

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 治療標的を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 **ミクログリア前駆細胞補充療法の検討:** Ts1Cjeマウスの胎生期での脳マクロファージ数の減少がみられたことから、脳マクロファージのどのポピュレーションが減少しているか突き止め、胎内治療を想定したミクログリア前駆細胞の胎仔脳室への移植を行い、神経新生減少の改善を検討する。

(2) 生後の治療を目指した研究

- ① **領域選択型新規DSモデルマウスの作製:** CRISPR-Cas9を利用したゲノム編集により作製した新規DSモデルマウスの染色体コピー数に関して目的の領域の染色体操作の成否に関してCGH解析により確認を行う。
- ② **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:** 作製した領域選択型新規DSモデルマウスでの銅蓄積について検討し、Ts1Rhrマウスとの結果を合わせ、DSモデルマウスでの銅蓄積責任遺伝子の絞り込みを進める。
- ③ **Ts1Cjeマウスへの低銅食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マウスあるいは項目②の絞り込みで銅蓄積が認められるモデルマウスに低銅含有食を投与し、記憶学習能の改善について明らかにする。(恐怖条件付け行動試験装置(ショックジェネレーター他)を用いた行動解析を行う。)

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 **ミクログリア前駆細胞補充療法の検討:** Ts1Cjeマウス胎仔脳での脳マクローファージ数の減少を見出しているが、ミクログリアや血管周囲や髄膜に介在する脳境界マクローファージ(BAMs)のどちらが減少しているかについて、FACS解析を行なった。その結果、BAMsではなく、ミクログリアの減少が明らかとなったことから(図1)、ミクログリア前駆細胞の移植を行うこととした。まず、移植の手技の確認として、胎齢14.5日目マウスの脳室へのEGFPタンパク質発現マウスES細胞の移植を行なったが、現在のところ移植され正着細胞を認めるまで至っていない。

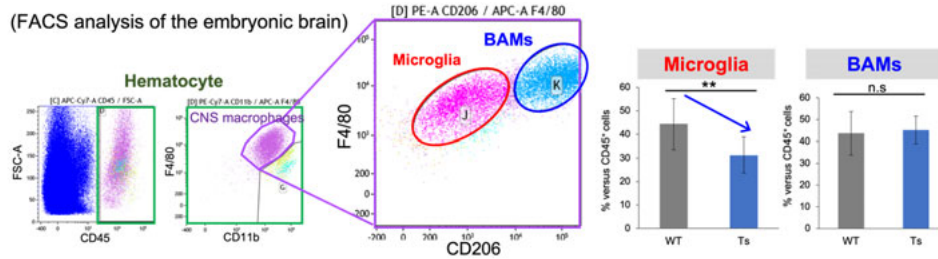


図1. Ts1Cjeマウス胎仔脳でのミクログリア数の減少

(2) 生後の治療を目指した研究

① **領域選択型新規DSモデルマウスの作製:** CRISPR-Cas9を利用したゲノム編集により作製した新規DSモデルマウスのCGH解析を行い、予想通りの染色体改変マウス(領域選択型新規DSモデルマウスおよび新規部分欠損マウス)が作製できたことを確認した(図2)。

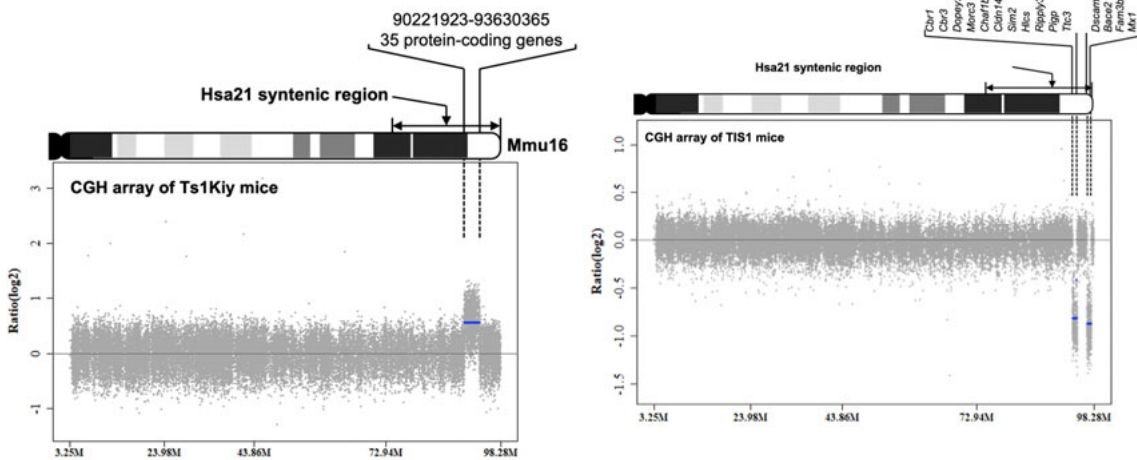


図2. CGHアレイ解析による新規DSモデルマウスのコピー数確認。一部の領域が3コピーとなった新規モデル(左)と一部の領域が1コピーとなった新規染色体改変マウス(右)

② 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： 作製した領域選択型新規DSモデルマウスでの銅蓄積について検討した。まず、領域選択型新規DSモデルマウスは銅蓄積が認められたTs1Cjeマウスのトリソミー領域（約70遺伝子）のセントロメア側約半分の領域（約35遺伝子）が3コピーとなっており、一方既存のTs1Rhrマウスはテロメア側約半分の領域（約30遺伝子）を3コピー有する。これらマウス脳での銅蓄積についてICP-MSにて解析したところ、銅蓄積が領域選択型新規DSモデルマウスでは認められず、Ts1RhrマウスでTs1Cjeマウスと同程度認められた。そこで、新たに作成した部分欠失TIS1マウスとTs1Rhrマウスを交配させ得られるTIS1-Rhrマウス（16遺伝子が3コピー）の銅濃度を検証したところ、このマウスでも銅の蓄積が検出された（図3）。以上の結果より、銅蓄積遺伝子座を70遺伝子領域から16遺伝子領域にまで絞り込むことができた。

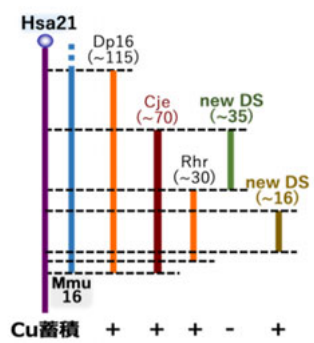


図 3. 新規マウスでの銅蓄積とその3コピー領域

③ Ts1Cjeマウスへの低銅食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マウスあるいは項目②の絞り込みで銅蓄積が認められるモデルマウスに低銅含有食を投与し、記憶学習能について検討した。記憶学習評価には、恐怖条件付け行動試験を行い、Mac mini (Apple, Z12P)にて解析を行なった。その結果、図4に示したように、銅蓄積と関連した記憶学習障害を検出した。これらの結果は、銅蓄積がDSモデルマウスでの記憶障害に関与している可能性を示すものである。

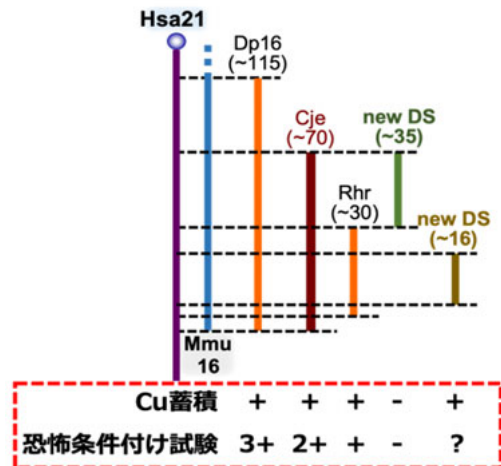


図 4. 新規マウスでの銅蓄積と情動記憶障害。恐怖条件付け試験における+は障害が認められたことを示す。

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Ts1Cjeマウスの胎仔脳での脳内マクロファージ減少を見出しているが、今年度、BAMsのマーカーストロンを用いたフローサイトメトリー解析にて、Ts1Cjeマウスの胎仔脳でのミクログリア数の減少を明らかにした。このことから、当初の計画通り、ミクログリア前駆細胞の移植による胎内治療の検証を行う方針で行うことに決定した。胎仔脳室への移植に関しては、すぐに達成できると考えていたが、使用する毛細管の径や先端の形状など、非常に条件設定が難しいことが分かった。現在、色々な条件を検討し、脳室への移植後に胎仔が死亡しない条件までは設定できたが、移植細胞の生着が認められる個体はまだ得られていないことが反省点である。

(2) 生後の治療を目指した研究

今年度の研究によって、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16遺伝子に絞り込むことができた。これらの遺伝子のなかに銅濃度を規定する可能性のある遺伝子としては、唯一Dscr3遺伝子が挙げられた。この遺伝子は、初期エンドソームの関連分子であり、初期エンドソームが銅トランスポーターの膜発現の調節を行なっていることが示唆されていることから、本遺伝子に注目するに至った。今後は、Dscr3のみが正常の2コピーとなったDSモデルマウスを作製し、銅蓄積について検証する予定である。

情動記憶障害に関しては、銅蓄積と相関性が認められるような結果が得られた。しかし、

低銅含有食によって銅蓄積を改善したDSモデルマウスの検討では、低銅含有食によってむしろ脳内の銅濃度が低下したことから、野生型マウスの情動記憶の低下が認められる問題が生じた。今後は、銅蓄積遺伝子の同定後、その遺伝子のみを2コピーとしたDSモデルマウスでの恐怖条件付け試験を行うことで、銅蓄積と情動記憶障害の関係性を明らかにしたいと考えている。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Keiichi Ishihara, Genes associated with disturbed cerebral neurogenesis in the embryonic brain of mouse models of Down syndrome. *Genes (Basel)* 12:10, 1598 (2021)
- ② 石原慶一、ダウン症候群の知的障害における脳炎症の関連の可能性。 *糖尿病・内分泌代謝科* 51:1, 35-41 (2021)

(2) 口頭発表

- ① 石原慶一、ダウン症の脳発生における神経血管ユニットの破綻の可能性。第64回日本神経化学学会大会（シンポジウム）2021.10 [オンライン開催]
- ② 石原慶一、ダウン症候群での生命金属恒常性の破綻。第94回日本生化学大会（シンポジウム）2021年11月 [オンライン開催]

(3) 出版物

なし