

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790758  
 研究課題名（和文）ダウン症候群精神遅滞の発症におけるDSCAMの役割の検証  
 研究課題名（英文）Investigation of roles of DSCAM in mental retardation of Down syndrome

研究代表者  
 天野 賢治 (Amano Kenji)  
 独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・リサーチアソシエイト  
 研究者番号：60333340

研究成果の概要（和文）：精神遅滞様症状を示すダウン症候群モデルマウス（Ts1Cje）を用い、DSCAM 遺伝子のみを3倍体から2倍体に戻したマウスを作製することにより、DSCAMの役割を検討した。その結果、Ts1Cje マウスで見られる体重減少、Y迷路試験での空間的作動記憶の異常、脳室拡大の各パラメーターに関して、DSCAMの関与は認められなかった。このことから、Ts1Cje マウスで見られる上記表現型は、DSCAM 遺伝子単独の過剰発現により発症しているのではないと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome, shows several abnormal phenotypes including decreased body weight, deficient spatial memory in Y-maze task, and enlarged brain ventricles that might relate to the mental retardation of Down syndrome. I compared these phenotypes between Ts1Cje and Ts1Cje-Dscam(+/+/-) mice to investigate the roles of DSCAM, but the phenotypes were not improved in Ts1Cje-Dscam(+/+/-) mice. These results suggest that the overexpression of DSCAM does not lead to these phenotypes in Ts1Cje mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：ダウン症候群、精神遅滞、Ts1Cje、DSCAM

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト 21 番染色体は、その大部分がマウス 16 番染色体上の一部領域と相同であり、この相同領域の内 Sod1（機能は失われている）から Znf295 までの約 97 個の遺伝子を含む領域がトリソミーである Ts1Cje マウス、Mrpl39

から Znf295 までの約 136 個の遺伝子を含む領域がトリソミーである Ts65Dn マウスは、共に特有な顔貌を呈し (Richtsmeier et al., 2002)、モリス水迷路試験における空間的作動記憶に障害が見られ、この障害は Ts65Dn マウスでより重度である (Sago et al., 2000)。また、海馬における LTP (long-term

potentiation) の異常も報告されており (Siarey et al., 1999, 2005)、学習記憶障害との関連が示唆されている。我々は、Ts1Cje マウス脳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等を見いだした (Shukkur et al., 2006)、学習記憶障害との関連についてさらに研究を進めている。Ts1Cje マウス脳における遺伝子発現様式については、平成 16 年度から平成 17 年度にかけて、科学研究費補助金 課題番号 16790604、研究課題名「ダウン症マウスモデル (Ts1Cje) を用いた体系的遺伝子発現解析」により、Ts1Cje マウスの生後 0 日目の脳を用い GeneChip 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、つまりダウン症候群の発症機序には 21 番染色体上遺伝子の過剰発現が直接的に関与するという "gene dosage effect" 仮説を支持する結果を報告した (Amano et al., 2004)。この結果から、トリソミー領域内の亢進した遺伝子発現量を元に戻すことにより、ダウン症候群患者で見られる症状を改善することが出来るのではないかという着想に至った。

DSCAM は神経細胞接着因子であり、軸索誘導や繊維束形成など神経ネットワークの形成・維持に重要な役割を担う神経系免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。その発現はマウスでは発生段階(胎生 9.5 日目以降)から成体にかけて主に中枢神経系で見られ、海馬においても強い発現が観察される (Yamakawa et al., 1998; Agarwala et al., 2001)。Ts1Cje マウスの脳では、Dscam が発現亢進していることを確認しており (Amano et al., 2004)、またダウン症候群患者での DSCAM の過剰発現も報告されている (Saito et al., 2000)。さらに、Dscam の僅かな発現量の増減は、ショウジョウバエでは神経ネットワークの形成異常を引き起こすことが報告されている (Schmucker et al., 2000)。申請者は、哺乳類の生体内での DSCAM の機能を解析するために Dscam ノックアウトマウスを作製し、3 か月齢 Dscam ヘテロマウスの海馬 CA1 領域での LTP の異常を見いだした (未発表データ)。これらの結果から、DSCAM がダウン症候群精神滞滯の発症に関与する候補遺伝子の一つと考えるに至った。Dscam ノックアウトマウスの解析については、平成 18 年度から平成 19 年度にかけて、科学研究費補助金 課題番号 18790744、研究課題名「出生後 24 時間以内に死亡する Dscam ノックアウトマウスを用いた呼吸障害の解析」により、Dscam ノックアウトマウスが中枢性の呼吸障

害を示すこと、具体的には延髄呼吸中枢に存在するリズム形成ニューロンである Pre-inspiratory (Pre-I) ニューロンの同期した活動が低下していることを見いだした (Amano et al., 2009)。

#### 参考文献

- Agarwala KL, Ganesh S, Amano K, Suzuki T, Yamakawa K (2001) DSCAM, a highly conserved gene in mammals, expressed in differentiating mouse brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281: 697-705.
- Amano K, Sago H, Uchikawa C, Suzuki T, Kotliarova SE, Nukina N, Epstein CJ, Yamakawa K (2004) Dosage-dependent over-expression of genes in the trisomic region of Ts1Cje mouse model for Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 13:1333-1340.
- Amano K, Fujii M, Arata S, Tojima T, Ogawa M, Morita N, Shimohata A, Furuichi T, Itohara S, Kamiguchi H, Korenberg JR, Arata A, Yamakawa K (2009) DSCAM deficiency causes loss of pre-inspiratory neuron synchronicity and perinatal death. *J. Neurosci.* 29:2984-2996.
- Ishihara K, Amano K, Takaki E, Shimohata A, Sago H, Epstein CJ, Yamakawa K (2009a) Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome. *Cereb. Cortex in press.*
- Richtsmeier JT, Zumwalt A, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH (2002) Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 107:317-324.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Rubin EM, Crnic LS, Huang T-T, Epstein CJ (2000) Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr. Res.* 48:606-613.
- Saito Y, Oka A, Mizuguchi M, Motonaga K, Mori Y, Becker LE, Arima K, Miyauchi J, Takashima S (2000) The developmental and aging changes of Down's syndrome cell adhesion molecule expression in normal and Down's syndrome brains. *Acta Neuropathol.* 100:654-664.
- Schmucker D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE, Zipursky SL (2000) *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* 101:671-684.
- Shukkur EA, Shimohata A, Akagi T, Yu W, Yamaguchi M, Murayama M, Chui D, Takeuchi T,

- Amano K, Subramhanya KH, Hashikawa T, Sago H, Epstein CJ, Takashima A, Yamakawa K (2006) Mitochondrial dysfunction and tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 15:2752-2762.
- Siarey RJ, Carlson EJ, Epstein CJ, Balbo A, Rapoport SI, Galdzicki Z (1999) Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology* 38:1917-1920.
- Siarey RJ, Villar AJ, Epstein CJ, Galdzicki Z (2005) Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology* 49:122-128.
- Villar AJ, Belichenko PV, Gillespie AM, Kozy HM, Mobley WC, Epstein CJ (2005) Identification and characterization of a new Down syndrome model, Ts[Rb(12.17<sup>16</sup>)]2Cje, resulting from a spontaneous Robertsonian fusion between T(17<sup>16</sup>)65Dn and mouse chromosome 12. *Mamm. Genome* 16:79-90.
- Yamakawa K, Huo Y-K, Haendel MA, Hubert R, Chen X-N, Lyons GE, Korenberg JR (1998) DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum. Mol. Genet.* 7:227-237.

## 2. 研究の目的

本研究課題では、ダウン症候群マウスモデルである Ts1Cje マウス、及び Ts65Dn マウスと同じ領域の部分トリソミーである Ts2Cje マウスを用い、Dscam ヘテロマウスと交配を行い、トリソミー領域内の Dscam のみを 3 倍体から 2 倍体に戻すことにより、精神遅滞様症状が改善されるかどうかを検討することを目的とする。最近報告された Ts2Cje マウスは、Ts65Dn マウスが余分に持つ独立した部分 16 番染色体がロバートソニアン転座により 12 番染色体セントロメアに融合した染色体を持ち、染色体数としては 40 本であるため、Ts65Dn マウスに比べて次世代で部分トリソミーマウスの生まれる割合が高いという利点がある (Villar et al., 2005)。また、Ts65Dn マウスは Ts1Cje マウスに比べて水迷路試験において重度な障害を示すが、Ts65Dn

マウスでのみトリソミーになっている領域 (Mrpl39 から Sod1) の遺伝子 (複数?) と Dscam が共に過剰発現することにより、学習記憶障害を重症化している可能性も考えられるため、Ts2Cje マウスを用いた検討も行う。検討項目としては、発達障害をみる一つの指標としての体重、Y 迷路試験などの学習・記憶に関連する行動学的解析、電気生理学的解析による LTP の測定、最近新たに見出した脳室拡大 (Ishihara et al., in press) 等の脳の組織学的解析などとし、DSCAM とダウン症候群精神遅滞との関連について総合的に判断をする。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス

実験に使用するマウス一群 (Ts1Cje (或は Ts2Cje) マウス・Dscam のみ 2 倍体に戻した Ts1Cje (或は Ts2Cje) マウス・正常マウス) は、Ts1Cje (或は Ts2Cje) マウスと Dscam ヘテロマウスを交配することにより得た。本実験で使用したマウスは、全て雄個体である。なお、現時点では、Ts2Cje マウスを用いた実験は未だ行っていない。

### (2) 体重測定

得られたマウス一群について、離乳時 (1 か月齢) 及び 3 か月齢時において体重を測定した (Ts1Cje マウス 13 個体、Dscam のみ 2 倍体の Ts1Cje マウス 13 個体、正常マウス 12 個体)。

### (3) Y 迷路試験

学習・記憶に関連する行動試験としては、約 3 か月齢時において Y 迷路試験を行った (Ts1Cje マウス 18 個体、Dscam のみ 2 倍体の Ts1Cje マウス 15 個体、正常マウス 15 個体)。この試験では、Y の字型をした 3 本のアームから成る迷路 (各アームの長さ: 40 cm、アーム下部の幅: 3 cm、アーム上部の幅: 10 cm、アームの高さ: 12 cm、地上からの高さ: 50 cm) (小原医科産業株式会社、日本) を用い、5 分間マウスを自由に探索させ、その際マウスが直前にいたアームを避けて新しいアームを選ぶという性質を利用し、空間的作動記憶を評価した。なお、測定時の明るさは 5 lux とした。

### (4) 脳室の大きさの測定

脳室の大きさは MRI により測定した (Ts1Cje マウス 3 個体、Dscam のみ 2 倍体の Ts1Cje マウス 3 個体)。MRI は、vertical-bore 9.4-T Bruker AVANCE 400WB imaging spectrometer、及び 250 mT/m actively shielded imaging gradient insert (Bruker BioSpin, Ettlingen, Germany) を使用した。実験に際し、マウスは 1.5-2% イソフルランにより麻酔し、T2 強調画像を撮影した。画像は、

冠状断に 0.5 mm 間隔で 31 枚撮影し、脳室の大きさを比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 体重の比較

離乳時 (1 か月齢) の体重は、正常マウスが  $18.9 \pm 0.4$  g であるのに対し、Ts1Cje マウスは  $11.9 \pm 0.7$  g と有意に低く ( $p < 0.001$ )、Dscam のみを 2 倍体に戻した Ts1Cje マウスにおいても  $12.2 \pm 0.8$  g であり、体重減少に改善は見られなかった。また、3 か月齢時の体重に関しても同様に、正常マウスが  $28.3 \pm 0.5$  g であるのに対し、Ts1Cje マウスは  $26.1 \pm 0.4$  g、Dscam のみを 2 倍体に戻した Ts1Cje マウスは  $26.6 \pm 0.4$  g であった。このことから、Ts1Cje マウスで見られる体重減少には DSCAM 遺伝子は関与していないと考えられる。

##### (2) Y 迷路試験の比較

Y 迷路試験では、直前にいたアームを避けて新しいアームへ入る割合を指標とし (直前にいたアームと新しいアームのどちらかをランダムに選ぶ場合の割合は 50%)、空間的作動記憶の比較を行った。その結果、正常マウスは  $65.7 \pm 3.6\%$  であるのに対し、Ts1Cje マウスは  $56.8 \pm 3.5\%$  と低く、空間的作動記憶の低下が見られた。また、Dscam のみを 2 倍体に戻した Ts1Cje マウスにおいてもその低下に改善は見られず、 $49.9 \pm 2.7\%$  であった。このことから、Y 迷路試験において確認される空間的作動記憶の低下に関しては、DSCAM 遺伝子は関与していないと考えられる。

##### (3) 脳室の大きさの比較

脳室の大きさは、冠状断に切断した MRI 画像により比較した。我々は、Ts1Cje マウスにおいて脳室の拡大を見出しており (Ishihara et al., in press)、Dscam のみを 2 倍体に戻した Ts1Cje マウスにおいてその異常が改善されるかどうかを検討したが、改善傾向は見られなかった。このことから、DSCAM 遺伝子は Ts1Cje マウスで見られる脳室拡大にも関与していないと考えられる。

#### 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)

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

天野 賢治 (Amano Kenji)

独立行政法人理化学研究所・神経遺伝研究チーム・リサーチアソシエイト

研究者番号: 60333340