

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06458

研究課題名(和文) ダウン症モデルマウス脳において神経細胞の産生異常が引き起こされるメカニズム

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

研究代表者

倉林 伸博 (Kurabayashi, Nobuhiro)

富山大学・学術研究部医学系・講師

研究者番号：40581658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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が認められる。この一因として、神経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、神経前駆細胞の一種である中間前駆細胞の挙動異常を引き起こすヒト21番染色体上の遺伝子を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダウン症は一般に、およそ800人の新生児あたりに1人という割合で発生しており、遺伝子疾患及び染色体異常の中では最も頻度が高い。すなわち、ダウン症の治療戦略の開発は社会的要請が極めて高い。本研究では、ダウン症脳の神経前駆細胞の分化異常を引き起こすメカニズムに分子レベルで切り込み、脳発生異常に寄与する分子シグナリングを明らかにする。そのため、本研究で得られた成果はダウン症における脳機能障害の発症機序に関する理解を進め、その治療戦略に重要な示唆を与えることが期待できる。

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. Previous studies suggest that neuronal differentiation of progenitors in Down syndrome brains is deregulated, however, very little is known about the molecular mechanisms underlying that deregulation. In this study, we focused on intermediate progenitor cells, a type of neurogenic transient amplifying cells, and found that overexpression of a gene located in human chromosome 21 results in abnormal differentiation of intermediate progenitor cells.

研究分野：神経発生科学

キーワード：ダウン症 大脳新皮質 神経前駆細胞 発生期脳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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ている。このことから、神経細胞の産生異常が、ダウン症で認められる知的障害の主要な要因となっていると推察されている。さらに、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ており、これらマウスにおいても大脳新皮質における神経細胞数の減少が認められ、これに伴って学習障害などの脳機能障害を示す。

大脳新皮質を構成する神経細胞の約80%は興奮性の錐体細胞から成り、これらは発生期の脳において背側脳室帯に位置する神経前駆細胞から生じる。具体的には、神経前駆細胞は非対称分裂して神経前駆細胞と中間前駆細胞を産みだし、中間前駆細胞は多くの場合、分裂した後に2つの錐体細胞を産生する。ダウン症モデルマウスにおいては、錐体細胞の数が減少していることが知られており、さらに申請者らは、神経前駆細胞からの錐体細胞の産生が抑制されていることを明らかにした (Kurabayashi and Sanada, *Genes Dev.* 2013)。しかしながら、神経前駆細胞 中間前駆細胞 錐体細胞という分化プロセスのどのステップが障害されているのかは不明であった。申請者は最近、神経前駆細胞から中間前駆細胞への分化が抑制されていることを見出すと共に、中間前駆細胞の神経分化制御が異常である可能性を示唆する知見を得た。ダウン症モデルマウスにおいて中間前駆細胞の挙動変化や性質変容に関する知見は皆無であり、さらに中間前駆細胞は錐体細胞を産生する主要な前駆細胞であることから、この異常が引き起こされるメカニズムを明らかにすることは、ダウン症脳における神経細胞減少のメカニズムを解明するうえで、新たな一歩となると考えられた。

一方、大脳新皮質における神経細胞の約20%は抑制性の神経細胞 (インターニューロン) から構成されることが知られており、これらの細胞の多くは内側基底核原基 (MGE) と呼ばれる領域に存在する神経前駆細胞から、発生期において産生される。錐体細胞のみならず、インターニューロンの適切な産生は、正常な脳機能の発現に極めて重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、ダウン症モデルマウスの脳発生異常の研究において、インターニューロンの産生異常や、それを生み出す神経前駆細胞の分化異常を切り口とした研究はほとんど無い。

2. 研究の目的

本研究では、神経前駆細胞から中間前駆細胞への分化を経て錐体細胞を産生する分化プロセスに着目し、特に中間前駆細胞の異常な振る舞いの原因と、それが脳形成に及ぼす影響を精査する。これと並行して、インターニューロンを産生する MGE の神経前駆細胞に着目し、その分化異常が神経細胞の産生に及ぼす影響を調べる。また、これら前駆細胞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。そこでヒト21番染色体上の遺伝子に着目した研究を展開し、分化異常が引き起こされる分子基盤を理解する。これらの解析により、ダウン症脳の神経発生異常を誘発する新たな分子・細胞機序を提示し、『ダウン症の脳発生過程で何が起きているのか』という理解を進展させることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 中間前駆細胞の分化異常に寄与する分子機序の解析

具体的にはまず、中間前駆細胞に特異的にCreを発現するトランスジェニックマウス (Tbr2-Creマウス) を利用し、Cre依存的に蛍光タンパク質を発現させることによって、中間前駆細胞を特異的に標識する。蛍光タンパク質の発現には、Cre依存的に蛍光タンパク質を発現するプラスミドと、マウス子宮内電気穿孔法による遺伝子導入法を利用する。この手法を用いて標識した中間前駆細胞の性質を、野生型とダウン症モデルマウスで比較解析するために、以下の実験を行う。(i) まず、蛍光標識から一定期間の後に胎仔脳を単離し、脳切片を種々の細胞種マーカーで免疫染色することによって、標識した中間前駆細胞の細胞運命を精査する (in vivo細胞運命マッピング解析)。(ii) 一方、個々の中間前駆細胞の運命を精査するために、標識した中間前駆細胞をin vitroやexo vivoで培養し、細胞分裂させた後に、それぞれの娘細胞の細胞種を同定する (in vitro/exo vivo分化解析)。これらの解析を統合して、中間前駆細胞の神経分化能の変容を明らかにする。

さらに、中間前駆細胞の分化異常の分子基盤を探る。具体的には、標識された中間前駆細胞を細胞ソーティングにより分取し、野生型およびダウン症モデルマウスの中間前駆細胞における遺伝子発現をマイクロアレイやRNA-seqによって比較解析する。これにより、ヒト21番染色体上の遺伝子の中で、中間前駆細胞において過剰発現しているものを絞り込む。これらの解析により、ダウン症モデルマウスの中間前駆細胞で発現量が大きく変化している因子やパスウェイを特定すると共に、中間前駆細胞において強制発現およびノックダウンを行い、その因子が中間前駆細胞の性質に及ぼす影響を解析する。

(2)MGEの前駆細胞の分化異常に寄与する分子機序の解析

MGEから産生されるインターニューロンは、そのマーカー分子の発現から、Parvalbumin (PV) 陽性ニューロンと、somatostatin (SST) 陽性ニューロンの2種類に大別される。そこでまず、ダウン症モデルマウスの大脳新皮質の切片をこれらマーカーで免疫染色することによって、これらの抑制性神経細胞の数が減少しているかを検証する共に、産生比率に違いがあるかを調べる。さらに、MGEにおける神経前駆細胞に特異的にCreを発現するトランスジェニックマウス (Nkx2.1-Creマウス) を利用し、マウス子宮内電気穿孔法による遺伝子導入法を組み合わせることでCre依存的に蛍光タンパク質を発現させる。この手法を用いて標識された神経細胞の細胞運命、および産生されたインターニューロンの形態や大脳新皮質内での配置などを精査し、ダウン症モデルマウスにおけるMGEの神経前駆細胞の神経分化異常や、産生されたインターニューロンの質的な変容を調べる。

さらに、MGEの神経前駆細胞の分化異常の分子基盤を探る。具体的には、MGEを発生期脳より単離し、野生型およびダウン症モデルマウスにおける遺伝子発現をマイクロアレイやRNA-seqによって比較解析する。これにより、ヒト21番染色体上の遺伝子の中で、MGEにおいて過剰発現しているものを絞り込む。これらの解析により、ダウン症モデルマウスの中間前駆細胞で発現量が大きく変化している因子やパスウェイを特定すると共に、MGEの前駆細胞において強制発現およびノックダウンを行い、その因子がこの前駆細胞の神経分化に及ぼす影響を解析する。

4. 研究成果

申請者は本研究において、ダウン症モデルマウスの一つであるTs1Cjeマウスの大脳新皮質において、中間前駆細胞の制御が異常になっている可能性を見出した。具体的には、標識した中間前駆細胞をin vitroで培養し、細胞分裂させた後にそれぞれの娘細胞の細胞種を調べたところ、Ts1Cjeマウスの中間前駆細胞は神経細胞を産み出しにくいことが明らかとなった。また一方で、

ヒト 21 番染色体上の遺伝子の中で、過剰発現によって、Ts1Cje マウスにおける中間前駆細胞の挙動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。

また一方で、発生期のインターニューロンを可視化するため、転写因子 Nkx2.1 のコード領域に CreER をノックインしたマウス (Nkx2.1-CreER) と、Cre の活性依存的に蛍光タンパク質を発現するマウスを掛け合わせたマウスを利用した。これにより、Ts1Cje マウスの発生期脳におけるインターニューロンを可視化したところ、Ts1Cje の大脳新皮質において、移動中のインターニューロンの分布が異常になっていることを見出した。さらに、成体脳におけるインターニューロンの分布を精査した。MGE 由来のインターニューロンは皮質内に進入したのち、主にパルブアルブミン (parvalbumin, PV) 陽性またはソマトスタチン (somatostatin, SOM) 陽性の神経細胞となる。。そこで次に、Ts1Cje の成体脳を PV および SOM に対する抗体を用いて免疫染色し、各サブタイプのインターニューロンの分布を解析した。その結果、Ts1Cje の大脳新皮質において PV 陽性細胞の分布が変化していることが明らかになった。一方で、SOM 陽性細胞の分布は野生型との間で有意な差は認められなかった。

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 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Andre Steinecke, Nobuhiro Kurabayashi, Yasufumi Hayano, Yugo Ishino, and Hiroki Taniguchi	4. 巻 28
2. 論文標題 In vivo single cell genotyping of mouse cortical neurons transfected with CRISPR/Cas9.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 325-331
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2019.06.038.	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 該当する

1. 著者名 Kurabayashi N, Nguyen MD, Sanada K	4. 巻 138
2. 論文標題 Triple play of DYRK1A kinase in cortical progenitor cells of Trisomy 21.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurabayashi N, Tanaka A, Nguyen MD, Sanada K	4. 巻 145
2. 論文標題 The LPA-LPA4 axis is required for establishment of bipolar morphology and radial migration of newborn cortical neurons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 pii: dev162529
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.162529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kurabayashi N, Tanaka A, Takao K, Sanada K
2. 発表標題 Analysis of the mechanism underlying neurodevelopmental anomaly in the neocortex of a Down syndrome mouse model
3. 学会等名 Toyama Forum for Academic Summit on "Dynamic Brain"（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 倉林伸博
2. 発表標題 大脳新皮質における神経細胞の発生メカニズム～ダウン症モデル動物を用いた解析～
3. 学会等名 北陸実験動物研究会 第60回研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 倉林伸博 眞田佳門
2. 発表標題 大脳新皮質における神経細胞の形態変化・移動を制御するリゾフォスファチジン酸-LPA4シグナリング
3. 学会等名 次世代脳 2018年度冬のシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中合紀 倉林伸博 眞田佳門
2. 発表標題 ダウン症モデルマウスの大脳新皮質における神経発生異常のメカニズムの解析
3. 学会等名 次世代脳 2018年度冬のシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉林伸博 眞田佳門
2. 発表標題 リゾフォスファチジン酸とその受容体LPA4による神経細胞の形態変化・移動の制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉林伸博 高雄啓三
2. 発表標題 ダウン症モデルマウスの大脳新皮質において発生異常が引き起こされる分子メカニズム
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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