

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790089
 研究課題名（和文）ダウン症マウスモデルの脳における神経伝達物質の包括的解析と新規治療標的分子の同定
 研究課題名（英文）Neurochemical disturbance in a mouse model of Down syndrome

研究代表者
 石原 慶一（ISHIHARA KEIICHI）
 京都薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：80340446

研究成果の概要（和文）：本課題では、ダウン症（DS）の脳内神経伝達物質量が異常である可能性を、DS モデル Ts1Cje マウス脳での 20 種類の神経伝達物質量を測定することで検討した。その成果として、Ts1Cje マウス脳でのドパミン・セロトニン代謝亢進とこれらの代謝亢進がドパミン遊離促進剤のメタンフェタミン投与により改善されること、また神経伝達物質の代謝酵素 [Catechol O-methyl transferase (COMT)] が Ts1Cje マウスの脳で多いことを見いだした。これらの知見は、DS の病態解明と薬物治療において重要であり、また COMT の新規治療標的分子としての可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：The present study was designed to evaluate at the levels of neurotransmitters in the mouse brain with Down syndrome (DS) that could provide evidence for neurochemical disturbance in the brain of DS patient. Quantification for the contents of various neurotransmitters and their metabolites in the brain of Ts1Cje, a mouse model of DS using HPLC analysis revealed that catabolisms for dopamine and serotonin were enhanced in the Ts1Cje brain. The disturbed catabolisms in Ts1Cje brain were normalized by methamphetamine treatment. Additionally, high expression of catechol-O-methyltransferase (COMT) was detected in the Ts1Cje brain compared to that in wild-type littermates on an immunohistochemical analysis. These findings would be important for clarification of DS pathophysiology, and COMT is expected as a new therapeutic target for the anomalies of DS brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：ダウン症候群，神経伝達物質

1. 研究開始当初の背景

| ダウン症候群（トリソミー21）は、21 番

染色体の全てまたは一部が3倍体となっており、約1/700と非常に頻度が高い先天性染色体異常症である。ダウン症のリスク因子は高齢出産であることから、晩婚化の進む現代社会では本症候群の治療法確立は急務である。殆ど全てのダウン症患者は精神遅滞を呈するが、その発症機序は殆ど分かっていない。現在、幾つかのダウン症マウスモデルが樹立されており、ダウン症の病態メカニズムの解析に有用である。それらの多くは、ヒト21番染色体の大部分が相同であるマウス16番染色体の部分トリソミーを持つ遺伝子改変マウスである。

2. 研究の目的

Ts1Cje マウスは、ダウン症モデルとして作製され、広く研究に利用されている。Ts1Cje マウスはモリス水迷路試験における記憶学習障害が報告されているが、そのメカニズムについては殆ど分かっていない。現在、Ts1Cje マウスの記憶学習障害が神経伝達物質量のアンバランスに起因している可能性を考えている。そこで、野生型およびTs1Cje マウスの神経伝達物質量を包括的に解析することにより、この仮説を検証する。また、ダウン症精神遅滞の薬物治療の可能性を検討するために、神経伝達物質の代謝に関連する分子の発現量も調べ、ダウン症精神遅滞の新規薬物治療標的分子の提示を目指す。

3. 研究の方法

(1) **神経伝達物質の定量**：野生型およびTs1Cje マウス(3ヶ月齢, 雄)の脳凍結スライスから腹側前脳部, 線条体および海馬を切り出し, 各組織中に含まれる神経伝達物質量を電気化学検出器付きHPLCで測定した。この組織抽出物-HPLC解析では, 8種類の生体アミン[セロトニン, 5HIAA(セロトニン代謝物), ドーパミン, DOPAC(ドーパミン代謝物), HVA(ドーパミン代謝物), ノルエピネフリン, MHPG(ノルエピネフリン代謝物)およびアセチルコリン]と12種類の遊離アミノ酸[Asp, Glu, Ser, Gly, Thr, Arg, Ala, His, Tau, Tyr, GABAおよびVal/Met]が定量できる。

(2) **短期作業記憶の測定**：Ts1Cje マウスの短期作業記憶を測定するために, Y字迷路試験を行った。

(3) **神経伝達物質代謝酵素の発現**：代表的な生体モノアミン代謝酵素の1つであるCatechol O-methyl transferase (COMT)の発現量を野生型およびTs1Cje マウス脳切片を用いた組織免疫染色法により検討した。

(4) **脳構造の画像解析**：Ts1Cje マウスの脳室の形態を調べる為に, MRI画像解析を行った。T2強調画像を, サジタル, コロナルおよび水平断の切断面にて撮影した。各領域の体積は, Image Jにて算出した。

(5) **成体ニューロン新生の検討**：成体ニューロン新生を調べる為に, Ts1Cje および野生型マウスにBrdUを9日間連続投与し, 海馬でのBrdU陽性細胞を免疫染色により検出することで増殖細胞を検出した。

4. 研究成果

(1) Ts1Cje マウスの脳内神経伝達物質の網羅的な解析

3ヶ月齢, 雄の野生型およびTs1Cje マウスの腹側前脳部, 線条体および海馬に含まれる生体アミンおよびアミノ酸量を測定したところ, 線条体におけるドーパミン代謝異常を検出した(図1)。また, 海馬および線条体におけるセロトニンの代謝異常も検出された。さらに, 検討した全ての脳部位でチロシンおよびフェニルアラニンが高濃度であった。フェニルアラニン血症における精神発達遅滞は, 脳内に高濃度フェニルアラニンが蓄積することにより引き起こされることから, ダウン症モデルマウスの脳内での高いフェニルアラニン濃度と精神発達遅滞の関連性が興味深い。

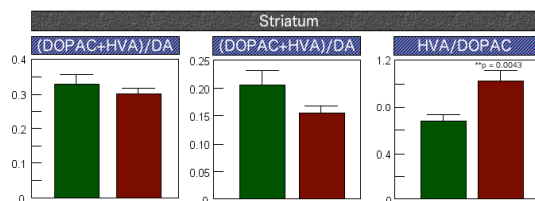


図1. Ts1Cje マウスの線条体におけるドーパミン代謝活性：緑および赤の棒グラフは, それぞれ野生型およびTs1Cje マウスを示す。各グラフは, ドーパミンの代謝段階の各分解率を示している。

(2) Ts1Cje マウスの記憶障害

Ts1Cje マウスは, モリス水迷路試験において軽度の記憶学習障害を呈することが報告されているが(Sago et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**:6256-6261, 1998), 他の行動試験における記憶学習障害は報告されていない。そこで, 短期作業記憶をY字迷路において検討した。その結果, 3ヶ月齢雄マウスにおいて, Ts1Cje マウスは有意に短期作業記憶が低下しており, Y字迷路試験もモリス水迷路試験と同様に記憶学習障害の評価方法として使用できることが示唆された。

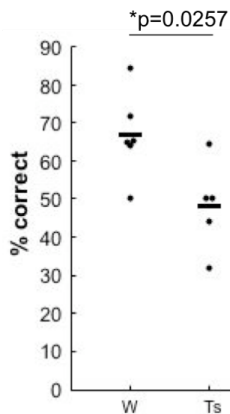


図 2. Ts1Cje マウスの Y 字迷路における記憶学習障害の検出: 3 ヶ月齢雄マウス (W: 野生型マウス, Ts: Ts1Cje マウス) の短期作業記憶について Y 字迷路試験を行った.

(3) Ts1Cje マウスの神経伝達物質に及ぼすメタンフェタミン投与の影響

Ts1Cje マウス脳においてドパミンの代謝異常が検出されたことから、ドパミン放出促進剤であるメタンフェタミンを投与した場合の神経伝達物質量を測定した。結果、活動量を指標とした場合のメタンフェタミンに対する応答は、野生型と Ts1Cje マウスで差は見られなかったものの、セロトニンの代謝異常やチロシンおよびフェニルアラニンの濃度異常を改善した。このように、メタンフェタミン投与が Ts1Cje マウスの記憶学習障害を改善できるのではないかと期待している。

(4) Catechol O-methyl transferase (COMT) の発現

ドパミンやセロトニンの代謝には、Catechol O-methyl transferase (COMT) あるいは Monoamine oxidase (MAO) といった酵素が重要である。そこで、Ts1Cje マウスの海馬および線条体における COMT の発現について組織免疫染色法により検討した。線条体における COMT の発現は、野生型と Ts1Cje マウス間で大きな変化は見られなかったが、海馬の CA3 領域での発現は、Ts1Cje マウスで高かった。COMT 活性は、ダウン症患者において高いという報告もあるが (Brahe et al., 2005 Am. J. Med. Genet. 21, 373-384), Ts1Cje マウスの脳内での発現を検討した結果は無く、今後さらに詳細な解析を行うことが重要である。COMT が有力なダウン症精神遅滞の標的分子となることを期待している。

(5) Ts1Cje マウスの脳室拡大と神経新生異常

Ts1Cje マウスの神経伝達物質の定量実験において、Ts1Cje 脳切片の観察により、Ts1Cje マウスの脳室が拡大していることに気がついた。そこで、この事実を MRI 解析により確認し (図 3)、さらにその原因の候補として Ts1Cje マウスの成体ニューロン新生の

減少を組織染色手法により明らかにした (図 4)。これらの結果は、専門誌に論文としてまとめた (Ishihara et al., 2010 Cereb. Cortex 20, 1131-1143)。

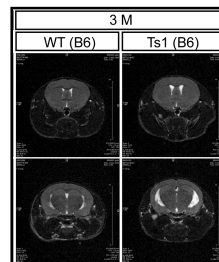


図 3. Ts1Cje マウスの脳室拡大: 3 ヶ月齢雄の野生型および Ts1Cje マウスの MRI T2 強調画像 (コロナル断片)。白色部が脳室である。

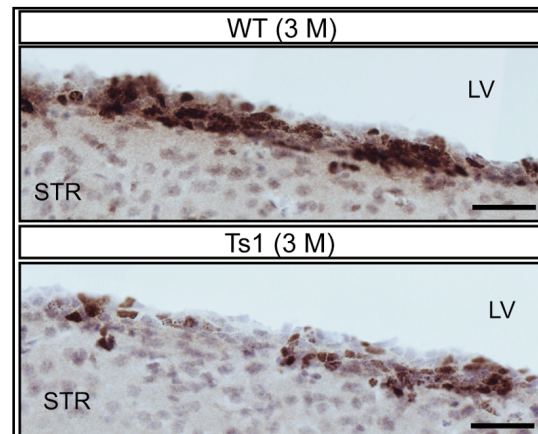


図 4. Ts1Cje マウスの成体ニューロン新生の減少: BrdU ラベルされた脳室周辺部での増殖細胞が Ts1Cje では減少している。WT: 野生型マウス, Ts1: Ts1Cje, LV: 側脳室, STR: 線条体, 3 M: 3 ヶ月齢

(6) 総括

これら本課題で得られた結果は、Ts1Cje マウスにおいて初めて見いだした異常表現型であり、ダウン症の基礎研究において非常に重要である。また、これらの知見を礎として、今後さらに詳細な解析を行うことで、ダウン症の病態メカニズムの解明や新規治療候補分子の同定に繋げていくことが出来ると考えている。

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 Keiichi Ishihara, Kenji Amano, Eiichi Takaki, Atsushi Shimohata, Haruhiko Sago, Charles J. Epstein, Kazuhiro Yamakawa: Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome.

Cerebral Cortex, 査読有, Vol. 20 (2010)
1131-1143.

- ② Keiichi Ishihara, Kenji Amano, Eiichi Takaki, Abdul S. Ebrahim, Atsushi Shimohata, Noriko Shibasaki, Ikuyo Inoue, Mayuko Takaki, Yuto Ueda, Haruhiko Sago, Charles J. Epstein, Kazuhiro Yamakawa: Increased lipid peroxidation in Down's syndrome mouse models. Journal of Neurochemistry, 査読有, Vol. 110 (2009) 1965-1976.

[学会発表] (計2件)

- ① 石原慶一: ダウン症マウスモデルの脳における神経伝達物質量の異常と代謝異常, 日本薬学会第130年会, 2010年3月30日, 岡山
- ② 石原慶一: ダウン症記憶障害の治療のための新しい候補ターゲットシグナル!?(ハイライトポスター), 日本薬学会第130年会, 2010年3月30日, 岡山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 慶一 (ISHIHARA KEIICHI)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 80340446