

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659186

研究課題名(和文) ダウン症モデルTs65Dnマウス中枢神経障害発症機序に関わる酸化修飾蛋白質の探索

研究課題名(英文) Search of oxidized protein involved in the mechanism of central nervous system impairment of Down syndrome model Ts65Dn mouse

研究代表者

七里 元督 (Mototada, Shichiri)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：20434780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではダウン症の中枢神経障害の発症における酸化ストレス・酸化修飾蛋白質の関与を明らかにすることを目的とした。ダウン症モデルマウスを用いてマスイメージング解析を実施し、脂質結合蛋白質の過剰発現を認めた。また、本マウス赤血球中で酸化されたDJ-1蛋白質が増加することを認めた。これらの蛋白質が本マウスの病態に関与する可能性を示唆する重要な知見を得た。

また、本マウスでは週令と共に高架式十字迷路での開放脚滞在率が増加し、胎児期からの抗酸化物質(ビタミンE)の投与により行動異常が改善することを認め、本マウスの中枢神経障害に酸化ストレスが関与することを確認できた。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to clarify the involvement of oxidative stress and oxidized proteins on Down syndrome. Overexpression of fatty acid binding protein was observed in the brain tissue of Ts65Dn mouse, a Down syndrome model mouse, by using MALDI-imaging. And the increase of oxidized DJ-1 protein in RBC of Ts65Dn mice. It was demonstrated that the open arm ratio on elevated plus maze task was increased in Ts65Dn mouse with their weeks of age. Chronic supplementation with α -tocopherol from the embryonic stage improved this open arm ratio of Ts65Dn mice. These results indicated that oxidative stress involved in the impairment of this mouse.

研究分野：酸化ストレス

キーワード：ダウン症 酸化ストレス 酸化修飾蛋白質

1. 研究開始当初の背景

ダウン症は外表奇形、内臓奇形だけではなく精神運動発達遅滞の原因疾患として最も頻度の高い染色体異常である。21番染色体のトリソミーが原因であるが、21番染色体には活性酸素分解に関与する superoxide dismutase-1(SOD1)やアルツハイマー病発症に重要とされるアミロイド前駆体蛋白をコードする遺伝子 (APP) などが含まれており、ダウン症患者は 40 歳代よりアルツハイマー病を高頻度に発症することが注目されている。ダウン症のモデル動物として近年最も使用されている Ts65Dn マウスはヒト 21 番染色体に相当するマウス 16 番染色体がトリソミーとなっており、この染色体には SOD1、APP などの遺伝子が含まれ、表現型として記憶学習機能障害を持つ。近年、我々は本マウスに対し胎児期から生後 10 週令にかけて継続的にビタミン E を投与することで、①血漿中、脳内で脂質酸化生成物 (ヒドロキシリノール酸、イソプロスタノール) が減少すること、②海馬の神経細胞の減少を抑制すること、③本マウスの学習障害、行動異常を改善することを報告した (参考文献 1))。この結果は、Ts65Dn マウス、ダウン症の中枢神経障害に酸化ストレスが関与し、抗酸化物質の早期からの投与で中枢神経障害を抑制できる可能性を示唆している。しかしながら、脂質酸化の抑制のみで神経細胞死、行動異常を改善できたのかが不明な点である。Ts65Dn マウス脳におけるアミロイドβの蓄積は全年齢を通じてコントロールと比較してわずかに増加しているのみという報告 (J. Neurochem. 2009;110:1818-27) もあり、本研究ではアミロイドβ以外の「酸化修飾を受けた蛋白の蓄積」が本マウスおよびダウン症の病態に関与し、蛋白質の酸化を抑制することが有効であると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、ダウン症患者の中枢神経障害発症の原因となる異常蛋白質の蓄積、特に酸化修飾を受けた蛋白質を探索することを目的として、ダウン症モデル Ts65Dn マウスの脳組織をマスイメージング解析装置にて解析する。また、我々は最近、Ts65Dn マウスに対して胎児期から抗酸化物質ビタミン E を投与することで、海馬の神経細胞数減少を抑制し、さらに行動異常、学習障害を改善できることを報告した。本申請ではこの成果を応用し、抗酸化物質の投与による酸化傷害の抑制によって生じる神経細胞内の蛋白質の変動を解析することで、ダウン症の中枢神経障害の発症機構を、蛋白質の酸化修飾の観点から迫る。

3. 研究の方法

(1) Ts65Dn マウス、コントロールマウス (B6EiC3) の飼育と染色体型判定。

ダウン症モデルマウス (Ts65Dn マウス) お

よびコントロールマウス (B6EiC3) を産業技術総合研究所の動物飼育室にて飼育・繁殖を行い、既報 (参考文献 1)) に則り、realtime PCR 法を用いて染色体型の判定を行った。

また、Ts65Dn マウス、コントロールマウス両マウスに受精時からビタミン E を投与 (経胎盤性、経母乳性) し、出生後も高架式十字迷路試験・サンプリングまで継続してビタミン E 過剰食 (0.1% 含有) を投与した。

MRI 撮影後もしくは行動実験終了後、サンプリングを麻酔下にて行い、静脈血採取後、生理食塩水の還流を行い、脳、心臓、肝臓、脾臓、精巣組織を採取した。

脳組織はマスイメージング解析用に採取後迅速に液体窒素で凍結保存した。

(2) 頭部 MRI 撮影および 3D 画像構築

動物用 MRI 撮影を実施可能な外部委託業者に依頼し、吸入麻酔下にてマウス頭部を固定し、頭部 (脳) MRI (4.7T) を撮影した。また、取得した MRI 画像を用いて 3D 画像の構築を行った。

(3) マスイメージング解析

MRI 撮影後のマウスより麻酔下にて生理食塩水の還流を行い、脳組織を摘出し、液体窒素にて急速に凍結し保存した。得られた脳より凍結切片を作製し、大阪医科大学大学院医学研究科附属研究機構内質量分析系に設置されている質量イメージング解析装置 (Autoflex Speed) を用いて、マウス脳海馬領域を中心にタンパク質分子のプロファイルとその脳内局在の解析を行った。

(4) 高架式十字迷路

地上から 50cm の高さに 1 翼が 10cm×50cm の十字状に迷路設置。2 翼は壁なし、2 翼は壁 (高さ 40cm) がある。マウスを十字迷路の中心部位 (交差部位) におき計測を開始し、マウスに自由行動させ、行動をビデオトラッキングシステムにて画像解析を行う。1 回の試験は 5 分間で行った。

不安の指標となる開放脚滞在率は下記計算式によって求めた。

開放脚滞在率 (%)

= (開放脚滞在時間) / (開放脚滞在時間 + 閉鎖脚滞在時間)

(5) 酸化修飾蛋白 (酸化 DJ-1) 測定

既に取得している酸化 DJ-1 に対する特異抗体 (参考文献 2)) を用いた酵素免疫測定法 (ELISA) を用い、赤血球中の酸化 DJ-1 蛋白濃度を測定した。

(6) 脳内脂肪酸結合蛋白質の解析および組織切片の解析

液体窒素粉砕法/可溶化剤にてマウス脳組織より可溶性タンパク質を抽出し、定法に従って SDS-PAGE を行い、抗脂肪酸結合蛋白

(FABP) 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。同時に、新鮮脳組織切片を用いて、不溶性異物 (リポフスチン) などの病理診断学的検索を実施した。

(7) キマーゼ遺伝子の発現およびキマーゼ活性の測定

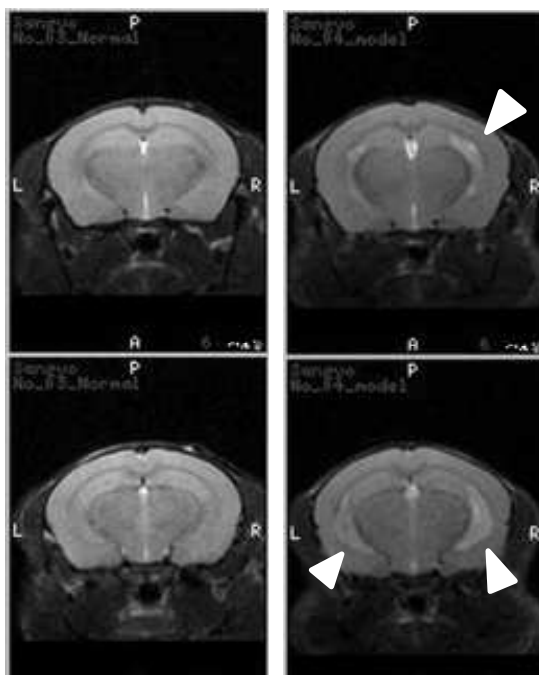
各週齢および年齢の Ts65Dn マウス各摘出臓器を用いて「キマーゼ」遺伝子発現量/酵素活性量の経時的推移を可視化し、キマーゼ過剰発現とマウス組織の病理診断学的検索結果を比較検証した。

4. 研究成果

(1) MRI 画像解析結果

10 週令のコントロールマウス (n=2) と Ts65Dn マウス (n=2) の頭部 MRI 撮影を行った (図 1)。Ts65Dn マウスではコントロールマウスに比較し、海馬が委縮しており、両側側脳室が拡大している所見が認められた。以前の検討 (参照文献 1) では本マウスの海馬の神経細胞数の減少を細胞染色にて確認しており、本マウスの行動異常に海馬が深くかかわっていることが示唆される。

また、本画像を用いて 3D 画像の構築を行った。



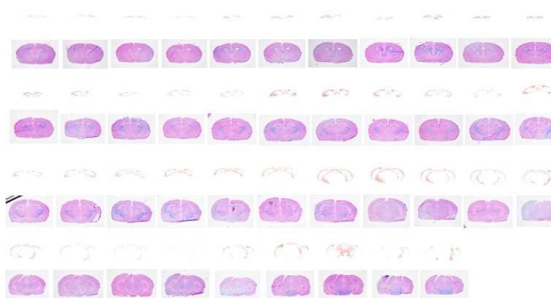
コントロールマウス Ts65Dn マウス

【図 1】コントロールマウスと Ts65Dn マウスの頭部 MRI 画像 (海馬スライス) 矢印は海馬の委縮と側脳室の拡大

(2) マスイメージング解析結果

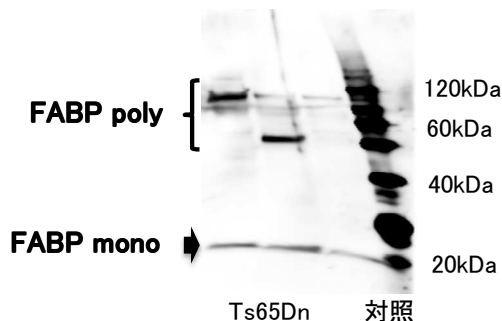
MRI 撮影後のマウスより摘出した脳組織を用いて連続切片を作成し、イメージング解析をした。特に、以前の検討 (参照文献 1) で免疫組織染色にて脂質酸化生成物の蓄積を認めていた海馬領域を中心にタンパク質分

子のプロファイルとその脳内局在の解析を行った (図 2)。



【図 2】マウス脳 (海馬領域部位) 連続切片の HE/LFB 染色とマスイメージング解析結果 (赤: MBP-5、緑 FABP)

また、脳組織抽出物の脂肪酸結合蛋白 (FABP) の蛋白量を SDSPAGE/ウエスタンブロットにて解析したところ、Ts65Dn マウスにおいて FABP の過剰発現を認めた (図 3)。



【図 3】マウス脳抽出液のウエスタンブロット結果 (抗 FABP 抗体)

(3) 高架式十字迷路

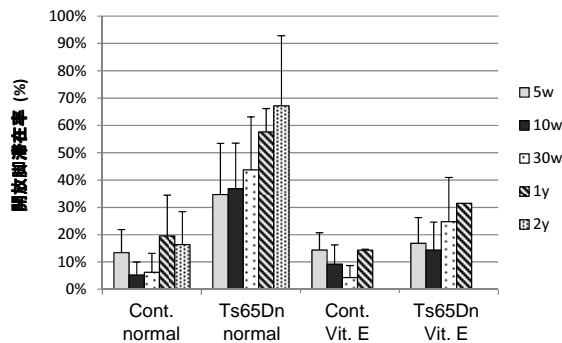
Ts65Dn マウスの周辺環境認知能の低下および Ts65Dn マウスへの受精時からのビタミン E 投与による周辺環境認知能への改善効果を高架式十字迷路によって評価した。

通常食を与えたコントロールマウス (5 週令 10 匹、10 週令 10 匹、30 週令 9 匹、1 年令 13 匹、2 年令 11 匹)、通常食を与えた Ts65Dn マウス (5 週令 8 匹、10 週令 10 匹、30 週令 8 匹、1 年令 5 匹、2 年令 6 匹)、ビタミン E 食を与えたコントロールマウス (5 週令 10 匹、10 週令 10 匹、30 週令 10 匹、1 年令 2 匹)、ビタミン E 食を与えた Ts65Dn マウス (5 週令 10 匹、10 週令 10 匹、30 週令 7 匹、1 年令 1 匹) に対し、高架式十字迷路を行った。

Ts65Dn マウスでは 5 週令の時点から開放脚滞在率の有意な増加を認めた (図 4)。開放脚滞在率の増加は危険な周辺環境への認知機能の障害もしくは不安の減少と考えられた。

また、Ts65Dn マウスでは年齢と共に開放脚滞在率は増加する傾向がみられた。さらに、ビタミン E の投与によって、この周辺環境認知能の改善がいずれの週令でも認められた。

本知見は以前の我々の研究の再現性の確認であるとともにビタミンEの継続投与によって認知能力に改善が得られることを示唆する。

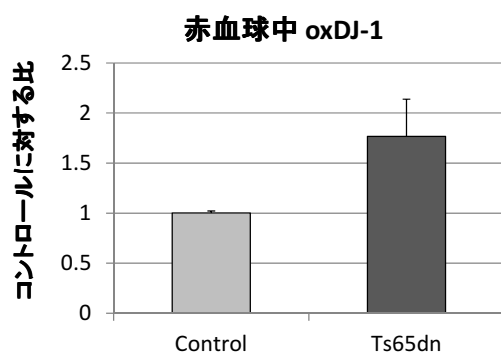


【図4】コントロールマウスとTs65Dnマウスの高架式十字迷路の開放脚滞在率とビタミンE(Vit. E)の効果

(4) 赤血球中 酸化DJ-1 測定結果

10週令の時点で赤血球中の酸化DJ-1の含有量をELISAで測定した結果、Ts65Dnマウスでコントロールマウスと比較して赤血球中酸化DJ-1含有量の増加が認められた(図5)。酸化DJ-1はパーキンソン病患者赤血球内で増加することが知られており(参照文献3)、また、MPTPによるパーキンソン病モデルマウス黒質でも増加している事を認めている(参照文献2)。本研究課題の主題であるダウン症の発症に関わる酸化修飾蛋白質として、酸化DJ-1蛋白質が関与している可能性が示唆された。

また、本結果より、酸化DJ-1はダウン症を含めた中枢神経障害における酸化ストレスマーカーとして有用性があると考えられる。



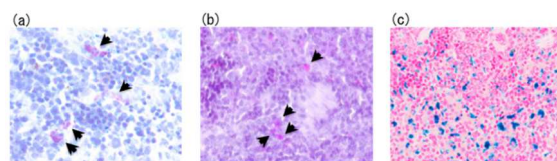
【図5】コントロールマウスとTs65Dnマウス赤血球中の酸化DJ-1濃度の比較

(5) 脾臓組織切片の解析

脾臓組織切片を用いた病理組織学的検索では、不溶性異物(リポフスチンなど)の細胞内過形成、マクロファージの集積を認めた(図6)。

ダウン症は21番染色体のトリソミー、Ts65Dnマウスはヒト21番染色体に相当する

16番染色体のトリソミーであり、中枢神経だけでなく、全身に症状が発生する。ダウン症では白血病の発症のリスクも高く、本知見はダウン症における白血病発症との関連を示唆する。

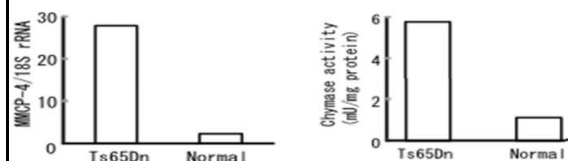


【図6】10週令Ts65Dnマウスの脾臓切片の病理組織学的検索結果

(a) 肥満細胞の増加(トルイジンブルー法)
(b) 不溶性異物(酸耐性フクシン法)の点在
(c) マクロファージ集積(鉄染色ベルリン蒼反応)

(6) マウス脾臓内キマーゼ遺伝子の発現およびキマーゼ活性の測定

Ts65Dnマウス(10週令)は対照マウスと比較してキマーゼ遺伝子は約14倍の発現亢進、キマーゼ活性は約4倍の上昇を認めた(図7)。本知見は本マウスの酸化ストレスの発生とキマーゼとの関連性を示唆する重要な知見である。



【図7】10週令Ts65Dn/対照マウスの脾臓中組織中のキマーゼ遺伝子発現量(左)と酵素活性値(右)

<参考文献>

1) 「 α -Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome.」

七里元督他

Free Radic Biol Med. 2011 15; 50(12): 1801-11.

2) 「Elevation of oxidized DJ-1 in the brain and erythrocytes of Parkinson disease model animals.」

赤澤陽子、七里元督他

Neurosci Lett. 2010; 483(3): 201-5.

3) 「Preparation and application of monoclonal antibodies against oxidized DJ-1. Significant elevation of oxidized DJ-1 in erythrocytes of early-stage Parkinson disease patients.」

赤澤陽子、七里元督他

Neurosci Lett. 2009; 465(1): 1-5.

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)

「質量分析法による医学応用研究」大阪医科大学雑誌 2014, 72(3):103-112. 佐藤七夕子、中西豊文

[学会発表] (計 2 件)

①「ダウン症モデル Ts65Dn マウスへの長期ビタミン E 投与の行動へ及ぼす効果」七里元督、中西豊文、玉井浩、吉田康一
日本ビタミン学会第 67 回大会
2015 年 6 月 5 日 奈良

②「質量分析を利用した酸化生成物の解析」七里元督、石田規子、萩原義久、吉田康一、中西豊文
第 38 回日本医用マススペクトル学会年会
2013 年 09 月 27 日 神戸市 依頼講演

[図書] (計 1 件)

①「Unregulated lipid peroxidation in neurological dysfunction」七里元督、吉田康一、二木鋭雄
Omega 3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health, 1st Edition
Elsevier pp31-55

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

七里 元督 (SHICHIRI, Mototada)
産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員
研究者番号：20434780

(2) 研究分担者

中西 豊文 (NAKANISHI, Toyofumi)
大阪医科大学・医学部
研究者番号：10247843

(3) 連携研究者

()

研究者番号：