

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460077

研究課題名(和文) ダウン症マウスモデルの脳発達遅滞および記憶学習障害の分子基盤解明と炎症亢進

研究課題名(英文) Molecular mechanisms and enhanced inflammation in retardation of brain development and cognitive impairment 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・講師

研究者番号：80340446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症(DS)の精神遅滞や脳発達遅滞の分子メカニズムの解明を目的として、本研究ではDSモデルマウス由来脳組織を用いて種々の分子の発現や蓄積量を網羅的に比較した。タンパク質や遺伝子の発現解析や神経伝達物質の定量解析により、DSモデルマウス胎仔脳における抑制性神経の新生異常を示唆するタンパク質発現量の変動および炎症亢進を示唆するmRNA発現量の変動、さらに成体脳でのドパミン・セロトニン代謝亢進の可能性について明らかとした。また、胎仔脳での炎症亢進の原因は炎症細胞の流入と考えられ、その原因遺伝子を同定できた。これらの知見は、DS脳発達遅滞や精神遅滞の基盤となっている可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathomechanisms underlying intellectual disability and developmental delay of the brain in Down syndrome (DS), we employed three "-omics" analyses. Our proteomics and transcriptomics analysis revealed the perturbed expressions of five proteins, which suggest a disturbance of GABAergic interneurogenesis, and increased expressions of inflammation-related genes in the embryonic brain of a mouse model for DS. In addition, our quantitative analysis for neurotransmitters suggest an increased flux through central dopamine and serotonin metabolism in the adult brain of a DS model mouse. Finally, we succeeded to identify the responsible gene for increased expression of inflammation-related gene in the embryonic brain of a DS model mouse. We assume our findings are important to display the developmental delay and intellectual disability in the individuals with DS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ダウン症 マウスモデル オミクス解析 炎症 神経伝達物質

## 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 本となることで発症する染色体異症であり、その出生率は 1/700 と非常に高いことが知られる。主な原因は染色体の減数分裂における不分離であり、母親の出産年齢の上昇が危険因子である。DS は、精神遅滞や発達遅滞をはじめ様々な症状を呈するが、特に精神遅滞はほぼすべての患者に必発であることから改善薬の開発が切望されている。しかしながら、DS の精神遅滞の分子メカニズムは不明であり、DS 精神遅滞薬の開発には分子メカニズムの解明が必須である。

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おり、我々は主に Ts1Cje マウスを用いて病態解析を行っている。Ts1Cje マウスのトリソミー領域は約 70 遺伝子をコードしているが、アミロイド前駆タンパク質 (App) やスーパーオキシドジスムターゼ (Sod1) といったこれまでに DS 病態への関連性が示唆されているヒト 21 番染色体遺伝子は含まないが、本モデルマウスが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 トリソミー領域に存在すると考えられる。また、胎仔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おり、DS 患者の脳発達遅滞の原因遺伝子も Ts1Cje マウスのトリソミー領域にコードされていると考えられる。

近年、発現分子の定量解析を網羅的に行う方法として種々のオミクス解析が頻用される。例えば、タンパク質の発現量を解析する方法はプロテオミクス解析、転写産物の場合はトランスクリプトミクス、あるいは脂質量はリポドミクスといったように、解析対象物の後ろにオミクスという語を付属させた名称で呼ばれる。本研究では、幾つかのオミクス解析を用いて、DS マウス脳での発現変動分子の同定を行い、その意義について考察している。

## 2. 研究の目的

本研究では、Ts1Cje マウスの胎仔および成体脳において発現変動が見られる分子を同定し、DS の脳発達遅滞や記憶学習障害に関連した分子や基盤メカニズムを提示することで薬物治療標的を明らかとすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) プロテオミクス解析

野生型および Ts1Cje マウスの脳抽出物を 2 次元電気泳動にて分離後、蛍光色素にてタンパク質スポットを検出した。発現変動が見ら

れたスポットに含まれるタンパク質は、ペプチドマスフィンガープリンティング法により同定した。

### (2) マイクロアレイ解析

野生型および Ts1Cje マウスの脳から mRNA を精製し、DNA チップを用いたマイクロアレイ解析を行った。DNA チップはアジレント社の SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8x60K を用いた。

### (3) 神経伝達物質の定量解析

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 で定量した。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。

### (4) 神経伝達物質代謝酵素の発現解析

代表的な生体モノアミン代謝酵素群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および抽出物を用いた Western blot 法により検討した。

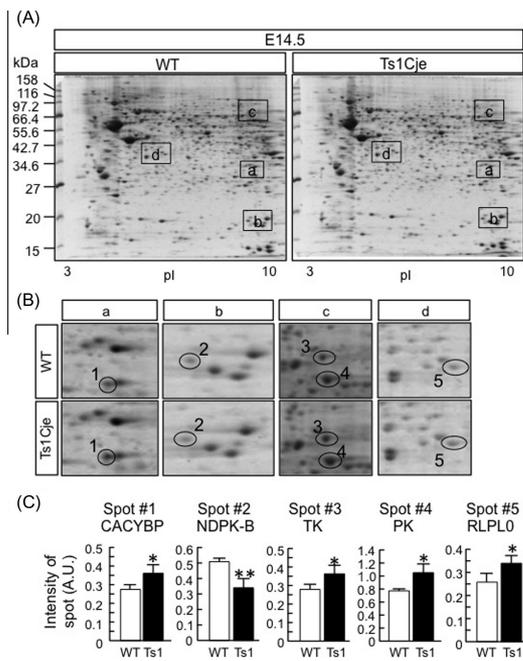
## 4. 研究成果

### (1) Ts1Cje マウス脳での発現変動タンパク質の同定

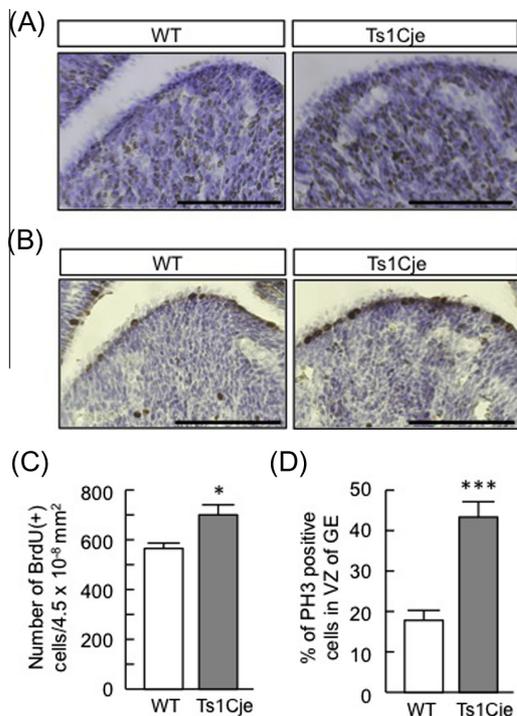
野生型および Ts1Cje マウスの成体脳および胎仔脳からタンパク質を抽出し、発現変動タンパク質について 2 次元電気泳動を用いたプロテオミクス解析によって比較検討した。結果、成体脳では野生型と Ts1Cje マウス間で発現変動がみられるタンパク質を見出すことはできなかったが (データ示さず)、胎仔期脳において発現変動が見られるタンパク質を同定した (図 1)。

### (2) E14.5 の Ts1Cje マウスの大脳基底核原基における増殖細胞数の増加

プロテオミクス解析の結果、5 つのタンパク質の発現変動が明らかとなった。そのうち、calyculin binding protein (CACYPB) および nucleoside diphosphate kinase B (NDPK-B) といった細胞増殖関連分子であり、また transketolase (TK) や pyruvate kinase (PK) といった解糖系酵素の発現増加から、細胞増殖の増加が示唆された。そこで、妊娠 13.5 日目の母親マウスに BrdU を投与し、E14.5 の胎仔脳における BrdU 取り込み細胞を検出することで、24 時間で増殖した細胞を免疫染色により検出したところ、大脳基底核原基 (GE) において増殖細胞数の増加が見ら



**図1. 胎生 14.5 日目 (E14.5) 野生型および Ts1Cje マウス胎仔脳発現タンパク質の比較プロテオミクス解析.** (A) 2次元電気泳動による胎仔脳タンパク質の分離と蛍光色素による検出。(B) (A)の a-d の領域の拡大図。(C) 発現変動タンパク質スポットの定量解析と同定結果を示した。



**図2. 胎生 14.5 日目 (E14.5) の Ts1Cje マウス基底核原基における増殖細胞数の増加.** (A) E13.5 から E14.5 の間に増殖した細胞を *in vivo* BrdU ラベリング法により検出した。(B) M 期マーカーであるリン酸化ヒストン H3 (PH3) 抗体を用いて増殖細胞の検出を行った。(C) (A) の BrdU 陽性細胞をカウントし、定量した。(D) (B) の PH3 抗体陽性細胞数をカウントし定量した。

れた (図 2)。本部位は抑制性神経の新生場所として知られることから、Ts1Cje マウスにおける抑制性神経の異常産生が考えられる。

### (3) マイクロアレイ解析による Ts1Cje マウス胎仔期発現変動転写産物の検討

タンパク質レベルでの比較検討であるプロテオミクス解析に続き、転写産物の発現量についてマイクロアレイを用いたトランスクリプトミクス解析を行った。以前の P0 新生仔マウスの脳でのマイクロアレイ解析の結果 (Amano et al, 2004 Hum. Mol. Genet. 13:1333-40.) と同様、E14.5 脳でも殆どのトリソミー領域上の遺伝子の発現量は野生型マウスより 1.5 倍増加していた。加えて、トリソミー領域外の遺伝子の変動もみられ、顕著な発現変動が見られた遺伝子は、炎症性細胞関連遺伝子群であった。さらに、FACS 解析によって Ts1Cje マウス E14.5 脳で炎症性細胞数の増加を検出したことから、Ts1Cje マウス胎仔脳における炎症性細胞の分布異常が考えられた。また、この炎症細胞関連遺伝子の上昇は、Ts1Cje マウス以外の複数の DS マウスモデルでも確認できたことから、DS モデルマウスで共通した異常表現型であることが分かる。次いで、この現象の原因遺伝子の同定を試みた。トリソミー領域に存在する炎症関連遺伝子 X に着目し、遺伝子 X のヘテロ欠損マウスと Ts1Cje マウスを交配させることで作出した遺伝子 X のみが正常の 2 コピーとなった Ts1Cje マウスの胎仔脳での炎症細胞関連遺伝子群の発現を real time RT-PCR にて調べたところ、作出したマウスでは炎症性細胞関連遺伝子群の発現上昇が見られなかったことから、この遺伝子 X が原因であることが明らかとなった。現在、さらに本遺伝子の DS 病態における役割について検討している。

### (4) 成体 Ts1Cje マウス脳での神経伝達物質の網羅的解析とその代謝酵素の発現解析

Ts1Cje マウスの成体期脳における生体モノアミンやアミノ酸といった神経伝達物質の量を野生型マウスと比較した。凍結切片 (100  $\mu\text{m}$  厚) から線条体部分を切り抜き (図 3)、組織片からモノアミンとアミノ酸を抽出し、これらを電気検出器付 HPLC により分離定量を行った。結果、線条体においてドパミン放出量のパラメータであるドパミン代謝物である 3-methoxytyramine (3-MT) 量が Ts1Cje マウスにおいて上昇していたことから Ts1Cje マウス線条体でのドパミン放出量の上昇が示唆された (表 1)。また、ドパミン代謝活性についてドパミン代謝物の割合によって評価したところ、Ts1Cje マウスにて上昇していることが示唆された (図 3)。また、セロトニン代謝物量も Ts1Cje マウスにおいて増加しており (表 1)、Ts1Cje マウスの成体脳でのドパミンおよびセロトニンの代謝亢進を示唆するものである。そこで、代謝酵

素の発現量についても組織免疫染色と Western blot により検討した (図 4)。Ts1Cje マウス線条体でのカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ (COMT) の発現増加とアルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH) の発現減少が検出され、これらの発現変動によりドパミン代謝が亢進されていると考えられた。

表 1 Ts1Cje マウス線条体におけるドパミン系代謝物量

		Tissue-punch		P values
		WT (n = 8)	Ts1Cje (n = 9)	(WT vs Ts1Cje)
Striatum	DA	117639.5 ± 3557.3	142287.5 ± 13498.7	0.1155
	5-HT	2554.0 ± 83.6	3007.8 ± 133.2	* 0.0135
	NA	408.6 ± 56.7	499.5 ± 39.9	0.2019
Striatum	DOPAC	24352.0 ± 3501.6	21293.7 ± 2145.8	0.4568
	3-MT	8421.1 ± 456.7	10191.5 ± 466.3	* 0.0165
	HVA	15081.0 ± 731.2	21024.6 ± 1744.7	** 0.0089
	5-HIAA	2650.5 ± 184.7	4114.2 ± 310.8	** 0.0014

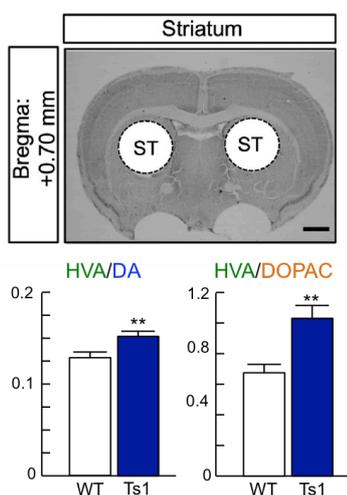


図 3 Ts1Cje マウス線条体におけるドパミン代謝活性。(上図)凍結切片からパンチにくり抜いた線条体組織の位置を示した。(下グラフ)ドパミン代謝物の量から、ドパミン代謝活性を算出した。

#### 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 3 件)

- ① Keiichi Ishihara, Shiho Kanai, Haruhiko Sago, Kazuhiro Yamakawa, Satoshi Akiba: Comparative proteomic profiling reveals aberrant cell proliferation in the brain of embryonic Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome. *Neuroscience* 2014 281:1-15. (査読有り)
- ② Atsushi Shimohata\*, Keiichi Ishihara\*, Satoko Hattori, Hiroyuki Miyamoto, Hiromasa Morishita, Guy Ornthanalai, Matthieu Raveau, Abdul Shukkur Ebrahim,

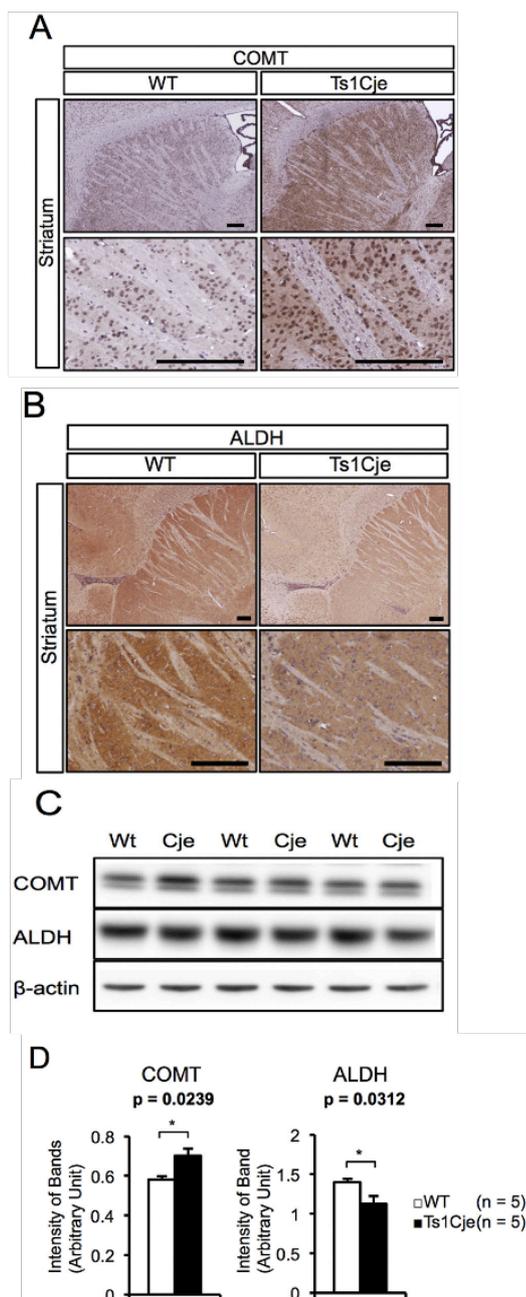


図 4 Ts1Cje マウス線条体におけるモノアミン代謝酵素の発現変動。(A, B) 3ヶ月齢雄野生型および Ts1Cje マウスの線条体における COMT (A) および ALDH (B) の発現を免疫染色によって検討した。スケールバーは 200  $\mu$ m。(C) 3ヶ月齢雄野生型および Ts1Cje マウスの線条体における COMT (A) および ALDH (B) の発現を Western blot 解析によって検討した。(D)  $\beta$ -アクチンに対する COMT および ALDH の発現量を image J を用いて定量した。

Kenji Amano, Kazuyuki Yamada, Haruhiko Sago, Satoshi Akiba, Nobuko Mataga, Niall P. Murphy, Tsuyoshi Miyakawa, Kazuhiro Yamakawa: Ts1Cje Down syndrome model mice exhibit environmental

stimuli-triggered locomotor hyperactivity and sociability concurrent with increased flux through central dopamine and serotonin metabolism. *Exp. Neurol.* 2017 293:1-12. (査読有り) \* : Equal contributors

- ③ Keiichi Ishihara, Satoshi Akiba: A Comprehensive Diverse '-omics' Approach to Better Understanding the Molecular Pathomechanisms of Down Syndrome. *Brain Sci.* 2017 21:7(4). (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 石原慶一: ダウン症モデルマウス胎児脳における変動分子の網羅的解析. 第 63 回日本薬学会近畿支部大会 (招待講演) 2013 年 10 月 (京都)
- ② 石原慶一, 川崎愛弓, 金井志帆, 左合治彦, 山川和弘, 秋葉 聡: ダウン症モデルマウスの脳プロテオミクス解析. 第 57 回日本人類遺伝学会 2013 年 11 月 (仙台)
- ③ Keiichi Ishihara, Shiho Kanai, Haruhiko Sago, Kazuhiro Yamakawa, Satoshi Akiba: Comparative proteomic profiling reveals aberrant cell proliferation in the embryonic brain of Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Neuroscience* 2014 2014 年 11 月 (ワシントン DC, 米国)
- ④ 竹腰良輔, 金井志帆, 左合治彦, 山川和弘, 秋葉 聡, 石原慶一: ダウン症モデルマウス脳における同濃度の増加. 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 (神戸)
- ⑤ 石原慶一, 河下映里, 左合治彦, 山川和弘, 秋葉 聡: 創薬標的の同定を目的としたダウン症マウス脳での変動分子の網羅的解析. (招待講演) 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月
- ⑥ Keiichi Ishihara, Lisa Beppu, Ryosuke Takekoshi, Haruhiko Sago, Kazuhiro Yamakawa, Satoshi Akiba: Characterization of abnormalities in the brain of Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome, by multiple "-omics" techniques. T2IRS International Conference 2015 2015 年 6 月 (パリ, フランス)
- ⑦ Keiichi Ishihara, Eri Kawashita, Kazuhiro Yamakawa, Haruhiko Sago, Satoshi Akiba: Comparative metallo- and element-omics profiling reveal aberrant copper contents in the brain of Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Neuroscience* 2016 2016 年 11 月 (サンディエゴ, 米国)
- ⑧ 石原慶一: ダウン症マウスモデル脳の異常表現型と発現変動分子. (招待講演) 第 39 回分子生物学会 2016 年 11 月 (横浜)

[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](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

### (2) 分担研究者

無し

### (3) 連携研究者

金井 志帆 (KANAI SHIHO)  
京都薬科大学・薬学部・助手  
研究者番号 : 40582630