

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390078

研究課題名（和文） 高効率システムによるダウン症発症機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of molecular pathology of Down syndrome by high efficient system

研究代表者

山川 和弘 (YAMAKAWA KAZUHIRO)

独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・チームリーダー

研究者番号：30241235

研究成果の概要（和文）：

本研究では、高組み替え効率を有するトリ細胞を利用してヒト21番染色体(HC21)に相同なマウス16番染色体(MC16)の部分トリソミーを有するモデルマウスを高効率に作成し、HC21相同MC16上の主要責任遺伝子を同定し、それらを通してダウン症精神遅滞の発症機序を明らかにすることを目的とした。本研究の結果、1) HC21相同MC16部分染色体 (Ts1Cjeセグメント相当) を持つトリ細胞内の作成に成功した。2) HC21相同MC16部分染色体トリ細胞内のHC21相同MC16部分染色体を、CHO細胞を介してマウスES細胞に導入することに成功した。3) 当該ES細胞を用いてマウスを製作した。

研究成果の概要（英文）：

To understand the molecular pathology of Down syndrome, we established a high efficient system in that mouse models with partial trisomy 16 which is syntenic to human chromosome 21. We successfully established 1) Avian cells harboring partial mouse chromosome 16 segments, 2) Mouse ES cells harboring extra partial mouse chromosome 16 derived from the avian cells, and 3) Mice from those ES cells. These resources should greatly contribute to Down syndrome studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2012年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ダウン症、マウスモデル、高効率作成

1. 研究開始当初の背景

ダウン症(DS)はヒト21番染色体(HC21)

3倍体により発症する疾患であり、最も頻度の高い精神遅滞の原因の一つである。発

症には、HC21 上の遺伝子の過剰発現が関わっていると考えられるが、実際にどの遺伝子の過剰発現が関与しているのかは未だに明らかではない。その発症機序も殆ど分かっておらず、有効な治療法は未だに開発されていない。一方で、近年の高齢出産の増加に伴いその頻度は急激に高まっており (DS のリスク因子は高齢出産であり、20-24 歳で 1/1587 [1587 人の新生児に一人]、35-39 歳で 1/248、40-45 歳で 1/24 である)、その発症メカニズムの理解と有効な治療法の開発は社会的急務である。

HC21 は約 50Mb の大きさを持ち約 360 の遺伝子を含む。その大部分がマウス 16 番染色体 (MC16) 上の一部領域と相同であり、MC16 部分 3 倍体 (トリソミー) を有するいくつかのマウスが DS モデルとして知られる。相同領域の内 Mrpl39 から Znf295 までの 136 個の遺伝子を含む領域 (16Mb) がトリソミーである Ts65Dn マウス、および更にその一部の Sod1 (機能は失われている) から Znf295 までの 97 個の遺伝子を含む領域 (10Mb) をトリソミーで持つ Ts1Cje マウスなどが知られる。Ts65Dn と Ts1Cje は共に DSCR 領域 (主な DS 症状の発症に責任があるとされる染色体領域) をトリソミー部分に含み、共に DS 患者類似の顔貌骨格を呈し、空間的作動記憶に障害が見られる。最近では、Ts65Dn と遺伝的に同等で、部分染色体が転座により安定化しより繁殖させやすい Ts2Cje が知られる。

DS の発症には、HC21 上遺伝子の過剰発現が関わっているとする説がある一方、染色体の異数体 (DS の場合 HC21 トリソミー) が、全染色体上の遺伝子発現を異常にしているとの説もある。これに対して我々は、出生直後の Ts1Cje マウスの脳を

用いて大規模な DNA チップ解析を行い、トリソミー領域内の遺伝子発現量が約 1.5 倍に増加し、他の領域の遺伝子発現量はほとんど変化しないという結果、すなわち DS の発症には HC21 上遺伝子のコピー数依存的過剰発現が直接的に関与するという前者の仮説を支持する結果を得て報告した (Amano et al., *Hum Mol Genet* **13:1333-1340**, 2004)。この結果は、トリソミー領域内の主責任遺伝子を同定し、その亢進した遺伝子発現量を元に戻すこと、もしくはそれら遺伝子の発現亢進により生じた生理学的/生化学的異常に特異的に介入することにより、DS の症状を改善しうる事を示すものである。

DS 主要責任遺伝子を同定する為に、現在までに多くのグループがマウスを利用した研究を報告しているが、それらは、当該候補遺伝子を含む人工染色体や cDNA に高発現用プロモーターをつなぎ導入したものなどで、異所性、異常な時期、1.5 倍を遥かに上回る高発現など、異常な発現を示し、各候補遺伝子の DS への寄与を公平に判定し、相互に比較するのは極めて困難であった。一方我々は候補遺伝子のノックアウトマウスと MC16 部分トリソミー-DS モデルマウスを掛け合わせることで当該候補遺伝子のみを 3 コピーから 2 コピーに戻しパラメーターの改善の有無を検討する方法を採用し、共通のプラットフォームにおいて各候補遺伝子のダウン症への寄与を公平に評価する事を試みてきた。MC16 部分トリソミー-DS モデルマウスにおける異常パラメーターの探索のなかで、我々は Ts1Cje マウスの脳においてミトコンドリアの機能障害、活性酸素種の増加、タウ蛋白の過剰リン酸化等の異常を見だし報告している (Shukkur et al.,

Hum Mol Genet **15:2752-2762, 2006**)。更に我々は、Ts1Cje および Ts2Cje における同等レベルの脂質過酸化の亢進と蛋白代謝システムの異常 (Ishihara et al., *J Neurochem* **110:1965-1976, 2009**)、Ts1Cje および Ts2Cje における脳室拡大と発生期および成体における神経新生の同等な異常 (Ishihara et al., *Cerebral Cortex* **20:1131-1143, 2010**) などを報告し、これら異常が両モデルマウスに共通する Ts1Cje 部分 3 倍体セグメント上の遺伝子の過剰発現に起因することを示した。また更にこれら得られた異常パラメーターを利用して、Ts1Cje の MC16 部分トリソミー上にある Dscam、Cbr1、Ets2 などの複数の遺伝子のノックアウトマウスの作成/解析 (Amano et al., *J Neurosci* **29:2984-2996, 2009**) や、部分トリソミーマウスにおいて当該遺伝子を 2 コピーに戻した時に於けるそれらパラメーターの改善の有無の評価などを進めてきた。しかしながら、HC21 は約 3 6 0 の遺伝子を含み、ダウン症発症に特に重要と思われる領域だけでも 1 0 0 ~ 1 5 0 の遺伝子を含み、到底これら全てのノックアウトマウスを標準的な方法で用意することは不可能である。このことから、更に大規模で効率の良い責任遺伝子スクリーニングシステムの開発が必要と考え、本課題の提案となった。

2. 研究の目的

本研究では、高組み替え効率を有するトリ B 細胞 DT40 を利用して HC21 に相同なマウス 16 番染色体(MC16)の部分トリソミーを有する DS モデルマウス、およびトリソミー上の遺伝子をノックアウトしたマウスを高効率に作成し、トリソミーマウスに於いて DS 精神遅滞の背景をなすと思われる生化学的/生理学的/行動学的/組織学

的異常を見だし、更にノックアウトにより当該候補遺伝子のみが 2 コピーになったトリソミーマウスにおけるそれらパラメーターの改善の有無を検証することにより、HC21 相同 MC16 上の主要責任遺伝子を同定し、それらを通して発症機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

方法としてまず、マウス繊維芽細胞に G418 ネオマイシン耐性遺伝子を形質転換し、当該遺伝子が HC21 相同 MC16 上に導入されたクローンを同定・単離する。そのクローンとマウス A9 細胞を融合させたハイブリッド細胞を作製し、同細胞をマイクロセル(微小核)化する。これらを DT40 細胞に導入したものを G418 添加培地で培養することにより、ネオマイシン耐性クローン(すなわち HC21 相同 MC16 を有する DT40 クローン)を選択する。得られたクローンにおいて、不要な領域を挟んで loxP サイトを 2 カ所に導入したうえで cre-recombinase を働かせることにより欠失を導入し、HC21 相同 MC16 部分セグメントのみを有する染色体を DT40 細胞内にて作出する。これを再びマイクロセル化し、CHO 細胞に導入して G418 でスクリーニングする。得られた HC21 相同 MC16 部分セグメントを有する CHO 細胞を再びマイクロセル化し、マウス ES 細胞に導入する。再び、G418 でスクリーニングすることにより、当該セグメントを部分トリソミーで有する ES 細胞が得られる。これを用いてマウスを作製する。DT40 細胞内の MMU16 に 2 カ所 lox-P サイトを導入し、更に dre-recombinase を働かせることにより、HC21 との非相同領域を含めた不要領域を除く。Ts1Cje トリソミーセグメント、

および Ts2Cje トリソミーセグメントに相同な領域を持つ MMU16 を確立する。更に、これらセグメントを有する DT40 と CHO 細胞との融合、微小核作成とその ES 細胞への導入を経てマウスを作成する。Ts1Cje トリソミーセグメントおよび Ts2Cje トリソミーセグメントに相同な領域を持つマウスについて、今までに我々自身で見いだした Ts1Cje および Ts2Cje におけるミトコンドリアの機能障害、活性酸素種の増加、タウ蛋白の過剰リン酸化、脂質過酸化の亢進、脳室拡大、神経新生の異常などが同様に見いだされるかを確認する。また、オープンフィールドテスト、新規物体に対する反応性のテスト、恐怖条件付け試験、受動的回避学習試験、Y 迷路試験などを用いた行動学的異常の検出と、海馬 CA1 錐体細胞および DG (歯状回) 顆粒細胞での長期増強 (LTP : long term potentiation) についても検討を加える。また、モノアミンなどの神経伝達物質の異常などの検討を、組織抽出物-電気化学検出器付き HPLC 解析にてセロトニン、ドーパミン、ノルエピネフリン、アセチルコリンなどの生体アミンや複数種の遊離アミノ酸を包括的に解析し、さらに *in vivo* マイクロダイアリシス-HPLC 法を用いて Ts1Cje の線条体での個々の神経伝達物質の放出量を検討することにより行う。更に、並行して作製した 2-3 の候補遺伝子についてノックアウトしたセグメントをトリソミーで持つマウスについて、これら異常の改善の有無を検証する。また、DT40 システムによる Ts1Cje トリソミーセグメントを持つマウスの作成に際して得られた ES 細胞において、酸化ストレスの亢進や脂質過酸化の亢進、それらのカスケードにかかわる蛋白の発現量、細胞内分布、活性 (リン酸化状態)

などの生化学的マーカーについて異常の探索/検討を行い、更にそれらの異常の改善の有無を Ts1Cje トリソミー上に存在する約 100 の遺伝子に対する RNAi (RNA 干渉) などにより検討することにより、ダウン症異常に寄与しうる遺伝子の大規模スクリーニングを試みる。加えて、培養細胞を用いた大規模スクリーニングにおいて最も異常パラメーターの改善の見られた 2-3 の遺伝子について実際に遺伝子ノックアウトを導入した ES 細胞およびマウスを作成し、それらにおいて異常の改善を更に確認するとともに、行動学的異常、LTP などの生理学的異常、神経伝達物質の異常等、他のパラメーターに検証の範囲を広げる。これらにより、当該候補遺伝子のダウン症における役割を更に詳細に明らかにする。

4. 研究成果

本研究の結果、HC21 相同 MC16 部分染色体 (Ts1Cje セグメント相当) を持つトリ細胞内の作成に成功した。また、HC21 相同 MC16 部分染色体トリ細胞内の HC21 相同 MC16 部分染色体を、CHO 細胞を介してマウス ES 細胞に導入することに成功した。更に、当該 ES 細胞を用いてマウスを作製した。また Ts2Cje トリソミーセグメントに相同な領域や、更にその領域を分断した MMU16 領域を持つ DT40 なども並行して作成した。これらは、候補領域の更なる絞り込みに強力なツールとなる。更には複数種の候補遺伝子についてノックアウトしたセグメントを持つ DT40 細胞およびマウスの作成も並行して行った。加えて、DT40 システムによる Ts1Cje トリソミーセグメントを持つマウスの作成に際して得られた ES 細胞において、酸化ストレスの亢進や脂質過酸化の亢進、それらのカスケードにかかわる蛋白の発現量、細胞内分

布、活性（リン酸化状態）などの生化学的マーカーについて異常の探索/検討を行ったが大きな異常は確認できなかった。今後、神経細胞に分化させて再検討する必要がある。また、Ts1CjeトリソミーセグメントおよびTs2Cjeトリソミーセグメントに相同な領域、更にはより小さい領域を持つRs1Rhrマウスについて、脂質過酸化の亢進、脳室拡大、神経新生の異常などの異常の有無を確認し、それぞれの責任染色体領域を更に絞り込む事に成功し、加えてその一部に責任を有する遺伝子を実際に同定した（論文準備中）。また、種々の行動試験を用いて過活動や記憶学習能力の異常を検出した。また、海馬CA1錐体細胞の長期増強（LTP: long term potentiation)における一部異常をマウスモデルにおいて見だし、それに関わる遺伝子候補を同定した（検証、再確認後に論文作成予定）。また、セロトニン、ドーパミン、ノルエピネフリン、アセチルコリンなどの生体アミンや複数種の遊離アミノ酸の異常をマウスモデルにて見だしした（論文準備中）。

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 1 件）

Yamakawa K (2012) Towards the understanding of Down syndrome using mouse models. *Congenital Anomalies* 52: 67-71、査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

Yamakawa K. (2011) 動物モデルでダウン症はどこまで解明できたのか?, 第 51 回日本先天異常学会年会 東京, 7 月 22-24 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山川 和弘 (YAMAKAWA KAZUHIRO)
独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究
チーム・チームリーダー
研究者番号: 3 0 2 4 1 2 3 5

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

下畑充志 (リサーチアソシエイト)、天野賢治 (研究員)、浅田幸江 (研究員)