

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460275

研究課題名(和文) 神経分化早期過程に及ぼすヒト21番トリソミーの作用

研究課題名(英文) influence of trisomy 21 on early neural differentiation

研究代表者

平塚 正治 (Hiratsuka, Masaharu)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00362872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群(21トリソミー)に代表されるような染色体異常症では神経系の発達障害が観察される。その機構を解明するために、前脳領域における神経前駆細胞をモニターするシステムを、ヒト人工染色体ベクターを用いて構築した。このモニターシステムを用いることにより、神経系細胞、特に介在神経やオリゴデンドロサイトの発生・成熟過程の詳細な比較解析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal abnormalities, such as Trisomy for human chromosome 21 (Down syndrome), are thought to be the most common cause of mental retardation. To gain insight into the underlying cellular pathogenesis, we made a new system to monitor differentiation process from forebrain neural precursor cells into interneurons and oligodendrocytes by using a human artificial chromosome vector.

研究分野：染色体工学

キーワード：遺伝子発現モニター 人工染色体 神経分化誘導

1. 研究開始当初の背景

21番染色体の全長あるいは一部のトリソミー化に起因したダウン症候群においては、精神発達遅滞、若年性アルツハイマー病等の神経系疾患や内蔵奇形、眼科的疾患、難聴など様々な合併症が生じるが、トリソミー21によるダウン症候群表現型提示のメカニズムはまだ仮説の域を出ておらず、明確な答えが得られていないのが現状である。しかし、ダウン症候群補領域 (Down Syndrome Critical Region; DSCR) と考えられている 21 番染色体長腕 21q22.12-22 領域とシンテニーを示すマウス 16 番染色体領域の部分トリソミー・マウス (Ts65Dn) や我々の研究室で作製したヒト 21 番染色体を保持したトランスクロモソミック・マウスは記憶・学習能力の低下、脳サイズや神経密度の低下、アルツハイマー病様の神経変性像や心奇形などダウン症と似た表現型を示し (Haydar TF, *et al. Trends Neurosci.* 35: 81-91, 2012., Kazuki Y, *et al. J Neural Transm Suppl.* 67: 1-20, 2003.)、これらのモデルマウスを用いた解析から病因に関わる遺伝子候補が徐々に挙げられている。特に神経系病態発現については、21 番染色体上の特定の遺伝子 (例えば DYRK1、RCAN1、OLIG1/2 や APP) の発現上昇が、その作用メカニズムから発症の原因ではないかとの報告があるが、ダウン症患者やモデルマウスでの 21 番染色体上の遺伝子の発現レベルは概ね 1.5~2 倍程度の上昇であり、高発現細胞株を用いた実験系ではダウン症候群の表現型誘導を説明できているとは考えづらい。この中で、Ts65Dn マウスと TsOlig1/2^{+/-} (Ts65Dn と Olig1/2^{+/-} との交配により Olig1/2 領域のみ 2 コピー化) マウスの比較により、Olig1/2 遺伝子のトリソミー化が大脳皮質抑制性ニューロンの産生を増加させるという結果が得られ、これにより神

経系発達異常が引き起こされるのではないかと考察されている (Chakrabarti L, *et al. Nat. Neurosci.* 13: 927-934, 2010)。一方で、ヒストン H2A のリジン 119 の脱ユビキチン化酵素である Usp16 遺伝子 (ヒト 21q22.11 領域) のトリソミー化が血液幹細胞、神経前駆細胞を初めとして様々な細胞の自己複製能の抑制に関与することが示されている。種々の幹細胞はポリコーム群タンパク質 PRC1 によるユビキチン化により自己複製能を維持しており、Usp16 トリソミー化により PRC1 作用が抑制されたことが原因と考えられる (Adorno M, *et al. Nature.* 501: 380-384, 2013)。ダウン症の複雑な表現系が単一の遺伝子変化で起こるとは考えづらく、Olig1/2 の様な幹細胞で作用する転写因子群やポリコーム群タンパク質を初めとしたクロマチン修飾因子群により形成される自己複製・分化誘導を制御している相互ネットワークの破綻により様々な病態が引き起こされるものと推察される。

ヒト細胞については、ダウン症流産胎児より分離された神経幹細胞からの神経細胞への分化誘導効率が低いことが報告されているが、個体差等の問題があると考えられる。また、ヒトダウン症患者由来 iPS 細胞 (DS-iPS 細胞) から誘導された神経細胞では、アルツハイマー病の病因と考えられているアミロイドβの凝集やその前駆体である APP の発現亢進、酸化ストレスに対する高感受性やグリア細胞への分化傾向が観察されているが、詳細なメカニズムは解明されていない。加えて、これまでに DS-iPS 細胞から誘導された神経細胞そのものは、正常 iPS 細胞由来神経細胞と機能的な面で大きな差は見られておらず、精神発達遅滞に関係すると考えられる知見は得られていない。

2. 研究の目的

ヒト正常及び 21 トリソミー ES/iPS 細胞を用いて、前脳領域の神経前駆細胞に分化誘導後、更に NKX2.1 陽性 MGE(内側基底核隆起)様前駆細胞や NKX2.2 陽性 OPC(オリゴデンドロサイト前駆細胞)への分化誘導を行い、最終的には皮質介在神経あるいはオリゴデンドロサイトまでの分化過程が 21 トリソミーによりどのように影響されるか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト ES/iPS 細胞から神経前駆細胞への分化誘導

SFEBq 法により前脳領域の神経前駆細胞にまず分化誘導し、以後、腹側化因子単独処理あるいはレチノイン酸処理との併用により、NKX2.1 陽性 MGE 様細胞、NKX2.2 陽性 OPC 細胞を作製できるか検討する。

(2) 神経分化モニター用ヒト人工染色体(HAC)ベクターの作製

複数細胞間での分化能評価の精度を向上させるため、NKX2.1 及び NKX2.2 の発現制御領域にそれぞれ RFP、GFP をつないだ神経分化モニター系を HAC ベクターに構築する。このモニター用 HAC ベクター導入細胞株を用いて、NKX2.1 陽性細胞や NKX2.2 陽性細胞への誘導効率を評価すると共に、ソーティングによりこれらの細胞だけを濃縮し、以降の成熟化の過程を詳細に解析する。

(3) 改変麻疹ウィルスタンパクを用いた効率的な HAC 導入法(改変麻疹法)の開発

これまでに我々の研究室で開発した新しい染色体導入法である麻疹法の効率を更に向上させる目的で、ヒト細胞表面で高発現しているトランスフェリン受容体に対する 1 本鎖抗体と H タンパクとの融合タンパクを用いた染色体導入法を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒト正常および 21 トリソミー ES/iPS 細胞の前脳領域神経前駆細胞への分化誘導

正常 ES 細胞 2 株 (KhES-1, r66)、正常 iPS 細胞 2 株 (A5, A6)、人工 21 トリソミー細胞 2 株 (21-16-1, 21-16-5)、ダウン症患者 iPS 細胞 4 株 (DS-4, DS-9, DS-32, DS-33) に対して SFEBq 法を実施した。21 トリソミー細胞についても前脳領域神経前駆細胞への分化誘導に成功した(図 1)。

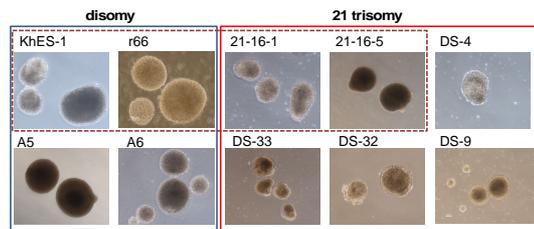


図1. SFEBq法によるヒトES/iPSからの神経前駆細胞誘導

続いて腹側化因子 SHH のアゴニストである purmorphamine 処理、および後分化因子であるレチノイン酸処理の併用により、それぞれ NKX2.1 陽性、NKX2.2 陽性神経前駆細胞に分化誘導できた(図 2)。

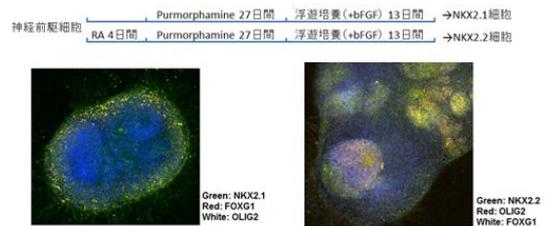


図2. 前脳腹側領域への分化誘導プロトコルの検討

(2) 神経分化モニター用 HAC ベクターの構築

NKX2.1 および NKX2.2 の発現制御領域を HAC 導入用 PAC ベクターにクローニングした後、Cre/loxP システムを用いて 21HAC1 ベクターに搭載させた(図 3)。

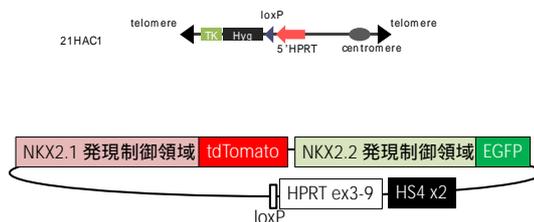


図3. 神経系分化モニター用HACベクターの構築

NKX2.1 および NKX2.2 を共に発現しているヒトグリオーマ細胞 U87MG に、これら HAC ベクターを導入し、動作確認を行ったところ、蛍光観察、qRT-PCR により、EGFP、tdTomato の発現が確認できた (図 4)。

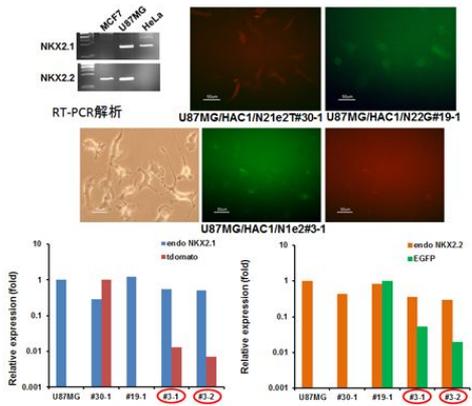


図4. U87MG細胞における神経系分化モニターの動作確認

(3) 麻疹ウイルス融合タンパクを用いた効率的なヒト細胞への HAC ベクター導入法の開発

完成した神経分化モニター用 HAC ベクターをヒト ES/iPS 細胞へ導入を試みたが、導入クローンを得ることが出来なかった。そこで HAC ベクターの導入法である微小核細胞融合法の改良を行った。微小核を形成させる前に麻疹ウイルスの改変 H タンパク (トランスフェリン受容体に対する 1 本鎖抗体との融合タンパク) F タンパク発現ベクターを導入させることにより、微小核の融合効率を格段に向上させることに成功した (図 5)。今後この融合法をヒト ES/iPS 細胞に応用し、HAC ベクター移入クローンの獲得を目指す。

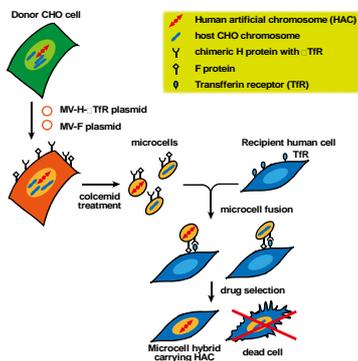


図5. 麻疹ウイルス融合タンパクを用いた微小核細胞融合法

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 2件)
1. Uno N, Uno K, Komoto S, Suzuki T, Hiratsuka M, Osaki M, Kazuki Y, Oshimura M. Development of a Safeguard System using an Episomal Mammalian Artificial Chromosome for Gene and Cell Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 4: e272, 2015. 査読有
 2. Hiratsuka M, Ueda K, Uno N, Uno K, Fukuhara S, Kurosaki H, Takehara S, Osaki M, Kazuki Y, Kurosawa Y, Nakamura T, Katoh M, Oshimura M. Retargeting of microcell fusion towards recipient cell-oriented transfer of human artificial chromosome. *BMC Biotechnol*. 15: 58, 2015. 査読有

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
<https://saiboukougaku.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 正治 (HIRATSUKA, Masaharu)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00362872

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()