

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06940

研究課題名(和文)血管機能異常と炎症亢進に着目したダウン症の脳発達遅機構の解析

研究課題名(英文)A study on abnormal cerebrovascular function and accelerated inflammation in the developing brain with Down syndrome

研究代表者

石原 慶一 (Ishihara, Keiichi)

京都薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80340446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群(DS)では、脳発達遅滞が基盤と考えられる知的障害がみられる。本研究では、DSモデルマウスを用いて脳発達遅滞のメカニズムの理解を目指し、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行なった。結果、DSモデルマウス胎生期脳での炎症関連遺伝子の発現亢進を見だし、これが炎症細胞数の増加によるもの、さらにはErg遺伝子の3コピー化が原因であることを突き止めた。また、血管形成に重要な役割を演じるTbx1遺伝子の発現が半減することを見出した。DSモデルマウスでの血管形態の異常は認められなかったが、Erg遺伝子とTbx1遺伝子がDS知的障害で重要な役割を演じている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダウン症の知的障害の原因などは全く分かっていなかったが、我々は、新しくダウン症の脳発達の遅れや知的障害に関係していると思われる遺伝子としてErg遺伝子とTbx1遺伝子を発見した。特に、Erg遺伝子では、胎児期の脳発達の遅れの原因とされる神経新生の低下の原因であることもマウスを用いた実験で明らかにしたことは、ダウン症の知的障害の胎内治療の実現化において重要な知見であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Down syndrome (DS), is the most common genetic cause of intellectual disability that is assumed to be associated with delayed brain development. The aim of this research project is to understand the mechanisms underlying the delayed brain development in DS. For this purpose, a comprehensive expression analysis of genes was employed. DNA microarray analysis revealed that inflammation-related genes are increased in expression, and flowcytometric analysis revealed that increased expression of inflammation-related genes is caused by increased number of inflammatory cells. Furthermore, we demonstrated that triplication of the Erg gene resulted in increased number of inflammatory cells. Separately, we also identified a decreased expression of Tbx1 gene, which related to brain angiogenesis, in the brain of DS mouse models. Although we failed to detect an abnormal brain-vasculature in DS embryos, we proposed that Erg and Tbx1 genes are assumed to play a role in DS intellectual disability.

研究分野：病態生化学

キーワード：ダウン症候群 神経新生 網羅的遺伝子発現解析 炎症 脳マクロファージ 炎症細胞

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群 (DS) は、通常 2 本の 21 番染色体が 3 本となり発症する染色体異常症であり、遺伝性疾患としては最も頻度の高い知的障害の原因である。DS の最大のリスク因子は、母親の年齢の上昇であることから、晩婚化が進む現代社会では高齢出産が多くなり、DS の出生率は上昇すると考えられている。このような社会背景の中、未だ有効な治療法のない DS 知的障害に対する治療法の開発は急務である。

DS 知的障害の分子メカニズムは未だ不明であるが、DS 胎児の死後脳の解析から、胎生期における神経数の減少に伴う脳発達遅滞が示唆されており、脳発達遅滞を基盤とする知的障害が想定されている。DS 知的障害の解析には、DS モデルマウスを用いた研究が盛んに行われており、DS モデルマウスの成体期での記憶学習障害が知的障害の指標とされる。現在樹立されている DS モデルマウスの多くは、ヒト 21 番染色体と相同のマウス 16 番染色体のテロメア側の領域 (約 130 遺伝子をコード) の全部あるいは一部が 3 コピーとなったものであり、様々な長さのトリソミー領域をもち、遺伝子-表現型関連解析に有用である。それらのうち、Ts1Cje マウスは約 70 遺伝子をコードする領域が 3 コピーとなった DS モデルマウスであり、モリス水迷路試験における記憶学習障害が見られることから、知的障害の責任遺伝子が Ts1Cje マウスのトリソミー領域に存在すると考えられている (Sago et al., 1998 *PNAS*)。その他にも、Ts1Cje マウスの海馬スライスでの長期増強 (LTP) の減少、スパイン形態の異常といった記憶学習障害を支持する電気生理学的知見や形態学的知見も報告されており、我々も、記憶学習との関連が示唆されている成体期海馬歯状回での神経新生の減少を検出しており報告している (Ishihara et al., 2010 *Cereb. Cortex*)。また、Ts1Cje マウスの成体期脳での脂質過酸化の亢進を検出しており、酸化ストレスの亢進を基盤とした記憶学習障害を推察している (Ishihara et al., 2009 *J. Neurochem.*)。この様に多くの研究グループによる成果が Ts1Cje マウスの記憶学習障害を示唆していることから、DS 知的障害のメカニズムの解析に適したモデルマウスと考えられる。また、成体期のみならず我々は、胎生期にも焦点を当て、記憶学習障害 Ts1Cje マウスの知的障害の基盤として、胎生期脳の発達遅滞の可能性を考え、胎生期 14.5 日目 (E14.5) の Ts1Cje 胎仔大脳皮質における神経新生について検討し、その減少を見出している (Ishihara et al., 2010 *Cereb. Cortex*)。これらの結果は、胎生期脳の発達遅滞が基盤となって、成体期での記憶学習障害に繋がり、これらの一連の異常が DS の知的障害であると想定した。そこで、我々は Ts1Cje マウスの胎仔脳および成体脳での発現変動分子を捉えることで、DS 知的障害の分子メカニズムの解明を試みた。まずは、プロテオミクス解析を用いて Ts1Cje マウスの成体期および胎生期における発現変動タンパク質の同定を試みたが、意外にも成体期では発現変動分子は認められず、胎生期では 5 つのタンパク質のみの変動の検出に留まった (Ishihara et al., 2014 *Neuroscience*)。一方、Ts1Cje マウス脳を用いたマイクロアレイ解析は幾つか報告があり、新生児ではトリソミー領域遺伝子のみが遺伝子量依存的な発現増加のみが検出された報告 (Amano et al., 2004 *Hum. Mol. Genet.*) や E15.5 胎生期脳でトリソミー領域に加え、多くの 2 コピー遺伝子群の変動を明らかとした報告 (Gudi et al., 2016 *Am. J. Med. Genet. A.*) などが散見される状況であったが、明確な神経新生減少の分子メカニズムは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目標は、DS 知的障害のマウスモデルを用いた原因遺伝子および病態メカニズムの解明と DS 精神遅滞の治療戦略の構築である。我々は、Ts1Cje マウスで見出した胎生期の脳発達遅滞と成体期での記憶学習障害が DS 知的障害のマウスにおける表現型であると考え、これらの異常表現型の責任遺伝子の同定とその病態分子機構の解明を目的としており、両表現型の関連性も明らかにしたいと考えている。

そこで、我々は、マイクロアレイ解析を用いて、Ts1Cje マウス胎生期脳における発現変動転写産物の同定を試み、その発現変動分子情報から、DS 胎生期脳での異常を推察し、神経新生との関連性について検証することで、Ts1Cje マウス胎生期脳での脳発達地帯のメカニズムの解明を目的として本研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

- (1) 動物実験: すべての動物実験は、京都薬科大学の動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。
- (2) 網羅的遺伝子発現解析: Ts1Cje マウスおよび同腹野生型マウスの E14.5 脳での転写産物の発現に関して、SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8×60K チップ (Agilent Technologies) を用いたマイクロアレイ解析を行なった。発現変動がみられた遺伝子産物に対する Functional Annotation Clustering 解析は、網羅的発現変動解析結果の Clustering 解析において最も広く用いられている解析ソフトである DAVID v.6.7 を用いて行った。
- (3) 胎生期および成体期における神経新生の検討: 雄性 Ts1Cje マウスと雌性 C57BL/6J マウスを交配させ得た妊娠マウス (E13.5) に BrdU (50 mg/kg) を腹腔内投与した。投与後 24 時

間において、胎生期脳を摘出し BrdU 抗体と Ki67 抗体を用いた免疫染色を行い、stereo investigator により BrdU(+)細胞に対する BrdU(+)/Ki67(-)細胞の割合を算出し胎生期神経新生とした。また、成体期海馬における神経新生の評価では、12 週齢のマウスに BrdU (300 mg/kg) を 1 日 1 回、7 日間毎日同時刻に腹腔内投与し、BrdU(+)細胞を免疫染色にて検出し、成体期神経新生数とした。

- (4) モリス水迷路試験: マウスの空間記憶学習能を評価するために、12 週齢のマウス (WT, n = 10; Ts1Cje, n = 9 および Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup>, n = 4) を用いてモリス水迷路試験を行った。水面下のプラットホーム探索する訓練試行では、水面を 4 分割した任意の 1 区画よりマウスを水面に放ち、プラットホームに到達するまでに要した時間を計測した。本試行を 1 ブロック 4 回 (4 回とも異なる位置からマウスをプールに入れた)、1 日 2 ブロック繰り返し、計 5 日間行った。その後、6 日目に、プラットホームを撤去したプールにマウスを放ち、プローブテストを行った。プローブテストは 1 匹につき 1 回のみで、マウスの水泳行動を 60 秒間観察した。マウスの水泳時間のうち、プラットホームを設置していた区画における滞在時間の割合を計測し、空間記憶の指標とした。プールにおけるマウスの活動は、コンピューターに接続したビデオカメラで上方から撮影し、解析ソフト EthoVision XT 11.5 (Noldus Information Technology, Wageningen, Nederland) を用いて、プラットホームへの到達時間およびそれぞれの区画における滞在時間を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Erg 遺伝子の 3 コピー化による炎症性細胞の増加と神経新生減少

DS モデルマウス Ts1Cje 胎生期脳における遺伝子発現解析

Ts1Cje マウス胎生期 E14.5 脳における発現変動遺伝子をマイクロアレイにより解析した結果、61 遺伝子の転写産物 (うち 21 遺伝子は DS トリソミー領域に含まれる遺伝子) の発現は WT マウスと Ts1Cje マウス間で有意に異なっていた (発現量比が 1.5 倍より大きいまたは 0.5 倍未満かつ  $p < 0.05$ )。多くのトリソミー領域遺伝子は、遺伝子領域依存的な発現量の増加が検出され、他のステージでの DS モデルマウス脳でのマイクロアレイ結果と一致するものであった。また、初めて我々は、炎症関連遺伝子群の発現増加を検出した。この結果は、他の DS モデルマウスである Ts1Cje マウスのトリソミー領域よりも長いトリソミー領域をもつ Ts2Cje マウスや短いトリソミー領域をもつ Ts1Rhr でも確認した。以上より、DS モデルマウスの脳発達遅滞のみられる E14.5 脳では、炎症関連遺伝子の亢進が認められ、この原因遺伝子は Ts1Rhr マウスのトリソミー領域 (約 30 遺伝子) に存在することが明らかとなった。

DS モデルマウス胎生期脳での炎症遺伝子発現亢進の原因遺伝子の同定

Ts1Rhr マウスのトリソミー領域遺伝子のうち、炎症への関連性が示唆されているものとして、Ets2 と Erg 遺伝子が考えられた。そこで、Ets2 ヘテロ欠損マウスについては、通常のジーンターゲット法にて作製し、Erg については、機能喪失変異導入マウスを Warren S Alexander 教授 (豪) から導入し、Ts1Cje マウスと交配させることで、目的の遺伝子のみが正常 2 コピーとなった Ts1Cje マウスを作製し、解析することで原因遺伝子であるかについて判定した。その結果、Erg 遺伝子のみを 2 コピーとした Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウスで著しい炎症関連遺伝子群の発現亢進減少が認められたことから、Erg 遺伝子の 3 コピー化が Ts1Cje マウスの胎生期脳での炎症関連遺伝子群の発現亢進の原因であることが明らかとなった。

Erg 遺伝子の 3 コピー化による Ts1Cje 胎生期脳における炎症性細胞の増加

Ts1Cje マウス胎仔脳での炎症関連遺伝子群の発現亢進が炎症性細胞数の増加に起因していると考え、フローサイトメトリーにて好中球などの炎症細胞について検討した。その結果、Erg 遺伝子の 3 コピー化による (1) 好中球・単球細胞数の増加、(2) 脳内マクロファージ数の減少を明らかにした。さらに、脳内マクロファージに関しては、免疫染色によってその細胞数の減少と形態の変化についても明らかとし、Ts1Cje マウスでは活性化型脳内マクロファージが多いことを明らかにした。

Erg 遺伝子の 3 コピー化による Ts1Cje 胎生期脳における神経新生の低下

Ts1Cje マウスの胎生期神経新生減少に対する Erg 遺伝子の 3 コピー化の影響を評価するために、E14.5 の Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウスの胎生期大脳皮質領域における神経新生について BrdU 標識法にて解析した。その結果、Ts1Cje マウスで認められた有意な神経新生の低下は Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウスでは検出されず、WT マウスと同程度であった。本結果は、Ts1Cje マウス胎生期大脳皮質において Erg 遺伝子の 3 コピー化が神経細胞の新生を抑制することを示唆している。

Erg 遺伝子の 3 コピー化による成体期神経新生および記憶学習障害に対する影響

Ts1Cje マウスでは、成体期海馬での神経新生の低下 (Ishihara et al., 2010 *Cereb. Cortex*) と記憶学習障害 (Sago et al., 1998 *PNAS*) が認められる。また、これらの異常の基盤として胎生期脳での神経新生低下を伴う脳発達遅滞が考えられていることから、Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウス

の成体神経新生と記憶学習について検討した。In vivo BrdU 標識法にて成体神経新生について、また、モリス水迷路試験によって記憶学習能を検討したところ、Ts1Cje-Erg<sup>+/+md2</sup> マウスも Ts1Cje マウスと同様の成体神経新生減少と記憶学習障害を示したことから、DS モデルマウスの記憶学習障害と胎生期での神経新生減少は独立した異常であることが考えられた。

## (2) DS モデルマウス胎生期脳および成体期海馬における Tbx1 の発現減少

DS モデルマウス Ts1Cje 成体期海馬における遺伝子発現解析

DS 成体期における認知機能障害の関連遺伝子を同定するために、12 週齢の Ts1Cje マウスの海馬を用いた DNA マイクロアレイ解析を行い、トリソミー領域遺伝子の遺伝子量依存的な発現増加に加え、69 遺伝子の発現増加や 4 遺伝子の発現減少を検出した。なかでも、発達関連遺伝子である T-box1 (Tbx1) 遺伝子の発現減少は、胎生期脳でも同様に認められ、唯一、非トリソミー領域遺伝子で胎生期と成体期で共通して発現減少がみられる遺伝子であった。

複数の DS モデルマウスにおける Tbx1 遺伝子発現の減少

定量リアルタイム RT-PCR 法により Tbx1 遺伝子発現の減少を Ts1Cje マウスよりも長い約 120 遺伝子がコードされたトリソミー領域をもつ Dp(16)1Yey/+ マウスと短いトリソミー領域の Ts1Rhr マウスの E14.5 胎生期脳および 12 週齢の成体海馬で検討したところ、Dp(16)1Yey/+ マウスでは Ts1Cje マウスと同様、E14.5 脳および成体海馬において Tbx1 mRNA の発現が WT マウスに比し半減していた。一方、Ts1Rhr マウスにおいては、胎生期脳では Tbx1 mRNA の発現が有意に減少していたが、成体期海馬において有意な Tbx1 mRNA の発現減少は検出されなかった。

血管形態異常に関する検討

Tbx1 遺伝子は、脳血管形成に必要であることが、その欠損マウスの解析から明らかになっている (Cioffi et al., 2014 *Hum. Mol. Genet.*)。そこで、血管形態について Ts1Cje マウス、Dp(16)1Yey/+、および Ts1Rhr マウスの E14.5 脳で CD31 抗体を用いた蛍光免疫組織染色法にて検討したところ、全て WT と同様の血管形態であった。また、E18 でも血管形態の異常を見出すことはできなかった。

これらの研究成果は、胎生期から成体期にかけてみられる DS 知的障害にトリソミー遺伝子である Erg 遺伝子や非トリソミー遺伝子の Tbx1 遺伝子が関与している可能性を示唆するものであり、全て初めての知見である (図 1)。今後は既に知的障害への関与が示唆されている Dyrk1a などといった遺伝子との関連性を明らかにすることで、DS 知的障害の全容を明らかにできると考えている。

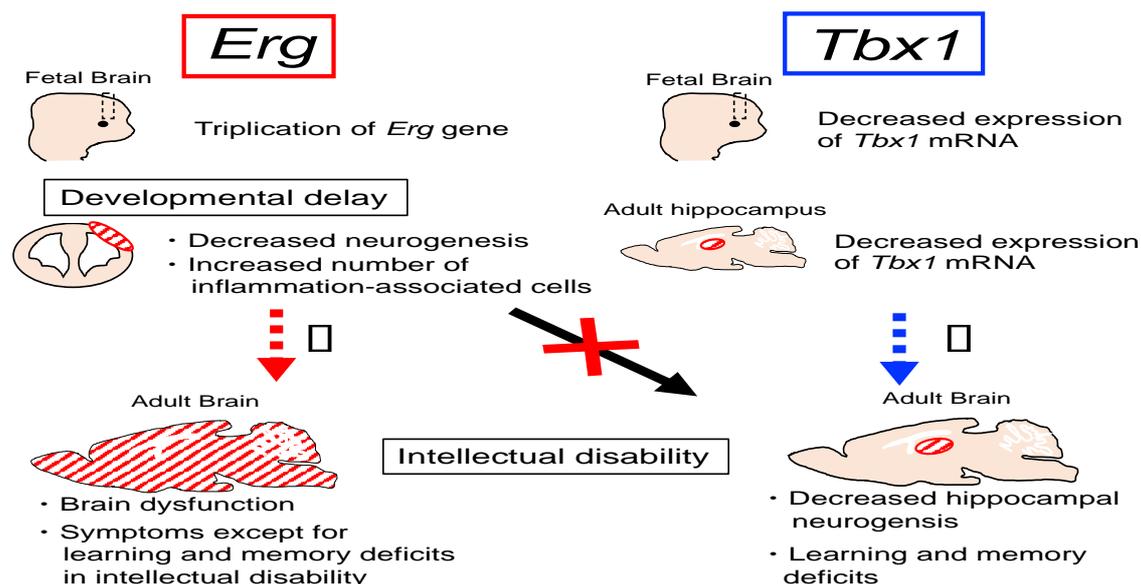


図 1 Erg 遺伝子と Tbx1 遺伝子の発現変動による DS 知的障害の発現仮説

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishihara K, Shimizu R, Takata K, Kawashita E, Amano K, Shimohata A, Low D, Nabe T, Sago H, Alexander WS, Ginhoux F, Yamakawa K, Akiba S.	4. 巻 30
2. 論文標題 Perturbation of the immune cells and prenatal neurogenesis by the triplication of the Erg gene in mouse models of Down syndrome.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 75-91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa.12758.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 石原慶一, 河下映里, 秋葉 聡	4. 巻 154
2. 論文標題 ダウン症モデルマウス脳での銅蓄積とその病態生理学的意義	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 333-339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.154.335.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishihara K, Kawashita E, Shimizu R, Nagasawa K, Yasui H, Sago H, Yamakawa K, Akiba S.	4. 巻 134
2. 論文標題 Copper accumulation in the brain causes the elevation of oxidative stress and less anxious behavior in Ts1Cje mice, a model of Down syndrome.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radic Biol Med.	6. 最初と最後の頁 248-259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimizu Ryohei, Ishihara Keiichi, Kawashita Eri, Sago Haruhiko, Yamakawa Kazuhiro, Mizutani Ken-ichi, Akiba Satoshi	4. 巻 535
2. 論文標題 Decrease in the T-box1 gene expression in embryonic brain and adult hippocampus of down syndrome mouse models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 87~92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Keiichi	4. 巻 141
2. 論文標題 Is Neuron-Vascular Communication Disturbed in the Delayed Prenatal Brain Development of a Mouse Model of Down Syndrome?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 369 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00198-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishihara Keiichi、Mizutani Ken-ichi	4. 巻 141
2. 論文標題 Brain Development Coordinated by Interactions between Neurons, Glial Cells and Central Vascular System, and Disease Caused by Its Disturbance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 333 ~ 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00198-F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Keiichi Ishihara, Eri Kawashita, Ryohei Shimizu, Hiroyuki Yasui, Kazuki Nagasawa, Haruhiko Sago, Kazuhiro Yamakawa, Satoshi Akiba
2. 発表標題 Comparative elementomic analysis reveals copper accumulation in the brain in Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome
3. 学会等名 3rd International Conference of the Trisomy 21 Research Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原慶一
2. 発表標題 ダウン症中枢症状の治療標的候補としての銅蓄積の同定
3. 学会等名 第30回日本微量元素学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原慶一
2. 発表標題 ダウン症の胎生期脳発達遅滞における神経-血管相互作用異常の可能性
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原慶一
2. 発表標題 ダウン症モデルマウス成体脳での銅蓄積-新規治療標的としての可能性-
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石原慶一
2. 発表標題 ダウン症モデルマウスにおける血管新生調節転写因子の3コピー化による胎生期ニューロン新生異常.
3. 学会等名 日本薬学会第139年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiichi Ishihara
2. 発表標題 Elementomics reveals the accumulation of copper in the brain of a Down syndrome model mouse and its pathophysiological significance.
3. 学会等名 The 92nd Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原慶一、清水涼平、河下映里、ウォレン アレキサンダー、左合治彦、山川和弘、秋葉 聡
2. 発表標題 ダウン症モデルマウスにおける炎症性細胞数異常および大脳皮質発達遅延とその原因遺伝子の同定.
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石原慶一
2. 発表標題 ダウン症モデルマウスと病態研究について
3. 学会等名 第2回日本ダウン症学会学術集会(招待講演)(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都薬科大学 病態生化学分野 <a href="http://labo.kyoto-phu.ac.jp/byoutai/byoutai-j.html">http://labo.kyoto-phu.ac.jp/byoutai/byoutai-j.html</a> 京都薬科大学病態生化学分野 <a href="http://labo.kyoto-phu.ac.jp/byoutai/achievement.html">http://labo.kyoto-phu.ac.jp/byoutai/achievement.html</a>
---

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	WEHI	University of Melbourne		
シンガポール	A*STAR			