

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15709

研究課題名(和文) 新たな病態概念に基づいたダウン症候群の中枢神経系病変の解析

研究課題名(英文) Analysis of neuropathological phenotypes in Down syndrome based on the new disease concept

研究代表者

南原 利彦 (Nambara, Toshihiko)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00812166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群は知的障害・認知障害を必発する。21トリソミーによる遺伝子量効果が原因と考えられているがそのメカニズムはよく分かっていない。本研究課題では、「ダウン症候群にみられる中枢神経病変は、21番染色体の「遺伝子量効果」と、「トリソミー誘導性ストレス」のふたつが作用することによって発症する」という仮説をもとに、疾患特異的iPS細胞と神経分化誘導、そしてゲノム編集技術を組み合わせ、その検証を行った。そしてAneuploidy-associated stressが神経細胞にタンパク凝集体の蓄積と神経細胞死を起すこと、低分子シャペロンである4-PBAが細胞死を軽減することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において見出された「Aneuploidy-associated stress」は、ダウン症神経細胞においてもアポトーシスという強い影響を与えていることが分かった。しかも4-PBAという化合物がその予防に奏効することを明らかにしたことで、今後ダウン症神経病態の治療薬となる可能性があるだろう。このことは平均寿命が60歳以上と長くなりつつあるダウン症者のQOL向上に役立つと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Individuals with Down syndrome (DS) commonly show unique pathological phenotypes throughout their life span. Besides the specific effects of dosage-sensitive genes on chromosome 21, recent studies have demonstrated that the gain of a chromosome exerts an adverse impact on cell physiology, regardless of the karyotype. We investigated cellular stress responses in human trisomy 21 and 13 neurons differentiated from patient-derived induced pluripotent stem cells. Neurons of both trisomies showed increased vulnerability to apoptotic cell death. In addition, misfolded protein aggregates were abnormally accumulated in trisomic neurons. Intriguingly, treatment with sodium 4-phenylbutyrate, a chemical chaperone, successfully decreased the formation of protein aggregates and prevented the progression of cell apoptosis in trisomic neurons. These results suggest that aneuploidy-associated stress might be a therapeutic target for the neurodegenerative phenotypes in DS.

研究分野：小児科学

キーワード：iPS細胞 ゲノム編集 ダウン症候群

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は 700 人に 1 人という小児遺伝性疾患において最も高い頻度で発症し、精神発達障害、先天性心疾患、白血病など多彩な合併症を呈する。とくに神経系に顕著な影響をおよぼし、小児期には精神発達障害を、成人期には認知障害を発症する。一般的にダウン症候群に見られるこれら多様な合併症は、21 番染色体の過剰により、特定の遺伝子コピー数が 1.5 倍に増えることで起こる“遺伝子量効果 (gene dosage effect)”が原因と考えられており、各合併症を引き起こす原因遺伝子の同定が試みられてきた。しかし各病態につながる決定的な責任遺伝子の同定は容易でなく、また有力な候補としてあげられた遺伝子の過剰発現を行っても必ずしも病態が再現できないなど、異なる発症機序の関与が示唆されている。

申請者は、これまでヒト iPS 細胞とゲノム編集技術・染色体工学を組み合わせることで精緻な疾患モデルを構築し、ダウン症候群の病態解析を行ってきた。そしてヒトで出生可能な 13, 18, 21 トリソミー患者由来の皮膚線維芽細胞をもちいた研究を行う過程で、(特定の遺伝子による作用ではなく)染色体異常そのものが引き起こす共通のストレス作用 (Aneuploidy-associated stress) が存在することを見出した。この細胞ストレス作用は、タンパク質恒常性の破綻と酸化ストレスの増大、そして細胞内凝集体の蓄積を誘導し、皮膚線維芽細胞では強い細胞早期老化をもたらす。つまりダウン症候群の多様な合併症は、この「遺伝子量効果」と「トリソミー誘導性ストレス」というふたつのメカニズムが、組織細胞ごとにさまざまに作用し合うことによって発症するのではないかという考えに至った。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、「ダウン症候群にみられる多様な中枢神経症状は、“21 番染色体の遺伝子量効果”と、“トリソミー誘導性ストレス”のふたつが作用することによって発症する」という仮説をもとに、この両者が神経細胞の発達段階、ならびに成熟段階においてどのような病態の形成につながっているのかを明らかにすることを目的とする。すでに 13, 18, 21 トリソミー症候群患者から得た皮膚線維芽細胞を詳細に解析することにより、細胞内凝集体の形成から細胞早期老化にいたるメカニズムを明らかにしており、染色体トリソミーはゲノムワイドな遺伝子発現およびタンパク質合成の亢進を誘導すること、この合成亢進はエネルギー代謝需要を増大させ、ミトコンドリア機能を破綻させること、さらに合成したタンパク質の分解にも過剰な負荷がかかり、処理しきれないタンパク質は凝集体として細胞内に蓄積されるということが明らかとなっていた。そこでこの作用に注目し、ダウン症神経細胞における病態メカニズムを明らかにするとともにその治療薬開発を目指した。

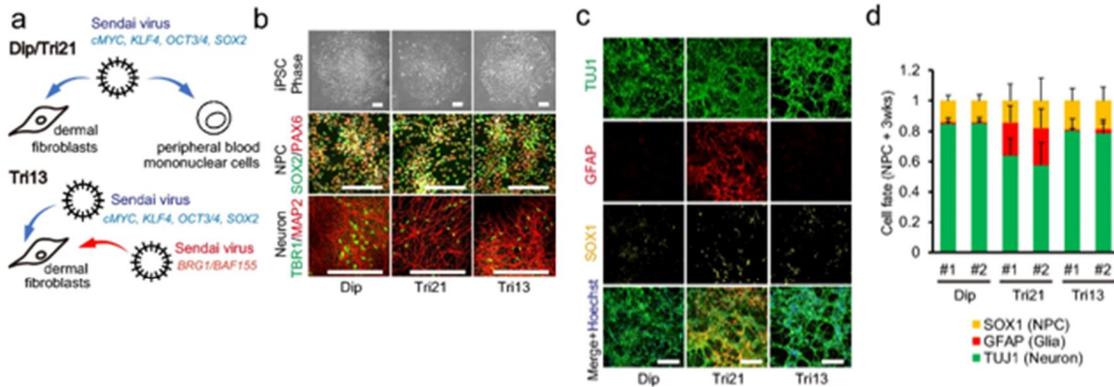
## 3. 研究の方法

染色体異常に共通のストレス作用が神経系においても影響しているのかどうかを調べるため、まずヒトで出生可能な 13, 21 番染色体のトリソミー症候群患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、これらを神経細胞へと分化誘導した。つぎにこれらの神経細胞においてどのような病態が見られるのかを調べた。また皮膚線維芽細胞で見られたタンパク凝集体が神経細胞においても蓄積されているのか、それを化合物によって制御可能であるのかについて検討をした。

## 4. 研究成果

### 1. トリソミー特異的 iPSC の樹立と神経分化誘導

まず健常児、13, 21 トリソミー患者から採取した皮膚線維芽細胞および末梢血単核球を用いて、疾患特異的 iPS 細胞の樹立を行った。山中 4 因子を搭載したセンダイウイルスベクターを感染させ、得られたコロニーをピックアップした。樹立した iPS 細胞はいずれも ES 細胞様の形態を表し、未分化マーカーの発現が見られ、かつテラトーマ形成にて 3 胚葉への分化能をもつことが確認された (図 1a)。つづいてこれらの iPS 細胞から胚様体形成を介した神経分化誘導を行った。ディプロイド、トリソミーのいずれもロゼットが形成され、SOX1, SOX2, PAX6, Nestin 陽性の神経前駆細胞 (NPC) を単離することができた (図 2b)。さらにこの NPC から TUJ1 陽性神経細胞、GFAP 陽性アストロサイトへと分化誘導が可能であった。ディプロイド・トリソミー 13 ではそれらの細胞比率は同じであったが、トリソミー 21 においてのみ、GFAP 陽性アストロサイトの比率が高いことが分かった (図 1c, d)。

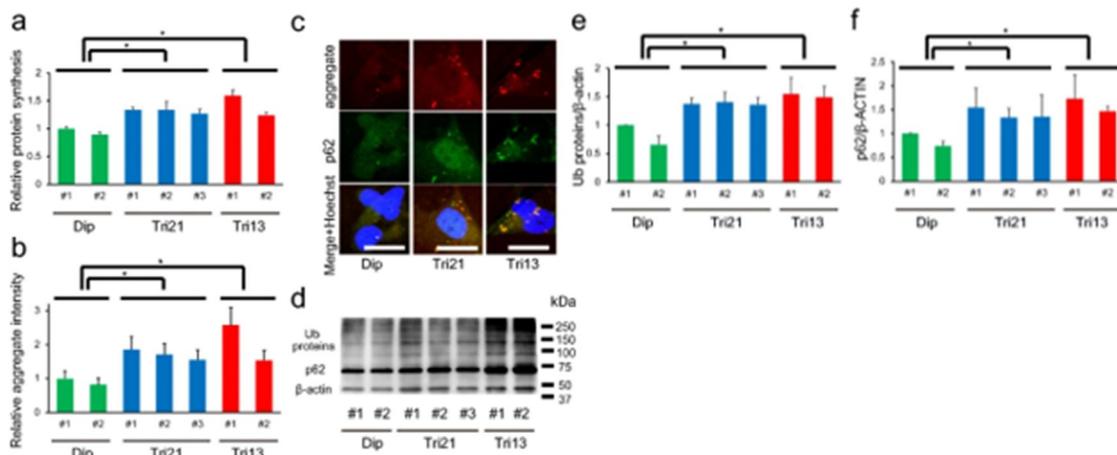


**図 1. トリソミー iPS 細胞の樹立と神経系分化誘導**  
 a. ディプロイドおよび 13, 21 トリソミーのリプログラミング b. iPSC、NPC をもちいた形態学的評価 (免疫染色) c. NPC から分化誘導を行い 3 週間目の細胞をもちいた免疫染色。d. NPC から分化誘導を行い 3 週間目の細胞での神経系 (TUJ1)、アストロサイト (GFAP)、神経前駆細胞 (SOX1) の発現比較

## 2. トリソミー NPC におけるタンパク合成の破綻

これまでの研究により、トリソミー皮膚線維芽細胞ではタンパク生合成メカニズムに破綻が生じていることが分かっている。そこでトリソミー NPC におけるタンパク合成能を評価した。21 トリソミーおよび 13 トリソミー由来 NPC では、タンパク合成が著明に増加していた (図 2a)。さらにトリソミー NPC では、タンパク凝集体の過剰な蓄積が見られた (図 2b, c)。

タンパク合成は通常ユビキチン・プロテアーゼ系とオートファジー系の 2 つの経路によって維持されている。正しく折りたたまれなかったタンパクが過剰に合成されてしまった場合、タンパク凝集体はアグリソームに濃縮される。トリソミー-21、13 NPC は、高分子量ユビキチンタンパクとユビキチン結合タンパクである p62 を過剰に含んでいることが分かった (図 2d-f)。さらにこれらのアグリソームは p62 と共局在していた (図 2c)。



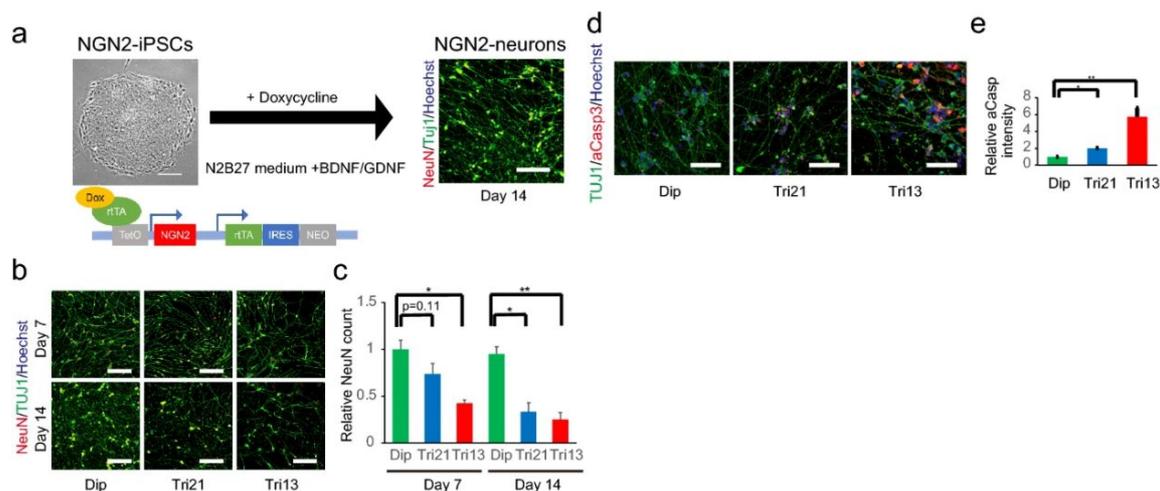
**図 2. トリソミー NPC におけるタンパク合成の破綻**  
 a. ディプロイド、トリソミー NPC における細胞あたりのタンパク合成 b. NPC におけるタンパク凝集体の蓄積 c. NPC におけるタンパク凝集体、p62、Hoechst 33342 の免疫染色 d. NPC におけるユビキチン化タンパクおよび p62 のウェスタンブロット e, f. ユビキチン化タンパク (e) および p62 (f) のタンパク量の定量化

## 3. NGN2 強制発現による iPS 細胞の神経分化誘導とトリソミーにおける神経細胞死

上述の NPC におけるタンパク生合成の破綻が成熟した神経細胞にどのような影響を及ぼすのかを知るために、iPS 細胞に神経分化の制御因子である neurogenin 2 (NGN2) を強制発現することで分化誘導を行った。Tet 誘導システム制御下の NGN2 を piggyBac ベクターで遺伝子導入し、薬剤選択を行った (図 3a)。Doxycycline (Dox) を投与された iPS 細胞は、14 日目に成熟神経細胞の形態を呈し神経マーカーである MAP2, TUJ1, VGLUT1, BRN2 の発現が見られた。また NGN2-neuron では、未分化マーカーの発現は消失した。チミジンアナログである EdU を用いて増殖細胞

胞の割合を調べると、7日目には約10%、14日目にはほぼ消失したことから、NGN2の強制発現により細胞増殖能が急激に低下していることが分かった。

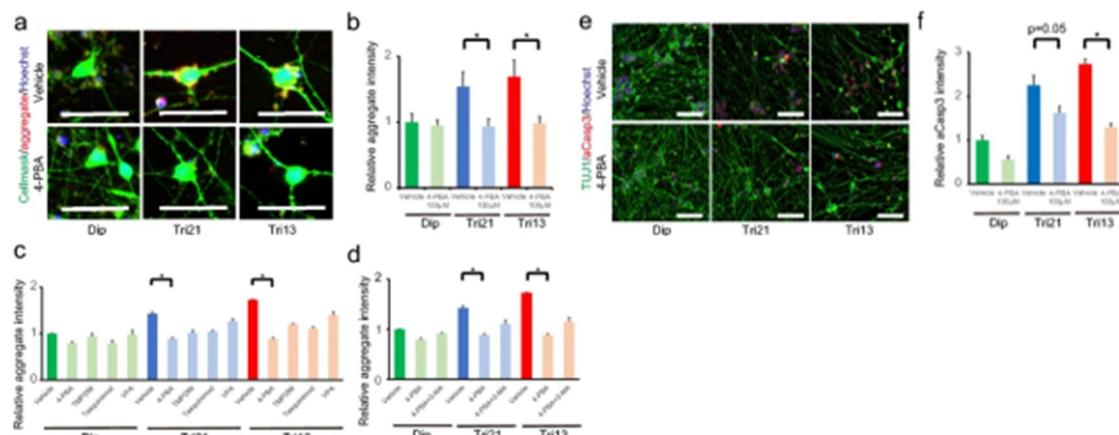
ディプロイドとトリソミーとのあいだに細胞増殖能に違いはなく、ディプロイドではNeuN陽性神経細胞の数は7日目と14日目とで違いはなかった。しかしトリソミーでは、14日目に神経細胞の著明な減少が認められた(図3b, c)。Cleaved caspase 3をもちいて調べると、トリソミー-21、13神経細胞ではディプロイドに比較して細胞アポトーシスの有意な増加が見られた(図3d, e)。この結果は、トリソミー-21 iPS細胞から染色体除去を行ったcorrected disomy 21 iPS細胞や、トリソミー-13 iPS細胞から13番染色体が自然に消失したrescued disomy 13 iPS細胞というisogenic細胞株においても確認することができた。



**図 3. NGN2 強制発現による iPS 細胞の神経分化誘導とトリソミーにおける神経細胞死**  
a. NGN2 強制発現による神経分化誘導 b. NGN2 誘導 7 日目および 14 日目のディプロイド、トリソミー神経細胞の免疫染色 c. NGN2 誘導 7 日目および 14 日目の NeuN 陽性神経細胞数 d. NGN2 誘導 14 日目の cleaved caspase 3 (red), TUJ1 (green), Hoechst 33342 (blue)の免疫染色 e. NGN2 誘導 14 日目の cleaved caspase 3 陽性細胞の比率

#### 4. 4-PBA によるトリソミー神経細胞におけるタンパク凝集体蓄積および細胞死の改善

これまでの研究により、ケミカルシャペロンおよびヒストン脱アセチル化阻害剤である 4-Phenylbutyrate (4-PBA) がトリソミー皮膚線維芽細胞におけるタンパク凝集体の蓄積を軽減し、その早期老化を抑制することを見出している。この化合物がトリソミー神経細胞においてもタンパク合成と病的表現型を改善するのかを検討するため、NGN2 神経細胞を 4-PBA で処理を行った。4-PBA の投与により、トリソミー-21、トリソミー-13 の両方の NGN2 誘導トリソミー神経細胞においてタンパク凝集体の蓄積が抑制された(図 4a, b)。他の HDAC 阻害剤であるバルプロ酸、TMP-269、tasquinimod を投与すると同傾向のタンパク凝集体低下が認められたが、4-PBA と比較してその効果は小さかった(図 4c)。さらにオートファジー阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) を 4-PBA 処理細胞に加えると、タンパク凝集体の蓄積が部分的に軽減した(図 4d)。トリソミー神経細胞において GAD153/CHOP 比は低下し(図 4c, d) かつ重要なことに、アポトーシスの割合が低下した。これらの事実から、4-PBA はトリソミー症候群における神経変性作用の予防に有用であることが示唆された。



**図 4. 4-PBA によるトリソミー神経細胞におけるタンパク凝集体蓄積および細胞死の改善**

a. NGN2 誘導トリソミー神経細胞におけるタンパク凝集体の免疫染色 b. NGN2 誘導トリソミー神経細胞におけるタンパク凝集体の定量 c. NGN2 誘導トリソミー神経細胞における HDAC 阻害剤投与の効果 d. NGN2 誘導トリソミー神経細胞における 4-PBA および 3-MA 処理の効果 e. 4-PBA 処理を行った NGN2 誘導トリソミー神経細胞における TUJ1 および cleaved caspase 3 の免疫染色 f. 4-PBA 処理を行った NGN2 誘導トリソミー神経細胞における cleaved caspase 3 の定量

今回の研究により、トリソミー症候群では Aneuploidy-associated stress が作用しており、神経細胞においてもタンパク生合成機構の破綻に基づくタンパク凝集体蓄積とアポトーシスが起きていることが分かった。さらにケミカルシャペロンである 4-PBA がその細胞死を抑制する作用をもっていることが判明した。4-PBA は内服可能で Blood-brain barrier を透過することのできる薬剤である。さらに尿素サイクル異常症に対する治療薬として US Food and Drug Administration (FDA) に認可を受けている。今後ダウン症候群の新たな治療法として期待が持たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirata Katsuya, Nambara Toshihiko, Kawatani Keiji, Nawa Nobutoshi, Yoshimatsu Hidetaka, Kusakabe Haruna, Banno Kimihiko, Nishimura Ken, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Taniguchi Hidetoshi, Arahori Hitomi, Wada Kazuko, Ozono Keiichi, Kitabatake Yasuji	4. 巻 10
2. 論文標題 4-Phenylbutyrate ameliorates apoptotic neural cell death in Down syndrome by reducing protein aggregates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70362-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------