

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多岐にわたる特徴を示す。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。しかしながら、知的障害をはじめ多くの DS 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、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* 遺伝子をトリソミー領域に含まないにもかかわらず、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 DSマウス由来ES細胞のミクログリア前駆細胞への分化についての研究:

昨年度の研究結果から Ts1Cje マウスの胎生期での脳でのミクログリア数の減少が明らかとなった。そこで、なぜミクログリア数が減少するのかについて明らかにすることを目的として、Ts1Cje マウスから樹立した ES 細胞を *in vitro* でミクログリア前駆細胞に分化誘導し解析することを試みた。

② 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、昨年の研究からミクログリアの数的減少が明らかとなったことから、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 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(昨年から継続):

一部のトリソミー領域をヘテロで欠失したマウスを作製し、Ts1Rhr マウスとの結果を合わせることで、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。

② Dp(16)1YeyマウスおよびTs1Rhr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:

最も長いトリソミー領域が3コピーとなったDp(16)1Yeyマウスと最も短いトリソミー領域を3コピーもつTs1Rhrマウスは銅蓄積が認められることから、これらの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。

③ ヒトDS患者での銅代謝異常に関する検討:

DS患者の血清における銅濃度を検証することでヒトDS患者での銅代謝異常について明らかにするための研究を開始する。

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 DSマウス由来ES細胞のミクログリア前駆細胞への分化についての研究:

雄性Ts1Cjeマウスと雌性C57BL/6Jマウスを交配しプラグ確認後、着床前の受精卵を採取し、ES細胞の樹立を常法に従って行なった(山形大学 若山教授らとの共同研究)。遺伝型を調べ、WT型とTs1Cje型ES細胞を各々1ラインずつ使用して、研究分担者である高田教授が開発した方法に従ってミクログリア前駆細胞への分化誘導を行なった(Takata et al., 2017 *Immunity*)。その結果、Ts1Cjeマウス由来ES細胞では、ミクログリア前駆細胞への分化率が非常に低いことが明らかとなった(図1A)。少ないながらもTs1Cje由来ミクログリア前駆細胞から全RNAを抽出し、RNA-seq解析により網羅的な発現遺伝子を解析したところ、野生型マウスに比べて発現変動している遺伝子を同定した(図1B)。

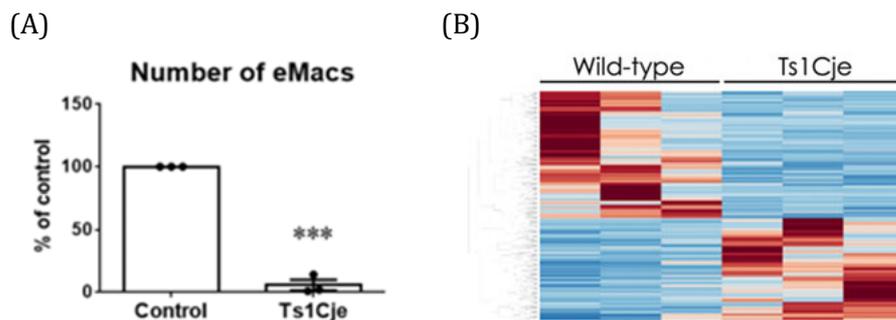


図1. Ts1Cjeマウス由来ES細胞のミクログリア前駆細胞 (eMacs) への低分化能 (A) とRNA-seq解析

② 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ミクログリア数の減少を見出していることから、本マウスの胎仔脳へのミクログリア前駆細胞移植実験を行うことを計画しているが、現在のところ移植細胞の生着が認められていない。脳室への移植を行なっているが、この手技の改善が必要であり、現在、*in Utero*での移植経験を有する研究者から技術を教授してもらっている。

(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:

昨年度までにDSモデルマウス脳での銅蓄積に対する責任遺伝子座を17遺伝子がコードされる領域にまで絞り込んだ(図2)。本年度は、12遺伝子がコードされる#3-#4の領域がヘテロ欠失したマウスを作製し、Ts1Rhrマウスとの交配により得られる#3#4-Rhrマウスの脳での銅蓄積を検討した。結果、Rhrで見られた高い銅濃度は、#3-#4の領域を2コピーとしても依然高いままであったことから、本領域にコードされる12遺伝子以外のトリソミー遺伝子による銅蓄積が示唆された。現在、#1-#2および#2-#3の作製を行なっており、両マウスとも樹立できた。これらのマウスを解析することで銅蓄積遺伝子の同定を行っていく。

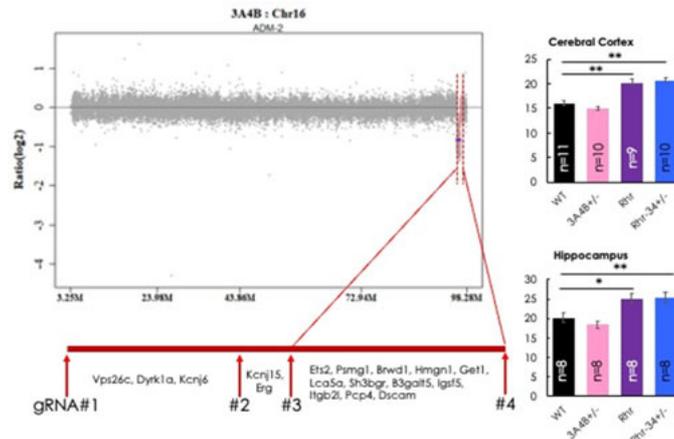


図2. 銅責任遺伝子の絞り込み。新たに#3#4ヘテロ欠損マウスを作製し、銅蓄積を検討した。

② **Dp(16)1YeyマウスおよびTs1Rhr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:**

最も長トリソミー領域をもつDp(16)1Yeyマウスと最も短いトリソミー領域をもつTs1Rhrマウスの情動記憶障害の検証と、その障害に及ぼす低銅含有食の影響について検証した（SPF飼育エリア内での解析にMacbook proを使用）。その結果、両マウスともに記憶学習障害が認められるが、Dp(16)1Yeyマウスの方が重度の記憶学習障害が検出されること、またDp(16)1Yeyマウスの記憶学習障害は低銅含有食投与によって一部ではあるが改善されることを見出した。一方、Ts1Rhrマウスの記憶学習障害は軽度ではあったが、低銅含有食投与でほぼ完全に改善できることを明らかとした。このように、Ts1Rhrマウスのトリソミー領域の3コピー化は、銅蓄積が起因する記憶学習障害を呈することが明らかとなった。

③ **ヒトDS患者での銅代謝異常に関する検討:**

本助成金の申請書に対して審査員より頂いたコメントにおいて、ヒト患者での銅蓄積の検証が重要であるご指摘を頂いた。ヒト患者脳の入手は困難を極めることから、我々は、血清中の銅濃度を測定することでDS患者の銅代謝異常に迫ることを計画した。3つの医療機関と共同しDSおよび健常人対照者の血清採取を行う計画に対する倫理承認を受けた。現在、血清採取を行なっている。

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。我々は、ミクログリアの減少こそがDSの発達遅滞の原因である仮説をたて、この仮説の証明をミクログリアの補充による脳発達遅滞の改善について検証することを行なっている。昨年に引き続き、胎生期脳へのミクログリア前駆細胞の移植作業を行なっているが、思い通りの移植が行えていないのが現状である。In Uteroでの移植経験をもつ研究者からの技術教示を行うことで解決を図りたいと考えている。一方、DSモデルマウスからES細胞を樹立し、ミクログリア前駆細胞への分化について検証した。Ts1Cjeマウス由来ES細胞の表現型は、in vivoでの表現型よりも明瞭なミクログリア前駆細胞への分化障害が認められた。これは、非常に興味深い現象であり、網羅的な遺伝子発現解析によって幾つかの有望な異常シグナル経路を想定するに至った。今後は、これらの異常を明らかとし、in vivoでの異常の証明、さらにはヒトiPS細胞を用いた検討を通じて、DSの病態におけるミクログリア異常の重要性を提示したいと考えている。

(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5遺伝子にまで絞り込むことができた。当初は、今年度に同定し終える予定であったが、幾つかの欠損マウスの作製が予定通りに進まず、遅れが生じた点が反省点である。また、昨年度、銅動態に影響を及ぼす可能性のある候補トリソミー遺伝子としてDscr3に注目し、Dscr3欠損マウスの作製を試みたが、作製したヘテロ欠損マウスでのDscr3 mRNA発現量の減少が認められなかったことから、再度作製し直している。この遺伝子の3コピー化による銅蓄積に関しては今後の検討により明らかにしたいと考えている。

また、我々は、銅蓄積に必要なトリソミー領域としてTs1Rhrマウスのトリソミー領域を同定した。さらに、本年度の検討によって、このTs1Rhrマウスで見られる記憶学習障害は低銅含有食投与によってほぼ完全に改善されたことから、DSモデルマウスで認められる記憶学習障害の1つの基盤として銅蓄積があり、その原因遺伝子がTs1Rhrマウスのトリソミー領域にコードされることを明らかとした。かつて、Ts1Rhrマウスのトリソミー領域は、DS患者の部分トリソミー患者の遺伝子解析から同定されたDown syndrome critical region (DSCR) と認識されていたことから（現在はこの限りではないとされているが）、この結果がヒト患者でも共通していることが期待される。今後は、ヒトDS患者での銅代謝異常を明らかにすることを目的として、トランスレーショナルリサーチを行いたいと考えている。未だないDS治療薬を開発することを目標として引き続き研究を推進していく所存である。この度は助成金を頂きましたこと心より感謝申し上げます。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① **Ishihara K.***(Corresponding), Takata K., Mizutani KI., Involvement of an Aberrant Vascular System in Neurodevelopmental, Neuropsychiatric, and Neuro-Degenerative Diseases. *Life (Basel)* 13:1, 22 (2023).
- ② 石原慶一(Corresponding)、ダウン症候群の認知機能障害と生命金属恒常性破綻. *ファルマシア* 59:3, 206-211 (2023).
- ③ **Ishihara K.***(Corresponding), The accumulation of copper in the brain of Down syndrome promotes oxidative stress: possible mechanism underlying cognitive impairment. *J Clin Biochem Nutr.* 71:1, 16-21 (2022).
- ④ 石原慶一(Corresponding), 左合治彦、Erg遺伝子とDown症候群に対する胎児治療の可能性. *周産期医学* 52:7, 1001-1003 (2022).

(2) 口頭発表

- ① **Ishihara K.**, Brain copper accumulation-associated cognitive impairment in mouse models of Down syndrome. 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (シンポジウム 招待講演) 2022.11 [Kobe]
- ② **Ishihara K.**, Kawashita E., Katsuda M., Saito M., Sago H., Yamakawa K., Akiba S., Takata K., Suppressive effects of Down syndrome genes on amyloid- β aggregation and mortality in a mouse model of Alzheimer's disease. 人類遺伝学会第67回大会2022年12月[横浜]

(3) 出版物

なし