

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790091

研究課題名（和文）ダウン症候群モデルマウスの記憶学習障害における酸化ストレスおよび炎症反応の役割

研究課題名（英文）Role of oxidative stress and inflammation on the deficits of memory and learning in mouse model for Down syndrome

研究代表者

石原 慶一（ISHIHARA KEIICHI）

京都薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80340446

研究成果の概要（和文）：ダウン症モデルマウスを用いて、脂質過酸化の亢進および炎症の亢進について検討したところ、3ヶ月齢のダウン症モデルマウスの脳での脂質過酸化の亢進および炎症亢進を見いだした。しかし、脂質過酸化亢進は、1ヶ月齢のダウン症モデルマウスではみられなかったのに対して、炎症の亢進は胎児期から見られたことからこれらは独立していることが示唆された。ダウン症モデルマウスの胎児期での炎症亢進阻害は、ダウン症の脳発達遅延や記憶学習障害の新たな治療ターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we found that lipid peroxidation and inflammation were induced in the brain of mouse model for Down syndrome (DS) at 3 months of age. Although increased lipid peroxidation was not detected in the brain of 1 month-old mouse model for DS, increased inflammation was observed in embryonic mouse brain with DS, suggesting that increased lipid peroxidation and inflammation would be independent in each other. Neuroinflammation in the DS brain could be therapeutic target for developmental retardation of DS brain and memory and learning impairment in DS patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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，炎症，酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

ダウン症 (DS) は、通常 2 本の 21 番染色体が 3 本となる、出生率 1/700 と非常に頻度の高い染色体異常である。主な原因は染色体の不分離であり、母親の出産年齢の上昇が危険因子である。DS は、精神発達遅滞をはじめとする様々な症状を呈するが、本性状の改

善薬が切望されている。しかしながら、DS の精神発達遅滞の分子メカニズムは不明であり、DS 精神発達遅滞薬の開発には分子メカニズムの解明が必須である。

In vivo での DS の病態メカニズム解明にはモデルマウスが有用である。マウス 16 番染色体 (MMU16) のテロメア側領域は HSA21

の大部分と相同であることから、MMU16を部分トリソミーとして持つ数種類のDSモデルマウスが現在広く使用されている。我々は、左合博士らによって樹立されたDSモデルマウスであるTs1Cjeマウスを用いてDS病態解析を行っている。本モデルマウスは、Sod1からZnf295までの領域がトリソミーとなっており（ただしトリソミー領域のSod1はネオマイシンカセットの挿入により発現しない）、特にこの領域に含まれるDown syndrome critical region (DSCR)は臨床的に精神遅滞の発症に重要であるとされている。このTs1Cjeマウスはモリス水迷路試験において空間認識に対する記憶学習障害を示すことから、DS患者の記憶学習障害に対する責任遺伝子がこのTs1Cjeトリソミー領域にコードされていると考えられている。また、胎児期において脳発達遅滞が見られることを我々は明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究は、Ts1Cjeマウスの脳に老おいて、胎児期から成体に至るまでの間に見られる異常を見だし解析することで、新たなDS精神発達遅滞の治療戦略を提示することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 脂質過酸化亢進に関する研究

脳内における脂質過酸化については、脂質過酸化過程の最終産物であるHELが付加したタンパク質をウェスタンブロットや免疫組織染色により検出することで検討した。

(2) 炎症亢進に関する研究

シクロオキシゲナーゼ (COX) 2の発現を免疫組織染色により検出することで検討した。

(3) Ts1Cje胎児脳での炎症検討

雄性Ts1Cjeと雌性野生型マウスを交配し、胎生14.5日目の胎児を得た。性別と遺伝型をPCRにて確認後、脳から全RNAを抽出した。次いで、炎症関連遺伝子のmRNA発現量を検討した。

(4) cPLA2 α 欠損Ts1Cjeマウスの繁殖

雄性Ts1Cjeマウスと雌性cPLA2 α ^{+/-}マウスを交配し得られた雌性cPLA2 α ^{+/-}-Ts1Cjeマウスをさらに雌性cPLA2 α ^{+/-}マウスと交配することで、cPLA2 α ^{-/-}-Ts1Cjeマウスを得た。

(5) 抗酸化剤投与による脂質過酸化の亢進の抑制効果についての研究

抗酸化剤としてエピガロカテキンガレート (EGCG)を用いた。0.08% EGCG (0.5% citric

acid溶液に溶解) 溶液を飲水として2ヶ月間投与した。抗酸化活性は、脳での脂質過酸化を指標にして評価した。

4. 研究成果

(1) Ts1Cjeマウス脳での脂質過酸化亢進

3ヶ月齢の雄性Ts1Cjeの脳における脂質過酸化産物HELが付加したタンパク質の蓄積をウェスタンブロット解析(図1)および組織免疫染色(図2)により解析したところTs1Cjeマウス脳の大脳皮質において脂質過酸化の亢進が示唆された。しかし、この脂質過酸化の亢進は1ヶ月齢のTs1Cjeでは見られなかった(図1B)。

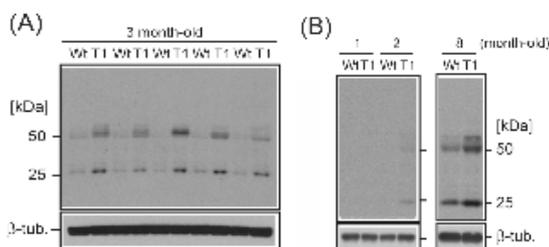


図1. Ts1Cjeマウス脳における脂質過酸化の亢進

(A) 3ヶ月齢雄性マウス脳でのHEL結合タンパク質の蓄積をWestern blottingにて検討した。(B) 1, 2および8ヶ月齢のTs1CjeマウスでのHEL結合タンパク質蓄積について検討した。

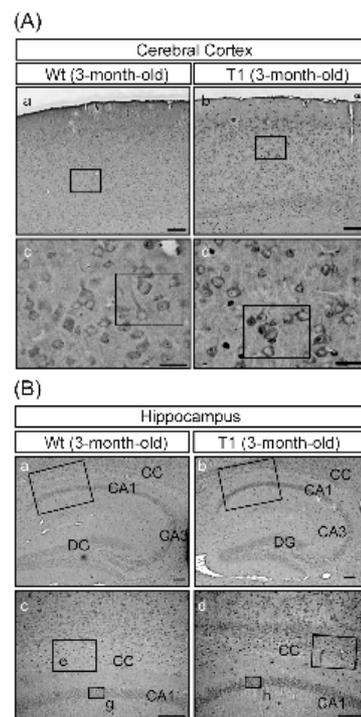


図2. Ts1Cjeマウス脳における脂質過酸化の亢進

3ヶ月齢雄性マウス脳でのHEL結合タンパク質の蓄積を免疫組織染色にて検討した。(A) 大脳皮質、(B) 海馬

(2) Ts1Cje マウス脳における炎症亢進

3ヶ月齢の雄性Ts1Cjeの脳における炎症亢進の可能性について検証するために、炎症マーカーとして知られるシクロオキシゲナーゼ2 (COX2) の発現を免疫組織染色により検討した(図3)。結果、Ts1Cjeの海馬のCA3において同腹の野生型よりも濃いCOX-2染色像が検出された。これより、Ts1Cjeマウスの海馬CA3領域における炎症亢進が示唆された。次に、炎症の亢進がTs1Cjeの胎児脳でも見られるかについて、炎症関連mRNAの発現量を検討した。その結果、炎症関連分子であるcPLA2 α の発現量やインターフェロン関連遺伝子の上昇が見られた(図4)。これらの結果は、Ts1Cjeマウス脳での炎症の亢進は胎児期から見られることと、恐らく脂質過酸化の亢進とは独立した減少であることとを示唆している。

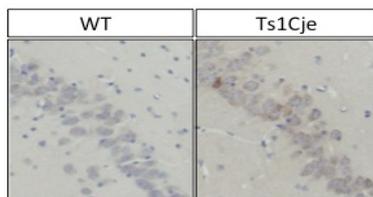


図3. Ts1Cje マウス脳における COX2 発現の亢進
3ヶ月齢雄性マウス脳での COX2 の発現を免疫組織染色にて検討した。図は海馬の CA3 領域。

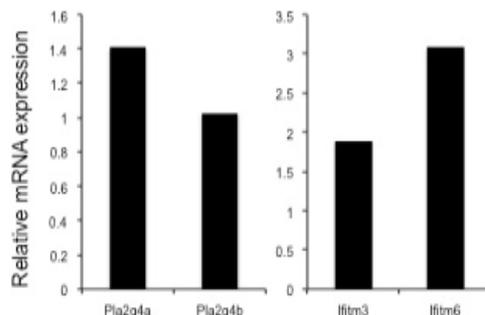


図4. Ts1Cje マウス胎児脳における炎症関連分子の発現上昇

胎生14.5日目の雄性Ts1Cjeマウス大脳皮質での炎症関連分子IVA型Phospholipase A2 (Pla2g4a) およびインターフェロン応答分子 (Ifitm3 および Ifitm6) の mRNA 発現量の野生型マウスの発現量に対する比。IVB型PLA2 (Pla2g4b) は炎症により発現上昇は見られない分子。

(3) IVA-PLA2 欠損-Ts1Cje マウスの作出と表現型

IVA-PLA2 $^{-/-}$ マウスとTs1Cjeを交配し、IVA-PLA2 $^{-/-}$ -Ts1Cjeマウスを得た。このマウスとIVA-PLA2 $^{+/+}$ マウスを交配し、最終的にIVA-PLA2欠損-Ts1Cjeマウスを得た。計5匹のIVA-PLA2欠損-Ts1Cjeマウス得たが、これらの体重が激減していたこと、また内3匹が

3ヶ月齢になるまでに死亡したことから、脳での特異的なIVA-PLA2欠損マウスを用いて解析する必要性が考えられた。

(4) Ts1Cje マウスへの抗酸化剤投与

1ヶ月齢のTs1Cjeマウスを離乳後、0.08% EGCG (0.5% citric acid 溶液に溶解) 溶液を飲水として2ヶ月間飼育した。また、非投与群は、0.5% citric acid 溶液を飲水として飼育した。投与後、脳の脂質過酸化をWestern blottingにて評価した(図5)。EGCG投与群では、脂質過酸化の指標であるHEL付加タンパク質の蓄積量が減少していなかったことから、本投与では脂質過酸化を抑制できないことが明らかとなった。現在、より強力な抗酸化剤投与を行っている。

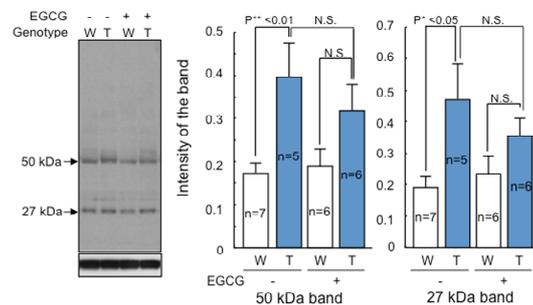


図5. Ts1Cje マウス脳における脂質過酸化の亢進に及ぼすEGCGの影響

EGCG投与あるいは非投与群の3ヶ月齢雄性マウス脳でのHEL結合タンパク質の蓄積を免疫組織染色にて検討した。統計はstudent's-t testにより行った。

(5) 総括

本研究で、Ts1Cjeマウス脳で炎症の亢進が起こっていることを初めて見いだした。また、この炎症の亢進は胎児の時期の脳形成時期から見られることから、Ts1Cjeマウスの脳形成遅滞にも関与している可能性が考えられる。これらの知見は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、ダウン症の脳形成遅滞や記憶学習障害といった脳関連病態メカニズムの解明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 Ishihara K., Kuroda A., Sugihara K.,

Kanai S., Nabe T., Akiba S. Regulation of macrophage differentiation and polarization by group IVC phospholipase A₂. Biochem. Biophys. Res. Commun. (2011) 416:325-330. 査読有

② Ishihara K., Tachibana K., Kuroda A., Terakawa A., Baba S., Kanai S., Akiba S. Triacylglycerol deposition with group IVC phospholipase A₂ expression in oleate- and linoleate-stimulated Huh-7 hepatocytes. (2011) 34:191-196. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

① 石原慶一、金井志帆、秋葉 聡、山川和弘：ダウン症候群モデルマウスの異常表現型解析. 生物分子システムに基づく創薬科学フロンティア研究成果発表会. 2012年2月18日 京都薬科大学 (京都)。

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kyoto-phu.ac.jp/education_research/laboratory/index.php?c=labo_view&pk=1252327876

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・講師

研究者番号：80340446

