

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791097

研究課題名(和文) ダウン症候群精神遅滞発症に関する Cbr1 の評価

研究課題名(英文) Evaluation between Cbr1 copy number resumption and several abnormalities in Ts1Cje; a model for Down syndrome

研究代表者

下畑 充志 (SHIMOHATA, ATSUSHI)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・リサーチアソシエイト

研究者番号：00624735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：本課題では、ダウン症(DS)責任領域内遺伝子：Cbr1の過剰発現がDSマウスモデル：Ts1Cjeの異常表現型に及ぼす影響について、Cbr1のみを正常発現レベルに戻したTs1Cje/Cbr1(+/-)マウスを作製し解析を行った。今回の解析から、Cbr1の発現量亢進は、Ts1Cjeマウスで見られる低体重や多動、脳室拡大といった異常に直接的には関与しない可能性が考えられるが、その他学習機能低下や酸化ストレスの増加などの異常への関与については未知であり、今後解析を継続していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to evaluate whether the copy number resumption of Cbr1 gene located on DS critical region might rescue phenotypes seen in Ts1Cje:a model mouse for DS. We prepared and analyzed the Ts1Cje/Cbr1(+/-) mice in which Cbr1 gene only is set back to a normal expression level. We found that Cbr1 gene was not directly involved in neither decreasing of Body weight, hyper activity and ventricular enlargement in Ts1Cje. However, its possible implication in learning and memory deficit or oxidative stress increase in Ts1Cje remains elusive. We should continue our assessment of gene copy number resumption and their potential rescue of Ts1Cje abnormalities.

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：ダウン症候群 神経科学 モデルマウス 行動試験

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群 (Down syndrome : DS) はヒト 21 番染色体が 3 倍体となることで発症し、殆どの DS 患者では精神遅滞が認められる。また、多くの DS 患者で、心奇形やアルツハイマー病様の記憶障害、知能低下の進行、人格の変化といった痴呆症状が認められるが、現在 DS に対する有効な治療法はない。そのため DS の様々な症状、特に精神遅滞の発症機序解明と、その原因遺伝子の同定は DS 治療法の確立のために急務である。

DS 患者の脳組織入手は大変困難であり、動物モデルを用いた解析が有用である。現在、Ts65Dn マウスや Ts1Cje マウスが DS のモデル動物として広く知られ、病態研究に利用されている (Reeves R.H. et al., 1995, Sago H. et al., 1998)。これらのモデルマウスはヒト 21 番染色体と相同なマウス 16 番染色体領域の一部をトリソミーとしてもち、ともに電気生理学的検討における海馬長期増強現象 (LTP) の異常や行動試験における DS 精神遅滞様の記憶・学習異常を認める。しかし、Ts1Cje マウスは Ts65Dn マウスよりも狭い範囲の遺伝子をトリソミーとして持つことから、Ts1Cje マウスのトリソミー領域内の遺伝子が 3 倍体となることが DS 精神遅滞発症に重要であると考えられる。

我々の研究室では、Ts1Cje マウスのトリソミー領域にコードされる遺伝子の発現量のみが 1.5 倍に増加することを大規模な DNA チップ解析から明らかにした (Amano K. et al., 2004)。また Ts1Cje マウス由来アストロサイト初代培養細胞や Ts1Cje マウス脳においてミトコンドリアの機能障害、活性酸素種 (ROS) 量の増加および細胞内 ATP 量の減少といった異常を報告した (Sukkur E. A. et al., 2006)。さらに、Ts1Cje マウス脳、特に線条体領域で脂質過酸化が亢進していることを見出し (Ishihara K. et al., 2009)、in vitro、in vivo 両面から Ts1Cje マウス脳内で酸化ス

トレスが増加していることを報告している。そして、3 ヶ月齢の Ts1Cje マウス脳内海馬歯状回 (DG) 及び脳室下帯 (SVZ) で見られる成体神経新生 (Adult Neurogenesis) が減少していること、また側脳室の拡大が見られることを報告した (Ishihara K. et al., 2010)。成体神経新生は成体の記憶・学習機能と密接に関係していると考えられ、これら神経新生の障害は、例えば脆弱 X 症候群等に見られる精神遅滞症状の一因である可能性が報告されている (Weixiang G. et al., 2011)。

我々の研究室では、Ts1Cje マウスのトリソミー領域にコードされる遺伝子の発現量増加がこれらの異常を引き起こしており、DS の病態に重要であると考えている。そこで我々は Ts1Cje マウスで認められるこれらの異常の原因遺伝子を同定し、DS 治療への糸口を提示したいと考えている。

## 2. 研究の目的

今回 Ts1Cje マウスのトリソミー領域にコードされる遺伝子のうち、酸化ストレスに対し重要な役割を担っていると思われる Carbonyl reductase 1 (*Cbr1*) の DS 病態への関与について検討を行う事とした。*Cbr1* は、DS マウスモデルにおいて他のトリソミー遺伝子と比べて過剰発現が脳全体ではっきりと観察されており、重要な候補遺伝子であると報告されている (Sultan M. et al., 2007)。しかしながら、これまで DS 精神遅滞への関与についての報告はない。

当研究室では、Ts1Cje 脳内で酸化ストレスが亢進していることを報告しており (Sukkur E. A. et al., 2006, Ishihara K. et al., 2009)、これら異常と *Cbr1* の関与についての研究は非常に興味深いと考えている。既に *Cbr1* のノックアウトマウス ; *Cbr1*(+/-)マウスを作製しており、この *Cbr1*(+/-)マウスと

Ts1Cje マウスを交配させることにより得られる *Cbr1* のみが正常の 2 倍体となった Ts1Cje マウス; Ts1Cje/*Cbr1*(+/-) マウスを解析し、*Cbr1* の DS の病態への関与を明らかにする。Ts1Cje マウスで見られる他の異常表現型についても解析を行い、*Cbr1* の過剰発現が DS マウスモデルの異常表現型に及ぼす影響について個体レベルで解析してゆく。今回、このマウスを用いて行動試験及び MRI における脳室の測定を行ったので報告する。

### 3. 研究の方法

今回 Ts1Cje トリソミー領域内のどの遺伝子が異常に関与しているかを調べるために、トリソミー領域に存在する *Cbr1* (Carbonyl reductase 1) 遺伝子のノックアウトマウスを作成し、これと Ts1Cje マウスを交配し、Ts1Cje マウスのトリソミー領域のうち *Cbr1* のみ 3 コピーから正常 2 コピーに戻した Ts1Cje/*Cbr1*(+/-) マウスを作製した。11-15 週齢の雄 Ts1Cje マウス群、Ts1Cje/*Cbr1*(+/-) マウス群、同腹の野生型マウス (WT 群) を使用した。

体重測定：離乳時 (4-5 週齢) 及び下記行動実験時 (11-15 週齢) の同マウス群に対して体重測定を行った。

オープンフィールド試験：50cm x 50cm のアクリル製の実験装置 (オープンフィールド) の中にマウスをいれ、10 分間のマウスの探索行動 (活動量) を装置上部のカメラからモニターする。マウスの動いた移動距離、移動スピード、立ち上がり (リアリング) そして装置の底面を 25 区画に分けた時の中央 9 区画での滞在時間 (Center%) を専用行動解析プログラムで計測した (O'hara&Co., LTD.)

MRI 測定：マウスを Avatin で麻酔し、装置に固定する。イソフルランの吸引麻酔を行いながら BRUKER 400 Ultrashield, Para

Vision を用いて撮像を行った。マウスは随時呼吸をモニターしながら、133x133pixel、厚さ 0.12mm、60 枚の水平断画像を撮影した。撮影した画像は、NIH ImageJ：画像解析ソフトを用いて脳室、及び脳全体エリアの面積 (mm<sup>2</sup>) さらに、体積は、面積 (mm<sup>2</sup>) x 1 画像あたりの厚さ (0.12mm) で計算した。脳室エリアは、脳全体面積あたりの % 表示にて半定量的に解析を行った。統計処理は、Student T 検定、およびマンホイットニー-U 検定を用いた。

### 4. 研究成果

Ts1Cje/*Cbr1*(+/-) マウス群では、離乳時において Ts1Cje 群同様 WT 群に比べて約 2 割の体重減少が見られた。Ts1Cje/*Cbr1*(+/-) マウス群、Ts1Cje マウス群の体重減少は約 13 週齢でも見られるが、WT 群との差は 1 割程度となった。

オープンフィールド試験において、Ts1Cje/*Cbr1*(+/-) マウス群では、Ts1Cje マウス群と同じく WT マウス群と比較して、移動距離、移動スピードの上昇が見られた。またリアリング (立ち上がり) 行動も増加しており、多動性を示すことがわかった。一方、不安様行動と関連があるとされる中央部位で滞在時間には各マウス群の間に差は見られなかった。

次に MRI 測定による脳室の拡大について調べた。水平断連続撮像データから画像解析ソフトにより脳室領域の面積を積算し、半定量的に解析を行った。Ts1Cje マウス群では過去の解析結果同様、特に側脳室において WT 群に比べて顕著な脳室の拡大が見られた。Ts1Cje/*Cbr1*(+/-) マウス群でも同様に脳室の拡大が見られた。また Ts1Cje マウス群では背側第 3 脳室でも WT マウス群に比べ優位な拡大がみられたが、Ts1Cje/*Cbr1*(+/-) マウス群では拡大傾向

は見られたが優位な差ではなかった。その他、第4脳室、腹側第3脳室では各マウス群において有意な差は見られなかった。一方、脳体積について、Ts1Cje マウス群とWT マウス群の間には違いは見られなかったが、Ts1Cje/*Cbr1*(+/+/-)マウス群ではそれらマウス群と比べて増加していた。

#### [総括]

*Cbr1*は、NADPH 依存性の酸化還元酵素であり、Ts1Cje マウス脳において遺伝子発現量の亢進が見られる。今回の解析から、*Cbr1*の発現量亢進は、Ts1Cje マウスで見られる低体重や多動、脳室拡大といった異常に直接的には関与しない可能性が考えられるが、その他学習機能低下や酸化ストレスの増加などの異常への関与については未知であり、今後解析を継続していく必要がある。

#### 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)

[学会発表](計 1件)

1、下畑充志：ダウン症モデルマウス (Ts1Cje) の異常におけるダウン症責任領域内遺伝子：*Cbr1* の評価、日本人類遺伝学会第58回総会、2013年11月20-23日、仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www.brain.riken.jp/labs/ngs/indexj.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

下畑充志 (SHIMOHATA ATSUSHI)

理化学研究所・脳科学総合研究センター・  
リサーチアソシエイト

研究者番号：00624735