

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 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791015

研究課題名（和文） ダウン症候群原因遺伝子の探索

研究課題名（英文） Research on the gene responsible for Down syndrome

研究代表者

浅田 幸江 (ASADA SACHIE)

独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・研究員

研究者番号：60415065

研究成果の概要（和文）：ダウン症候群の原因遺伝子を探索するスクリーニング系を考案した。ダウン症候群モデルマウスの神経細胞で認められる凝集様 CaMKII の増加をスクリーニングのマーカーとして、RNA 干渉法でトリソミー領域の遺伝子発現を抑制したときマーカーに影響する遺伝子を原因遺伝子の候補とする。このスクリーニング系が可能か検討するため、トリソミー領域に存在し CaMKII に影響する可能性がある Rcan1 遺伝子を用いてテストを行なった。その結果、Rcan1 遺伝子の発現を抑制すると凝集様 CaMKII が出現した神経細胞数が減少する傾向が示された。今回考案したスクリーニング法に改善点を加えれば、原因遺伝子のスクリーニングが可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：I constructed a screening system based on RNA interference (RNAi) to identify a gene responsible for mental retardation in Down syndrome (DS). I identified an aggregation-like CaMKII in primary neurons as a useful marker for screening. If the marker is changed by specific gene knockdown, the target gene could be a candidate one responsible for DS. To assess whether the screening system run or not, I performed a test for the screening system using Rcan1 gene that could be associated with CaMKII. The result of screening showed that specific inhibition of Rcan1 gene tends to decrease in a rate of neurons with aggregation-like structure of CaMKII. The method of screening should be improved some points, and a candidate gene responsible for DS could be found by this screening system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
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：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝子スクリーニング、ダウン症候群、精神遅滞、CaMKII、RNA干渉

1. 研究開始当初の背景

| ダウン症候群は21番染色体を過剰に持

つことで発症する染色体異常症である。その症状は、中枢神経系、心血管系、免疫系、消化器系など多様な器官に出現するが、個人差が大きく罹患者によってその症状は異なる。しかしながら、記憶学習障害による精神発達遅滞は全てのダウン症候群罹患者で発症する。ダウン症候群の発症には21番染色体全ての遺伝子が関与しているわけではなく、各症状において特定の遺伝子（もしくは遺伝子群）が関与する。21番染色体の遺伝子群のなかで精神発達遅滞に関与する可能性がある遺伝子として、DYRK、Rcan1、synaptojanin1が挙げられる。これらの遺伝子はトランスジェニックマウスの解析から中枢神経系の発達や神経系の機能に影響を与えることが示されており、ダウン症候群精神発達遅滞の原因遺伝子である可能性は極めて高い。しかしながら、21番染色体上の他の遺伝子については精神発達遅滞への関与は不明な点が多い。解析が進まない理由として、特定の遺伝子に着目して解析を進める現在の方法では、着目した遺伝子の関与を判定するまでに時間がかかり、また、着目した遺伝子と関連が無い遺伝子を見つけることが困難であることが最大の原因と思われる。このような状況を改善し原因遺伝子の特定を進めるには、21番染色体上の遺伝子を網羅的に解析する手法を必要とする。

2. 研究の目的

記憶学習障害による精神発達遅滞は全てのダウン症候群罹患者で発症することから、精神発達遅滞の発症機序を解明し治療法の開発に有用な知見として提示することができれば、全てのダウン症候群罹患者に有益な情報となり得る。そこで本研究では、トリソミー領域の遺伝子群から精神発達遅滞に関わる候補遺伝子を探索するスクリーニング系を考案し原因遺伝子を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞調整

初代神経細胞：胎生16日目マウスから脳を採取し、氷冷したMEM培地中でgenotyping終了まで保存した。胎児の尾をproteinase Kで30分間処理し、100°C 5分間の熱処理後遠心分離で得られた上精を用いてgenotypingを行ないTs1Cjeマウスの脳を判定した。Ts1Cjeマウスの脳から海馬を取り出しパパイン処理後ピペッティングで懸濁し細胞を分散した。懸濁した細胞にエレクトロポレーションでプラスミドを導入後96wellプレートに播種し4日間培養した。

ES細胞：Ts1Cjeマウスから樹立したES細胞を、ゼラチンコート処理したプレートで

培養した。12時間後H₂O₂を添加し24時間培養した。

(2) エレクトロポレーション

Neon Transfection System (Life Technologies)を用いてエレクトロポレーションを行なった。1wellに対し1.0~1.2x10⁵ cellsの細胞を調整し、0.4 μg/μlのpcDNA6.2-EmGFP-miR RNA (#1)を1 μl用いて、Pulse Voltage: 1500, Pulse Width: 10, Pulse Number: 3の条件でプラスミドを導入した。

(3) 免疫細胞染色およびDAPI染色

4% paraformaldehyde/PBS溶液で細胞を固定後PBSで洗浄し、methanolで-20°C、10分間処理した。0.1% Triton X-100で15分間処理後5% normal serumでブロッキングを行ない、抗CaMKII抗体(BD)とAlexa594で標識された抗マウス抗体と、抗MAP2抗体とAlexa647で標識された抗ヤギ抗体による2重染色を行ない、4mM DAPIを添加した50%グリセロール溶液に置換した。

(4) Rcan1に対するノックダウンベクターの構築とノックダウン効果の検討
Rcan1に対するmiRNA配列を4種類合成しpcDNA6.2-EmGFP (Life Technologies)にクローニングした。各プラスミドをリポフェクトアミンでNeuro2A細胞に導入し、フローサイトメーターを用いてEmGFP発現細胞を分取しRNAを調整した。Rcan1遺伝子に対するプローブとプライマー

(UPL Universal ProbeLibrary, Roche Diagnostics)を用いてリアルタイムPCR (LightCycler, Roche Diagnostics)によりRcan1のRNA量を計測しノックダウン効率を算出した。

(5) 蛍光顕微鏡によるマーカーの検出と画像解析

測定結果の正確性を上げるためwellの全エリアを測定し、また、検出感度の高い蛍光顕微鏡を用いる必要がある。その条件に合致した蛍光顕微鏡である自動細胞解析システム(CELAVIEW, Olympus)を用いて、凝集様CaMKII、神経細胞数(MAP2+ cells)、全細胞数(DAPIで染色された核の数)、RNA干渉が誘導された細胞(EmGFP+ cells)を測定し、凝集様CaMKIIのある神経細胞の割合(CaMKII+/EmGFP+/MAP2+)、トランスフェクション効率(EmGFP+/全細胞数)を算出した。測定は撮像した画像をCELAVIEWの画像解析ソフトを用いて解析した。

4. 研究成果

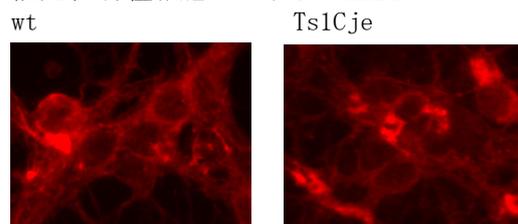
ダウン症候群モデルマウス(Ts1Cje)由来細胞で特異的に起こる異常(マーカー)を蛍光顕微鏡で検出し、RNA干渉法でトリソ

ミー領域の遺伝子発現を抑制後、コントロール群と遺伝子発現抑制群におけるマーカーを比較する。この実験系を基盤にして、トリソミー領域のそれぞれの遺伝子に対して RNA 干渉を行えば、各遺伝子のマーカーに対する効果を判定できスクリーニングが可能になる。このスクリーニングを行なうには以下の実験条件を決定しなければならない。そこで、必要となる実験条件を決定後、トリソミー領域内に存在する 1 遺伝子を用いて実験系が実行可能かテストを行なった。

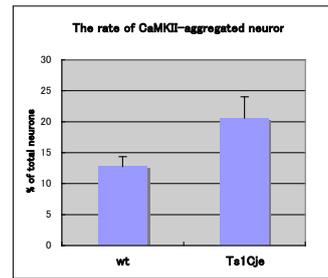
(1) スクリーニング用マーカーの検討

Ts1Cje マウス特異的に認められる変化を初代培養神経細胞と ES 細胞で探索した。培養後 4 日目の初代培養神経細胞において CaMKII の細胞免疫染色を行なうと細胞質に凝集様構造物として検出され (図 1 赤色: CaMKII)、Ts1Cje 由来細胞で有意に凝集様 CaMKII の増加が認められた (図 2、 $p=0.02$)。また、feeder-free の状態で培養した ES 細胞に 1 mM H_2O_2 を添加し 24 時間培養後 DAPI で染色し DNA 量を比較すると 4n 以上を示す細胞数が Ts1Cje 由来細胞で増加し、酸化ストレスに対する susceptibility が増加していることが示された (図 3)。Ts1Cje マウスの脳において酸化ストレスの異常が生じていることは当研究室から報告している。そこで、CaMKII の変化が培養細胞だけでなく個体で確認できるか検討を行った。初代培養細胞では培養後早期に凝集様 CaMKII が確認されたことから、個体においても出生後早期に CaMKII の異常が起きていると予想された。出生後 10 日目のマウスの脳を用いて CaMKII の免疫組織染色を行ない海馬で比較した結果、歯状回の顆粒細胞層と CA1 と CA3 の錐体細胞層において細胞質に強いシグナルが検出でき、特に歯状回の顆粒細胞層では CaMKII の斑点状のシグナルを持つ細胞が Ts1Cje マウスにおいて増加していた (図 4、5 赤色: CaMKII)。これらの結果から、Ts1Cje マウスの神経細胞で検出された CaMKII の異常は個体においても生じている可能性が高く、スクリーニングのマーカーとして CaMKII を用いることにした。

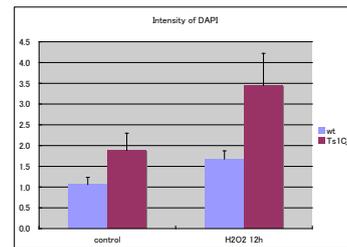
(図 1) 神経細胞における CaMKII



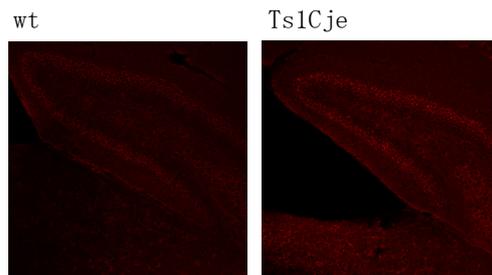
(図 2) CaMKII の凝集様構造を含む神経細胞の割合



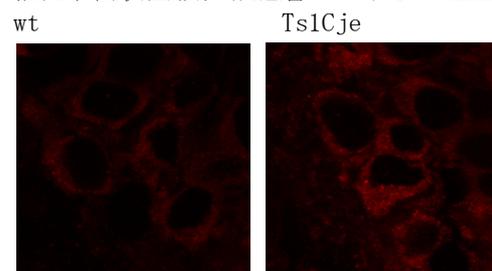
(図 3) DAPI 蛍光量による DNA 量の比較



(図 4) 歯状回における CaMKII



(図 5) 歯状回顆粒細胞層における CaMKII



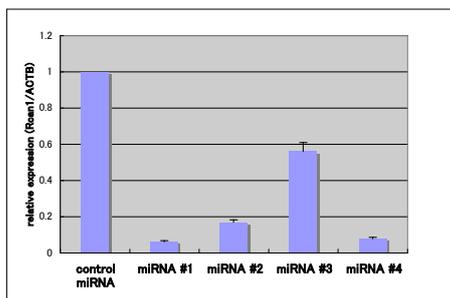
(2) RNA 干渉法の決定

培養細胞に RNA 干渉を誘導するには siRNA もしくは miRNA が用いられている。スクリーニングでは RNA 干渉が誘導された細胞を特定する必要があるため、siRNA を蛍光試薬で標識するか、蛍光タンパク質の遺伝子が挿入された RNA 干渉用発現ベクターを使用しなければならない。蛍光標識された siRNA を検討したが、神経細胞に導入できる分子数が少ないためか siRNA の蛍光を検出することが困難だったので発現ベクターを選択した。発現ベ

クターには、導入した miRNA の高発現が可能な pol II 系プロモーターを使用する pcDNA6.2-EmGFP を用いた。初代培養神経細胞にプラスミドを導入する際、脂質系トランスフェクション試薬を用いると試薬による細胞毒性の影響がでるため、プレートに撒く直前にエレクトロポレーションで細胞にプラスミドを導入し、生存した細胞について検討を行うことにした。

トリソミー領域の遺伝子のうち CaMKII に影響を与える可能性が高く、記憶学習能力にも関与する Rcan1 遺伝子を用いればスクリーニング系のテストを行なうことが可能だと考え Rcan1 に対する 4 種類の miRNA 発現ベクターを作製した。この発現ベクターのノックダウン効率を調べるため、神経系の細胞株である Neuro2A 細胞に導入しベクター内の EmGFP を発現している細胞をフローサイトメーターで分取し Rcan1 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR で計測した。その結果、各 miRNA (#1、#2、#3、#4) の抑制効率は 93.8%、82.9%、43.7%、92.1%であった (図 6)。そこで、スクリーニングのテストには miRNA#1 を用いて行なうことにした。

(図 6) Rcan1 遺伝子に対する RNA の効果



(3) Rcan1 遺伝子によるスクリーニング系のテスト

考案したスクリーニング系が実行可能か Rcan1 遺伝子を用いて検討した。Rcan1 遺伝子に対する RNA 干渉用プラスミド pcDNA6.2-EmGFP-miRNA#1 もしくはどの遺伝子にも影響しない control 配列が挿入された pcDNA6.2-EmGFP-miRNA control を Ts1Cje マウスから調整した初代培養神経細胞に導入し、自動細胞解析システム CELAVIEW を用いて、凝集様 CaMKII、神経細胞数 (MAP2+ cells)、全細胞数 (DAPI)、RNA 干渉された細胞数 (EmGFP+ cells) を測定し、凝集様 CaMKII を持つ神経細胞の割合 (EmGFP+/MAP2+)、トランスフェクション効率 (EmGFP+/全細胞数) を計測した (表 1、2)。1 well あたり 1000 から 3000 個の細胞について解析し、神経細胞の割合 (45%

から 50%)、プラスミドの導入効率がほぼ同等な well 間で比較した。コントロール群と Rcan1 遺伝子抑制群を比較すると、コントロール群の凝集様 CaMKII を持つ細胞の割合は平均 13.7%であるのに対して Rcan1 遺伝子抑制群では平均 8.2%であった。Ts1Cje マウスにおいて 3 コピー存在する Rcan1 遺伝子の発現量を抑制することで、CaMKII の凝集様構造を持つ細胞数が減少する傾向が認められた (図 7)。今回考案したスクリーニング系を用いてトリソミー領域の遺伝子群をスクリーニングする最終段階までは行なえなかったが、実験系としては実行可能であることが示された。今回用いたマーカーは Ts1Cje 細胞において新規に見出した異常であり、神経系における CaMKII の異常に Rcan1 遺伝子が関与している可能性があることが示唆される。トリソミー領域の遺伝子について同様の方法を行えば、CaMKII の異常に対するトリソミー領域の遺伝子群の関与について多くの情報が得られると推察される。

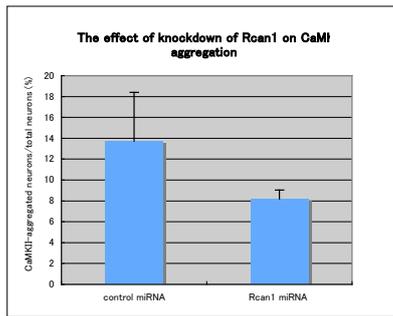
(表 1) 凝集様 CaMKII がある神経細胞の割合と RNA 干渉用プラスミドの導入効率

plasmid	Rate of CaMKII-aggregated cells (CaMKII+/EmGFP+/MAP2+) (%)	transfection efficiency (%)
control	18.0	11.2
control	14.5	10.9
control	8.8	11.3
miRNA #1	7.2	14.3
miRNA #1	8.8	14.8
miRNA #1	8.6	13.9

(表 2) 1 well 中の全細胞数と神経細胞の割合

plasmid	total cells	MAP2+/total cells (%)
control	2478.0	46.1
control	2490.0	50.8
control	1357.0	52.0
miRNA #1	2362.0	45.0
miRNA #1	2996.0	48.6
miRNA #1	2066.0	48.8

(図7) CaMKII 凝集様構造物に対する Rcan1 遺伝子発現抑制の効果



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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① 浅田 幸江、マウス大脳における Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) の発現解析、BMB2010、2012年12月8日、神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 幸江 (ASADA SACHIE)

独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・研究員

研究者番号：60415065