

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03619

研究課題名(和文) 治療薬開発へつながるダウン症候群の神経病態発症原理の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology in neural dysfunction of Down syndrome for the drug discovery

研究代表者

北畠 康司 (Kitabatake, Yasuji)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80506494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群では多彩な神経症状が見られる。近年、21番染色体の遺伝子量効果に加えて、染色体異常そのものが引き起こす病的作用が存在することが報告されつつある。本研究では21、13トリソミーiPS細胞から分化した神経細胞をもちいて細胞ストレス反応について研究を行い、トリソミーの神経細胞ではタンパク質恒常性の破綻によって神経細胞死が起こることが分かった。一方、ダウン症iPS細胞とXIST遺伝子による染色体不活化、ゲノム編集技術をもちいることで遺伝子背景がそろった細胞株パネルを樹立した。これらの解析によって、ダウン症アストロサイトの異常増殖にはDYRK1A遺伝子が原因遺伝子であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダウン症候群は700人に1人と高い発症頻度であり、知的障害をもたらす遺伝性疾患では最多である。さらに50年前にはダウン症者の平均寿命は約3歳であったにもかかわらず、医療の進歩により現在では約60歳であり、この50年間で50年以上伸びた。この急激な変化により、これまで気付かれなかった成人期の認知障害が近年大きな問題として浮かび上がってきているがその研究はまったく進まず治療法もない。本研究課題においてえられる成果は、これまであまり顧みられなかったダウン症候群の臨床を前進させ、患者本人のみならずその両親・介護者の日常生活の向上に大きく役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：Individuals with Down syndrome (DS) commonly show various neurological phenotypes. 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. In this study, 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, accompanied by dysregulated protein homeostasis. On the other hand, we established a human isogenic cell line panel based on DS-specific induced pluripotent stem cells, the XIST-mediated transcriptional silencing system in trisomic chromosome 21, and genome/chromosome-editing technologies. Comparative analysis and experimental verification using gene modification reveal dose-dependent proliferation-promoting activity of DYRK1A on DS APCs.

研究分野：小児科学

キーワード：ダウン症候群 iPS細胞 ゲノム編集技術

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は中枢神経障害を呈する代表的な遺伝性疾患であり、小児期には精神発達障害、成人期には認知障害を呈する。これらの病態は、3本に増えた21番染色体上の‘一部の重要な遺伝子’の発現量が1.5倍に増加することで引き起こされると考えられており(遺伝子量効果; gene dosage effect) それぞれの病態につながる責任遺伝子の同定が行われてきた。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ダウン症候群の病態解析を進めてきた。これまでにダウン症新生児に発症し白血病の前段階とされている‘一過性骨髄異常増殖症’の発症メカニズムを明らかにし、さらにその責任遺伝子群(RUNX1, ETS2, ERG)の同定に成功した。一方で、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により、(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(トリソミー誘導性ストレス)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細胞内凝集体の過剰蓄積を誘導し、皮膚線維芽細胞では強い細胞早期老化をもたらす。ダウン症候群の多様な合併症は、「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」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修飾することによって発症するのではないだろうか。もしそうであるとするならば、中枢神経系においてこのふたつのベクトルは、どのような病態をもたらしているのだろうか。両方のメカニズムを明らかにすることで、新規のダウン症神経障害に対する治療薬の開発につながるのではないだろうか。

## 2. 研究の目的

ダウン症候群では多彩な神経症状が見られる。21番染色体の‘遺伝子量効果’がその原因と考えられてきたが、その効果をさらに修飾する強い病的作用が存在すると思われる。申請者は染色体トリソミーの研究を通じ染色体異常そのものに強い細胞ストレス作用が存在することを見出した。そこで本研究課題では『ダウン症候群に見られる中枢神経系の病態は‘21番染色体の遺伝子量効果’と‘すべての染色体に共通のストレス作用’の両者が複雑に作用することによって発症する』という仮説をもとに、以下の解析を進めることを目指した。

iPS細胞にゲノム編集技術を駆使することで精緻な疾患モデルを樹立し、

量効果をおよぼす責任遺伝子の探索を行うとともに、

トリソミー誘導性ストレスがもたらす病態形成過程を追う

これによりダウン症の中枢神経障害に対する真の治療薬開発につながると期待できる。

## 3. 研究の方法

疾患モデルの樹立と病態責任遺伝子同定に関して、我々はすでに遺伝子欠失・領域欠失・染色体除去など、さまざまな遺伝子改変を21トリソミーiPS細胞に施し、疾患モデル細胞の樹立に成功している。さらに本研究課題において、21トリソミーiPS細胞とゲノム編集技術、X染色体不活化を引き起こすXIST遺伝子を組み合わせることで、1つの細胞において、21番染色体上の遺伝子発現におけるダイソミー/トリソミーの状態を可逆的に作り出すことのできる疾患モデルを樹立し、病態変化につながる責任遺伝子の同定を目指した。XISTはX染色体上にコードされるnon coding RNA遺伝子である。雌性受精卵におけるX染色体不活化の際に、Xist RNAは2本のX染色体のうち片方からのみ発現してX染色体の一本全体を覆い、その遺伝子発現を不活化する。この不活化は同一染色体上でのみ(cisに)起こり、最終的には染色体全体を不活化させる。このXIST遺伝子を、ゲノム編集技術をもちいて21トリソミーiPS細胞のもつ3本の21番染色体に挿入し、テトラサイクリン誘導システム(Tet-On 3G)によって発現制御を行うことを目指した。この系をもちいることで、21番染色体上の遺伝子発現量は、Dox依存性に3つから2つ分へと減少する。すなわち、“ゲノムレベルでは依然として21トリソミーだが、遺伝子発現レベルではダイソミー”というユニークな系が得られる。このXIST-iPS細胞をさまざまな細胞系列へと分化誘導し、病的表現型と遺伝子発現パターンを比較することにより、責任遺伝子の同定が可能になると考えられる。

トリソミー誘導性ストレスがもたらす病態の解明に関しては、13, 18, 21トリソミーiPS細胞から神経細胞への分化誘導を行い、これらにおけるタンパク質恒常性に関して調べると共にその病態を阻害することのできる化合物探索を行うことを目指した。

## 4. 研究成果

### iPS細胞とゲノム編集技術による精緻なダウン症疾患モデルの構築;

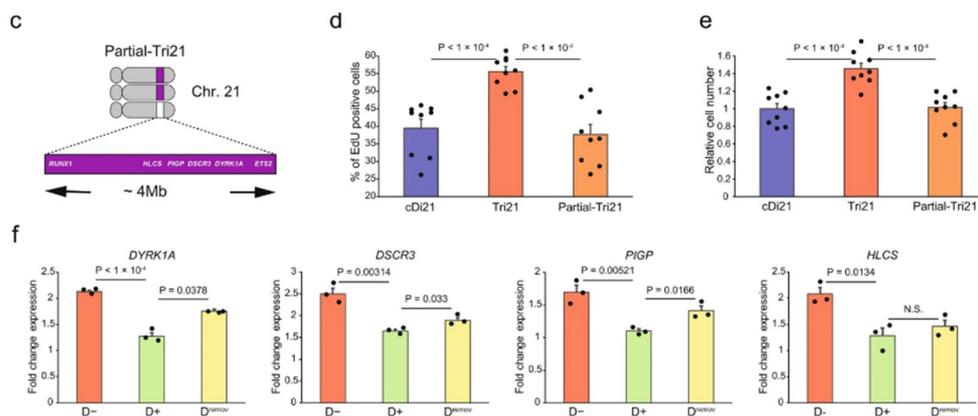
Tet-On 誘導システム下に XIST 発現を制御する 21 トリソミー iPS 細胞を作成するため、まず

ダウン症 iPS 細胞の AAVS1 領域 (ヒト 19 番染色体上にある安全領域) に、CRISPR/Cas9 をもちいて rtTA (テトラサイクリン活性化配列) を挿入した。PGK プロモーター下に Neo 耐性遺伝子をつないだ配列も入れ、Neo による薬剤選択を行うことで目的のクローンを得た。つぎに 21 番染色体上の *DYRK1A* 配列近傍にヒト *XIST* 配列を挿入した。ヒト *XIST* cDNA は 17kb と大きいので 1 ステップで入れるのではなく、まず loxP と lox5171 に挟まれた挿入カセット (EF1 プロモーター + puro tk 配列) を puromycin によるポジティブセレクションによって挿入した (図 2b)。さらにこの挿入カセットが 21 番染色体の一本だけに入ったことを確認した上で、loxP / lox5171 に挟まれた「テトラサイクリン応答配列 (TRE) + *XIST* cDNA」のコンストラクトを、Cre リコンビナーゼをもちいて挿入カセットとの置換を行った。この 2 回目のステップでは、FIAU によるネガティブセレクションを行った。得られたクローンでは Doxycycline の投与によって *XIST* RNA が発現し、さらに 21 番染色体上の遺伝子発現がダイソミーレベルまで低下していることが確認された。

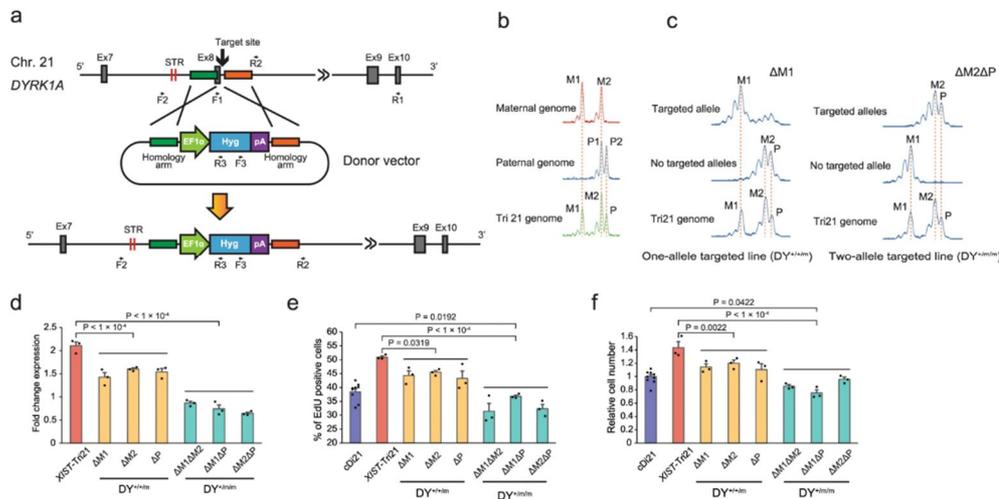
**遺伝子量効果をおよぼす病態責任遺伝子の探索；  
iPS 細胞のアストロサイトへの分化誘導と遺伝子発現確認**

樹立した *XIST*-21 trisomy iPS 細胞を分化誘導し、その解析を行うため、ダウン症候群において細胞増殖の亢進が報告されているアストロサイトに分化誘導をすることとした。

iPS 細胞から SB431252 (10 μM)、Dorsomorphin (2 μM) を加えた浮遊培養を行い、つぎに接着培養を行うと、約 2 週間でロゼットが形成される。このロゼットを丁寧に採取し、N2 / B27 サプリメントとともに培養することで神経前駆細胞 (NPC) を単離した。増殖させた NPC をさらに Astrocyte medium をもちいて培養することで非常に純度の高いアストロサイトを樹立することができた (図 4a, b)。この *XIST*-trisomy21 astrocyte について、EdU をもちいてその増殖率を測定したところ、まず trisomy21 の状態 (D-) では disomy の状態 (cDi21) に比べて有意に増殖率が亢進していた。これに Dox を加えて染色体不活化を誘導することで (D+)、増殖率は低下した。さらに Dox を 3 週間除去することで (D<sup>remov</sup>)、増殖率は再び trisomy と同じく亢進した状態に戻った。この増殖率の変化は、アストロサイト過剰増殖を引き起こす原因遺伝子の発現が染色体不活化によって抑制され、かつ Dox 除去によって再増加したことを示唆する。この APC 異常増殖を引き起こす原因遺伝子を同定するため、まずダウン症候群重要領域 (Down syndrome critical region) と呼ばれる 4Mb の部分を 1 コピーだけ欠失させた部分トリソミー iPS 細胞を作成した (Partial-Tri21 iPS 細胞)。これを APC へと分化誘導してみたところ APC の増殖速度が健常 iPS 細胞と同程度まで抑制されたことからこの領域に原因遺伝子があることが分かった。これらの遺伝子群について D-, D+, D<sup>remov</sup> での発現量を確認してみたところ、*DYRK1A* と *PIGP* のみが増殖率変化と同じ動きをしていることが分かった (図 1)。さらにこれらの遺伝子のノックダウン、過剰発現実験などを重ねることで、*DYRK1A* 遺伝子が APC 過剰増殖を引き起こす原因遺伝子であると考えられた。*DYRK1A* がダウン症における APC 異常増殖の原因遺伝子であることを確認するため、Tri21 iPS 細胞において *DYRK1A* 遺伝子の欠失導入を行った (図 2)。トリソミー-21 iPS 細胞がもつ 3 コピー *DYRK1A* アレルのうち、1 コピー、あるいは 2 コピーを欠失したクローンを得ることができた。それらを APC へと分化誘導してみるとコピー数依存的に増殖率の亢進が認められた。さらにそれらは *DYRK1A* による STAT リン酸化がもたらす JAK-STAT 経路の活性化によるものであることも判明した。



**図 1. 部分トリソミー iPS 細胞 (Partial-Tri21) における APC 増殖率の変化および DSCR 領域にある主要な遺伝子群の発現量の推移**



**図 2. Tri21 iPSC 細胞における DYRK1A 遺伝子の欠失導入**

a. DYRK1A 欠失導入のストラテジー      b, c. DYRK1A の 1 コピーあるいは 2 コピー欠失後の STR 解析  
d. DYRK1A 欠失後の DYRK1A 発現量      e, f., DYRK1A 欠失後の APC 増殖率

### トリソミー誘導性ストレスがもたらす病態形成過程

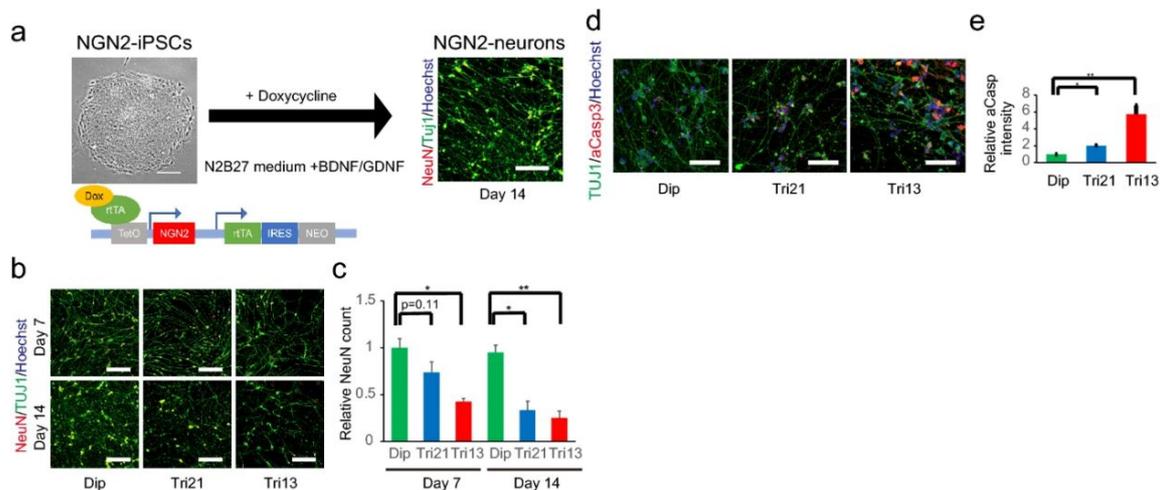
#### 2. トリソミーNPC におけるタンパク合成の破綻

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(図 8)。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。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。

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。さらにこれらのアグリソームは p62 と共局在していた。

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

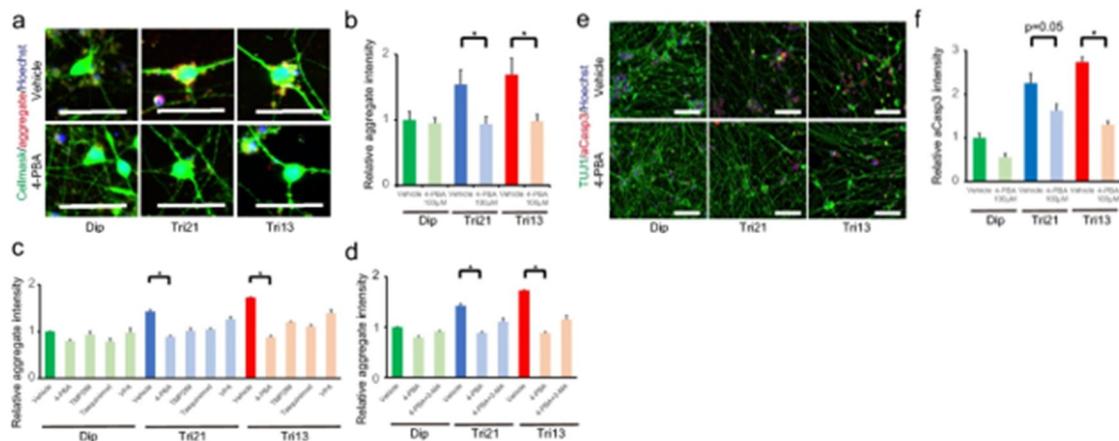
上述の NPC におけるタンパク生合成の破綻が成熟した神経細胞にどのような影響を及ぼすのかを知るために、iPS 細胞に神経分化の制御因子である neurogenin 2 (NGN2) を強制発現することで分化誘導を行った(図 9)。ディプロイドとトリソミーとのあいだに細胞増殖能に違いはなく、ディプロイドでは NeuN 陽性神経細胞の数は 7 日目と 14 日目とで違いはなかった。しかしトリソミーでは、14 日目に神経細胞の著明な減少が認められた。Cleaved caspase 3 をもちいて調べると、トリソミー-21、13 神経細胞ではディプロイドに比較して細胞アポトーシスの有意な増加が見られた。この結果は、トリソミー-21 iPSC 細胞から染色体除去を行った corrected disomy 21 iPSC 細胞や、トリソミー-13 iPSC 細胞から 13 番染色体が自然に消失した rescued disomy 13 iPSC 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生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 10)。



**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

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3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 14047
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 -

1. 著者名 Nawa Nobutoshi, Hirata Katsuya, Kawatani Keiji, Nambara Toshihiko, Omori Sayaka, Banno Kimihiko, Kokubu Chikara, Takeda Junji, Nishimura Ken, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Okuzaki Daisuke, Taniguchi Hidetoshi, Arahori Hitomi, Wada Kazuko, Kitabatake Yasuji, Ozono Keiichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Elimination of protein aggregates prevents premature senescence in human trisomy 21 fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 219592 ~ 219592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0219592	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 -

1. 著者名 Kawatani Keiji, Nambara Toshihiko, Nawa Nobutoshi, Yoshimatsu Hidetaka, Kusakabe Haruna, Hirata Katsuya, Tanave Akira, Sumiyama Kenta, Banno Kimihiko, Taniguchi Hidetoshi, Arahori Hitomi, Ozono Keiichi, Kitabatake Yasuji	4. 巻 4
2. 論文標題 A human isogenic iPSC-derived cell line panel identifies major regulators of aberrant astrocyte proliferation in Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02242-7	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
---------	---------