研究では、神経変性疾患への適用を目指した神経新生を促す新規化合物の開発を目的とする。パーキンソン病やアルツハイマー病、ハンチントン病、筋萎縮性軸索硬化症 (ALS) などの疾患は、脳あるいは脊髄における特定の神経細胞群が徐々に死ぬことで、運動・知覚などの脳の高次機能に異常をきたす。現在のところこれらの疾患に対する根本的治療は存在しない。このような神経変性疾患に対し、特定の低分子化合物により脳・脊髄内に存在する神経幹細胞の増殖を促して新しく神経細胞を産生し (以下、これを神経新生と称する) 新生した神経細胞に失われた脳の高次機能を代替させることができれば、新たな治療法へと繋がると期待される。また神経新生の低下は精神発達疾患においても示唆されており、本研究による低分子化合物シーズの開発は適用拡大が見込まれる

3. 研究の方法

(1) 神経新生を促進する化合物の探索

セルベースシステムとハイコンテンツ画像解析システムを組み合わせたスクリーニングアッセイシステムを構築・運用することにより神経新生を促進する化合物の取得を目指す。具体的には神経幹細胞の増殖を BrdU のとりこみを指標として評価し、神経新生を促進する化合物の探索を行う。

(2) 疾患モデルでの薬効薬理の確認

(1) で取得した候補化合物の動物個体における薬物動態を測定し、疾患モデルでの適用にあたって十分な体内安定性を確認した後、神経新生が低下しているダウン症モデルや神経変性疾患モデルで薬理作用を評価する。

4. 研究成果

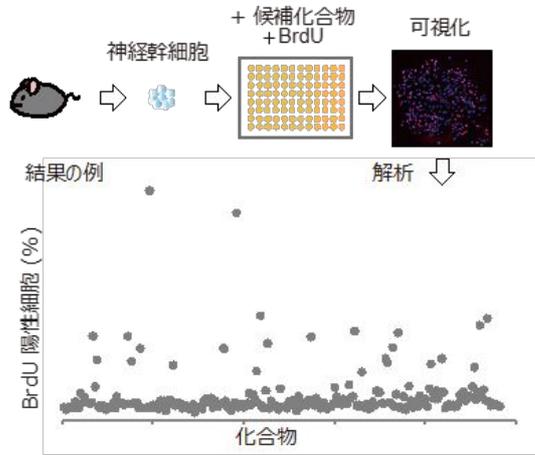
(1) 候補化合物の取得

ダウン症は 21 番染色体が 1 本多いことで生じる染色体異常であり、神経新生が低下していることが知られている。そこで疾患モデルとしてヒト 21 番染色体にあたるマウス 16 番染色体が 1 本多いトリソミーマウス Ts1Cje ダウン症モデルを選択した。トリソミーマウスより神経幹細胞を単離、培養したところ確かに増殖の低下が確認された。

そこで評価系としてマウス神経幹細胞を用いて、ヌクレオシド類自体 BrdU あるいは EdU の取り込みを指標として神経幹細胞の増殖を促進する低分子化合物の探索を行った。ハイコンテン

ト画像解析システムにより自動撮像および解析により、複数の候補化合物の取得に至った。

スクリーニングの模式図



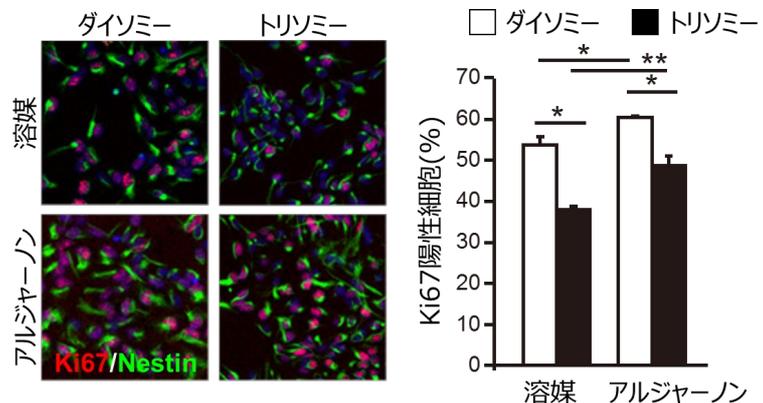
得られた複数の化合物のマウスにおける体内動態解析を行った結果、うち1つが水溶性で経口投与可能であり、また脳組織中への移行も確認されたため、以降の解析は本候補化合物に絞って実施した。成体マウスへ飲水投与により候補化合物を投与した結果、海馬歯状回における神経幹細胞の増殖が促進することを確認した。以上の結果より、候補化合物をアルジャーノン (ALGERNON; Altered generation of neurons) と命名した。

(2)作用機序の同定

(1)でスクリーニングに用いた独自ライブラリはリン酸化酵素を標的としたものであったため、アルジャーノンの309キナーゼパネルプロファイリングを実施した。その結果、GMC9キナーゼファミリーに対する阻害活性を示した。中でもDyrk1Aをコードする遺伝子はヒト21番染色体に位置し、ダウン症候群において高発現していることが知られている。またDyrk1Aは細胞周期G1分子であるサイクリンD1をリン酸化し、その分解を誘導することが知られている。そこで既知のDyrk1A阻害剤処理、またsiRNAを用いたDyrk1Aノックダウンを行った結果、神経幹細胞において増殖が促進すること、またDyrk1Aの基質であるサイクリンD1の発現量が亢進することが確認された。以上の結果より、アルジャーノンはDyrk1Aを阻害することで神経幹細胞の増殖を促進することが示された。

(3)ダウン症由来神経幹細胞における薬効確認

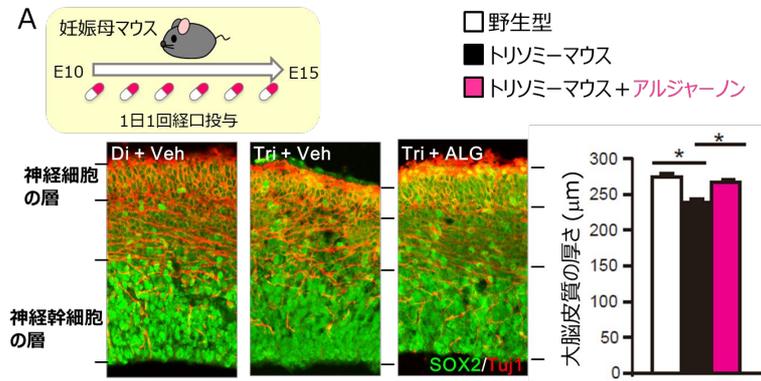
アルジャーノンが実際にダウン症で観察される神経幹細胞の増殖低下を相補できるかどうかを検討するため、ダウン症患者由来線維芽細胞よりiPS細胞を作製し、神経幹細胞への文化誘導を行った。コントロールにはiPS細胞作製過程で重複領域が欠失して得られたクローンを用いた(ダイソミー)。Ki67染色により増殖を確認したところ、トリソミー神経幹細胞においては増殖低下が認められた。アルジャーノンを処理したところ、ダイソミーコントロール神経幹細胞と同程度まで増殖が回復したことが認められた。以上の結果より、アルジャーノンはダウン症における神経幹細胞の増殖低下を改善できることが示された。



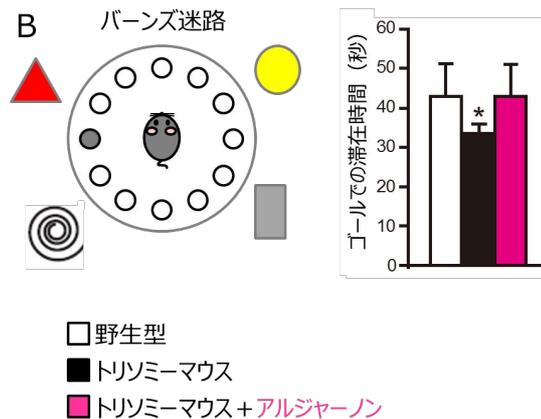
(4)疾患モデルにおける薬効確認

脳発生期に、神経幹細胞は増殖して神経前駆細胞を産生する。神経前駆細胞はその後成熟して脳の層構造を形成する。しかしながら神経新生が低下しているダウン症モデルマウス Ts1Cje

においては、供給される神経細胞数が減少し、結果として脳形成異常および学習低下がみられる。そこで、脳の形成期であるマウス胎生 10 日目～19 日目まで妊娠母マウスにアルジャーノンを投与し、13 日目および 15 日目における神経細胞層の厚さを解析した結果、トリソミーマウスにおいて薄層化が観られた神経細胞層が回復していることが確認された。



また生まれた仔マウスの学習行動を解析した結果、改善した学習スコアを示した。



以上の結果は、脳発生時に低下している神経幹細胞の増殖を是正することにより、トリソミーマウスの脳形成不全および学習機能を改善する可能性を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Nakano-Kobayashi A, Awaya T, Kii I, Sumida Y, Okuno Y, Yoshida S, Sumida T, Inoue H, Hosoya T, Hagiwara M
Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice.
Proc Natl Acad Sci USA 査読あり, 114 (38):10268-10273 (2017)
doi: 10.1073/pnas.1704143114
2. Arbones ML, Thomazeau A, Nakano-Kobayashi A, Hagiwara M, Delabar JM
Parmaicol Ther 査読あり, 194:199-221 (2019)
doi: 10.1016/j.pharmthera.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Akiko Nakano-Kobayashi, Tomonari Awaya, Isao Kii, Yuto Sumida, Yukiko Okuno, Keiko Wanezaki, Suguru Yoshida, Tomoe Sumida Haruhisa Inoue, Takamitsu Hosoya and Masatoshi Hagiwara
Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice
WCP2018/18 th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan (July, 1-6, 2018).
2. Akiko Nakano-Kobayashi, Tomonari Awaya, Isao Kii, Yuto Sumida, Yukiko Okuno, Keiko Wanezaki, Suguru Yoshida, Tomoe Sumida Haruhisa Inoue, Takamitsu Hosoya

and Masatoshi Hagiwara

Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice

The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan (July 26-28, 2018)

3. **Akiko Nakano-Kobayashi**, Tomonari Awaya, Isao Kii, Yuto Sumida, Yukiko Okuno, Keiko Wanezaki, Suguru Yoshida, Tomoe Sumida Haruhisa Inoue, Takamitsu Hosoya and Masatoshi Hagiwara

Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice

ISDN2018 (22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience), Nara, Japan (22-25 May 2018)

4. 小林亜希子他

Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice

ConBio2017, Kobe, Japan (6-9th, Dec, 2017)

5. **Akiko Nakano-Kobayashi**, Tomonari Awaya, Isao Kii, Yuto Sumida, Yukiko Okuno, Keiko Wanezaki, Suguru Yoshida, Tomoe Sumida Haruhisa Inoue, Takamitsu Hosoya and Masatoshi Hagiwara

Repression of DYRK1A restores impaired cortical development and abnormal learning behavior of Down syndrome mice

DYRK1A Conference (29-31st, March, 2017) France

6. 小林亜希子他

ダウン症モデルでの神経新生の低下を改善する DYRK1A 阻害剤の創薬

日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会、京都(15-17th, May, 2016)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：神経新生に関する化合物及び医薬組成物

発明者：萩原正敏、小林亜希子

権利者：国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：PCT/JP2017/031453

出願年月日：2017

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kyoto-u.ac.jp/explore/theater/>

<https://youtu.be/DIDe8bGMzg8>

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。