

ダウン症候群の出生前および出生後治療法の構築 —脳免疫細胞数異常および微量金属元素量異常に着目して—

1. 研究の目的

ダウン症候群 (DS) は、21 番染色体 (HSA21) が 3 本 (トリソミー) となった最も出生頻度の高い染色体異常症であり、発達遅滞や知的障害をはじめ様々な特徴を示す。DS のリスク因子としては母体の年齢増加であり、晩婚化の進む現代社会においては、DS 出生頻度の上昇が懸念されているにもかかわらず、知的障害をはじめ多くの病態メカニズムは未だ不明であり、有効な治療法はない。そこで、我々は DS の知的障害メカニズム解明と新規治療法の開発を目指して、DS モデルマウスを用いた研究を行っている。

マウス 16 番染色体 (MMU16) のテロメア側領域が HSA21 の大部分と相同であることから、現在、様々な長さの MMU16 の一部を 3 コピー有するマウスが DS モデルマウスとして使用されている。我々は、トリソミー領域に DS 知的障害との関連性が示唆されているアミロイド前駆蛋白質 *App* や活性酸素消去酵素 *Sod1* 遺伝子を含まないものの、記憶学習障害を示す Ts1Cje マウスを使用している。これまでに、Ts1Cje マウスの胎生期脳の大脳皮質での神経新生減少を明らかにしており (Ishihara et al., 2010 *Cereb. Cortex*)、最近、この Ts1Cje マウス胎生期脳での神経新生減少がトリソミー遺伝子である *Erg* 遺伝子の 3 コピー化によって引き起こされること、また胎生期脳でのミクログリア数の減少や炎症亢進を明らかにした (Ishihara et al., 2020 *Brain Pathol.*)。一方、Ts1Cje マウスの成体脳において酸化ストレスが亢進していることも明らかにしており (Ishihara et al., 2009 *J. Neurochem.*)、最近この酸化ストレス亢進の原因が Ts1Cje マウス成体脳での銅蓄積であることを明らかにした (Ishihara et al., 2019 *Free Radic. Biol. Med.*)。このように、我々は Ts1Cje マウスを用いた研究から、新規 DS 治療標的の提示することに成功している。そこで、本研究課題では、Ts1Cje マウス以外の既存の DS マウスや新規に作製する DS モデルも用いて、これらの新規 DS 治療標的の可能性について検証を行う。すなわち、胎生期脳での炎症亢進やミクログリア数減少、また成体脳での銅蓄積について複数の DS モデルマウスで検証し、その責任遺伝子の絞り込みや新規治療標的に即した治療の施行による改善を試みることで、未だない DS 治療薬あるいは細胞治療法の開発に向けた基礎実験データの蓄積を行う。

2. 研究の計画

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

- ① **Erg 遺伝子のみ正常数に戻した Ts1Cje マウスの記憶学習能力の検討:** トリソミー遺伝子 *Erg* のみを正常に戻した Ts1Cje マウスで胎生期脳発達遅滞が改善されたことから、本マウスの記憶学習障害や成体神経新生など Ts1Cje マウスの生後に見られる異常について検証し、胎生期脳発達遅滞と生後の記憶学習障害の連関について明らかにする。
- ② **ミクログリア補充療法検討:** Ts1Cje マウス胎仔脳でのミクログリア数減少を移植により補完し表現型の改善を試みる。ミクログリアは野生型マウス ES 細胞を分化誘導し準備する。

(2) 生後の治療を目指した研究

- ① **複数の DS モデルマウスを用いた銅蓄積責任遺伝子の絞り込み:** Ts1Cje よりも短いトリソミー領域をもつ Ts1Rhr マウスや新規に作製する DS モデルマウスの脳内での銅濃度を定量し、銅蓄積の原因となっているトリソミー領域を絞り込む。
- ② **Ts1Cje マウスへのキレート剤投与による脳内銅蓄積抑制効果とその意義に関する検討:** Ts1Cje マウスに銅キレート剤であるテトラチオモリブデン酸アンモニウム塩を投与し、網羅的遺伝子発現変動解析を行うことで、銅蓄積を分子レベルで理解する。また、恐怖条件付け行動試験を行う。

3. 研究の成果

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

① *Erg*遺伝子のみ正常数に戻したTs1Cjeマウスの記憶学習能力の検討

トリソミー領域遺伝子の*Erg*のみを正常コピー数に戻すと、Ts1Cjeマウスの胎仔大脳皮質での神経新生減少が改善されたことから (Ishihara et al., 2020 *Brain Pathol.*)、この*Erg*遺伝子の正常化Ts1Cjeマウス (Ts1Cje-*Erg*^{+/+/mid2}マウス) における生後の記憶学習障害についてモリス水迷路試験を行った。しかしながら、図1Aに示すように、Ts1Cjeマウスの記憶学習障害は改善されなかった。また、記憶学習に重要とされる成体神経新生がTs1Cjeマウス海馬歯状回において減少していることも見いだしており (Ishihara et al., 2010 *Cereb. Cortex*)、今回の行動試験に加え、Ts1Cje-*Erg*^{+/+/mid2}マウスの海馬歯状回での神経新生の改善についてもBrdU標識による増殖細胞の検出により検討したが、*Erg*遺伝子のコピー数が正常となったTs1Cjeマウスでも依然成体神経新生の減少が検出された (図1B、1C)。

② Ts1Cjeマウスへのミクログリア前駆細胞移植実験 (ミクログリア補充療法検討)

Ts1Cjeマウスの胎生期脳ではミクログリアを含む脳免疫細胞数の減少がみられたことから (Ishihara et al., 2020 *Brain Pathol.*)、胎内治療を想定してミクログリア前駆細胞を胎仔脳室に移植し、Ts1Cjeマウスの神経新生減少を伴う脳発達遅滞が改善されるか検討する。新型コロナの流行による休校措置により、ES細胞を維持することができず、ミクログリア前駆細胞の供給が一時途絶えたが、現在では復旧している。また、移植のステージを決定するためにE10~E14までで細胞移植を試みたところ、E14より前のステージでは、胎児の大きさから脳室内投与が不可能であることがわかった。そこで、今後はE14で移植を行い、E16での神経新生について検証することとした。

(2) 生後の治療を目指した研究

① 複数のDSモデルマウスを用いた銅蓄積責任遺伝子の絞り込み

これまでに銅蓄積を明らかとしたTs1Cjeマウスのトリソミー領域よりも短い領域を3コピーもつTs1Rhrマウスでの脳内銅蓄積を検討したところ、本モデルマウスでも脳での銅蓄積が検出されたことから、Ts1Rhrマウスのトリソミー領域に銅蓄積の責任遺伝子が存在することがわかった。また、同時に新規DSモデルマウスもトランス位にCreを導入する領域選定型DSモデル作製法によって作製しており、第1世代の新規DSモデルマウス作製まで完了した。加えて、Ts1Rhrトリソミー領域の一部を欠失した新規マウスの作製をゲノム編集により試み、一部を欠失したマウスを樹立することができた。

② Ts1Cjeマウスへのキレート剤投与による脳内銅蓄積抑制効果とその意義に関する検討

銅蓄積遺伝病であるウィルソン病治療薬のDSへの適応を目指して、Ts1Cjeマウスに銅キレート剤であるテトラチオモリブデン酸アンモニウム塩を2週間投与し

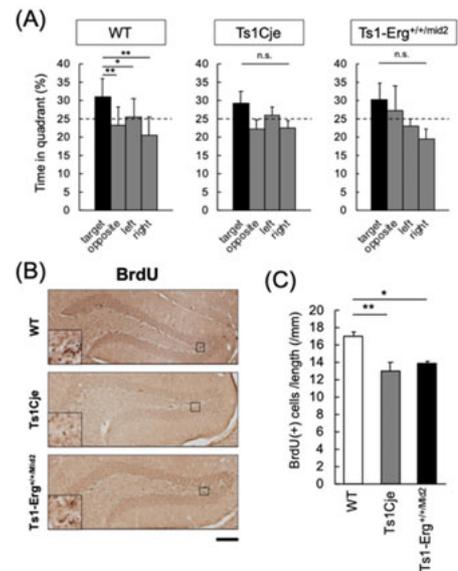


図1 *Erg* 遺伝子のみ正常数に戻した Ts1Cje マウスの記憶学習能力。(A) モリス水迷路試験における記憶学習能力の検討。WT, n = 10; Ts1Cje, n = 9; Ts1Cje-*Erg*^{+/+/mid2}, n = 4。(B) BrdU in vivo 標識による幹細胞の検出。(C) BrdU 陽性細胞数の定量結果。

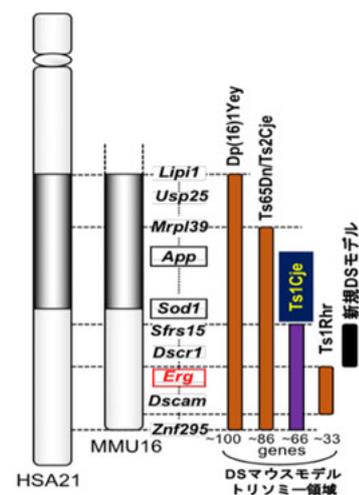


図2 ダウン症モデルマウスのトリソミー領域。申請者は主に Ts1Cje マウスを用いてDS病態を解析しているが、最近 Dp16 および Ts1Rhr を導入し、病態に重要なトリソミー領域の絞り込みを行う。HSA21: ヒト21番染色体、MMU16: マウス16番染色体。App: アミロイド前駆タンパク質、sod1: スーパーオキシドジスムターゼ1。

た。本法は、脳での銅濃度低下が確認された既報の方法に従ったが、小脳での銅蓄積改善は認められなかった。キレート剤の投与はもう少し工夫が必要であると考えられた。そこで、既に銅蓄積改善が認められている低銅含有食を2ヶ月間与えることとした。本法での銅蓄積低下を確認後、海馬で発現する遺伝子をRNA-seq解析により網羅的に検出することで、Ts1Cjeマウス海馬にて発現変動する転写産物の銅蓄積改善後の発現変動について調べたところ、およそ1/3の遺伝子群の発現変動が低銅含有食投与により改善していることを明らかにした。

4. 研究の反省・考察

(1) 胎生期での治療(胎内治療)を目指した研究

DSの胎生期での治療の実現化を目指し、胎内治療の意義を示すために、我々は今年度、Ts1Cje-Erg^{+/+/m1d2}マウスの成体期での記憶学習障害について検証した。Ts1Cje-Erg^{+/+/m1d2}マウス胎仔の脳発達は野生型マウスと同レベルまで改善されていたことから、胎生期脳の発達遅滞が知的障害の基盤となっている仮説から、本マウスでの記憶学習障害の改善が期待されたが、予想に反した結果であった。今後は、胎生期の神経新生の減少を伴う脳発達遅滞が、生後のどのような異常に関与しているか調べる必要がある。また、我々は、脳マクロファージの減少を見出し、これを補充することで胎内治療を行う計画であるが、COVID-19感染症流行によって、当初の予定より遅れが生じた。ようやく最近、iPS細胞から脳内マクロファージ前駆細胞への分化の供給量が、感染症流行前に戻ったことから、来年度は移植実験を行い、脳内マクロファージの供給による神経新生の回復について明らかにする予定である。また、実際に脳内マクロファージのうち、ミクログリア数の減少であるのか、髄膜関連マクロファージや血管関連マクロファージ数の減少であるのかについて、新たなマーカーを用いたフローサイトメトリー解析を行う必要があると考えられる。

(2) 生後の治療を目指した研究

今回の研究によって、生後脳の銅蓄積の責任遺伝子をTs1Cjeトリソミー領域の70遺伝子からTs1Rhrトリソミー遺伝子の30遺伝子に絞り込むことができた。今回、さらにここから絞り込みを行うための新規染色体操作済マウスの作製が完了したことから、次年度はさらに絞り込める予定である。また、新規作製したマウスは全て、遺伝子のコピー数を網羅的にマイクロアレイにて解析し、確認していく予定である。

銅キレート剤投与は、すでにその効果がマウスで確認されている方法に従ったが、Ts1Cjeマウスでの銅蓄積は改善されなかった。野生型マウスでも全く脳内の銅濃度の減少は認められなかったことから、今後は、投与量の検討を行いたいと考えている。また、Ts1Cjeマウスでの銅蓄積改善を低銅含有食2ヶ月間投与で達成した海馬での発現遺伝子の網羅的な解析により、Ts1Cjeマウスで認められる多くの発現変動遺伝子が銅蓄積改善にて発現量の改善が認められたことは、DSでの銅蓄積の意義の分子基盤を理解する上で非常に重要な知見であると考えられる。今後は、これらの遺伝子発現量の変化の一部を定量RT-PCRで確認する必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Keiichi Ishihara, Ken-ichi Mizutani: Brain development coordinated by interactions between neurons, glial cells and central vascular system, and disease caused by its disturbance. *YAKUGAKU ZASSHI*, 2021 **141**, 333-334.
- ② Keiichi Ishihara: Is neuron-vascular communication disturbed in the delayed prenatal brain development of a mouse model of Down syndrome? *YAKUGAKU ZASSHI*, 2021 **141**, 369-373.

(2) 口頭発表

- ① 石原慶一: ダウン症モデルマウスと病態研究について
第2回日本ダウン症学会学術集会(招待講演)2020年11月1日 [オンライン開催]

- ② 石原慶一：メタロミクス解析により明らかとなったダウン症モデルマウス脳での銅蓄積とその意義
フォーラム2020：衛生薬学・環境トキシコロジー シンポジウム 2020年9月5日 [オンライン開催]
- ③ 石原慶一、河下映里、山川和弘、左合治彦、秋葉 聡：ダウン症モデルマウスの脳および肝臓を用いたメタロミクス解析
生命金属に関する合同年会、2020年11月6日 [オンライン開催]

(3) 出版物

なし