

総説

# ダウン症モデルマウスを用いた病態メカニズム解析および治療標的の同定

石原慶一\*

京都薬科大学 病態生化学分野

ダウン症候群（DS）は、通常2本の21番染色体が3本となり生じる最も頻度の高い染色体異常症であり、幼児期の発育遅延を伴う知的障害や成人期での認知機能低下など様々な特徴がみられる。母体血を用いた無侵襲的遺伝学的出生前検査の登場によりDS診断技術は驚異的な進歩を遂げたが、一方、治療戦略構築はあまり進んでいない。最近実施されたDS中枢症状に対する候補薬の治験では、その有効性が確認できず中止され、新たな治療標的の同定（提示）が切望されている状況である。我々は、数あるDS症状のなかで、脳発達遅滞を伴う知的障害および成体期での認知機能低下に焦点を当て、その分子メカニズムの理解による新規治療標的の同定を目指している。本総説では、我々がこれまでに行ってきたDSモデルマウスの異常表現型の解析に加え、多種類の網羅的（OMICS）解析を駆使した発現変動分子の同定を中心に紹介し、最近発見されたDSの中枢症状に対する新規治療標的分子も合わせて紹介する。

キーワード：ダウン症候群，モデルマウス，オミックス解析，病態メカニズム，知的障害

受付日：2020年6月16日，受理日：2020年7月29日

## 1. はじめに

1866年に英国の眼科医である John Langdon Down 氏が論文においてその存在を発表したダウン症候群（DS）は、その後、1959年にフランス人の遺伝学者である Lejeune Jerome 氏により21番染色体が3本（トリソミー）であることが発見された。DSの発生頻度は母親の年齢と相関しており、母親の年齢が20歳の場合はDS児の出生リスクは1/1441、30歳では1/959、そして40歳では1/84という調査結果が公表さ

れている<sup>1)</sup>。つまり、晩婚化が進む現代社会では今後ますますDS児の出生増加が予測され、早急な対策を講じる必要がある。これまでに、アルツハイマー病薬である塩酸ドネペジルやγ-アミノ酪酸 (GABA)<sub>A</sub>5 受容体拮抗薬である RG1662 が DS の治療候補として治験が行われた。塩酸ドネペジルに関しては、一部の思春期の DS 者で見られる1～2年という短期間で日常生活能力が低下する急激退行現象に対する有効性を期待したもので、本症状は、生活環境の変化が引き金となって発症することがある点や臨床像が「認知症」や「うつ状態」に類似していること、さらに抗うつ薬への反応性が乏しいことから本薬が候補となった。一方、

\* 連絡先：

〒607-8414 京都府京都市山科区御陵中内町5 京都薬科大学病態生化学分野

RG1662 は、DS モデルマウスを用いた基礎研究において、重要な脳神経細胞の機能である長期増強 (LTP) の低下および認知機能障害が GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬と受容体逆作動薬の投与によって改善されたこと<sup>2,3)</sup>に基づいたヒトでの検証である。しかし、双方の治療において薬物投与の DS 者への有効性は認められず、治験は中止となっている。このように、現在、DS の中枢症状に対する治療法を確立するための新たな分子標的の同定が望まれている。

## 2. DS モデルマウス

DS の病態メカニズム解析に使用される代表的なツールは、マウスモデルである。ヒトの 21 番染色体 (HSA21) は、マウス 10 番 (MMU10)、16 番 (MMU16) および 17 番染色体 (MMU17) の一部と相同であり、なかでも MMU16 のテロメア側の領域は HSA21 の大部分と相同である (図 1)。この HSA21 と相同なマウス染色体領

域を 3 コピーもつマウスが DS モデルマウスとして使用されている。図 1 には、DS モデルマウスのうち、MMU16 の一部を 3 コピーもつ代表的な 3 系統のマウスのトリソミー領域を示した。HSA21 は約 230 個の構造遺伝子をコードしており、そのうち 112 遺伝子をコードする領域が MMU16 のテロメア側領域と相同であり、これら相同遺伝子の殆どである 98 遺伝子が 3 コピーとなった Ts65Dn マウスは、最初に樹立された DS モデルマウスであり研究に最もよく使用されている<sup>3)</sup>。Ts65Dn マウスのトリソミー領域は、MMU17 のセントロメア領域と融合した染色体を 1 本余分に有することで MMU16 の一部を 3 コピー保持している特徴を有しているが、MMU17 のセントロメア近傍の HSA21 非相同遺伝子も 3 コピーとなっており、DS 関連遺伝子以外の遺伝子の 3 コピー化が存在する不完全なモデルである。しかし、Ts65Dn マウスでは、記憶学習障害<sup>4)</sup>や胎生期の神経新生減少<sup>5)</sup>など様々な DS 者でみられる特徴が再現されており、多くのモデルマウスが樹立されている現

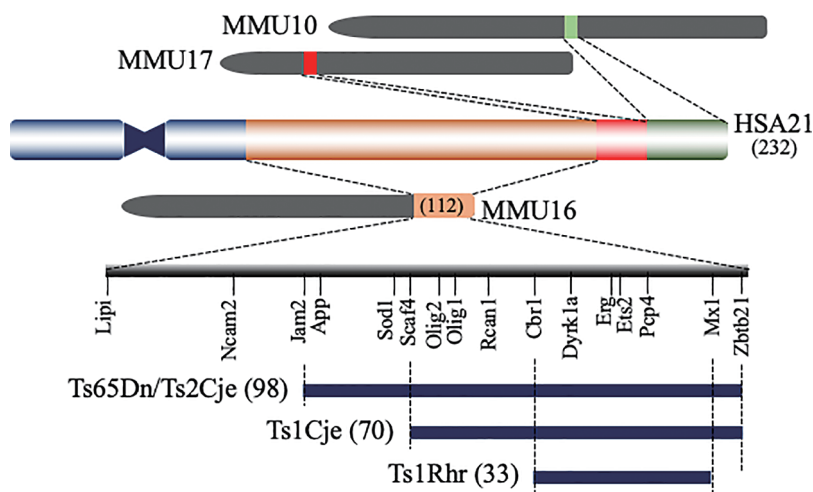


図 1 ヒト 21 番染色体と相同なマウス染色体領域と DS モデルマウスのトリソミー領域  
ヒト 21 番染色体 (HSA21) は、その大部分がマウス 16 番染色体 (MMU16) のテロメア側領域と相同であり、他にマウス 10 番 (MMU10) および 17 番染色体 (MMU17) と相同な領域から成る。また、3 種類の MMU16 の一部を 3 コピー有する DS モデルマウスのトリソミー領域を示した。Ts2Cje マウスは、Ts65Dn マウスのトリソミー領域をマウス 12 番染色体に転座させることで樹立した DS モデルである。括弧内の数字は遺伝子数を示す。

在でも DS モデルマウスとして頻用される。一方、Ts1Cje マウスは、左合治彦博士（現国立成育医療研究センター・周産期・母性診療センターのセンター長）が米国カリフォルニア大学サンフランシスコ校・遺伝小児科学の Charles J Epstein 教授との共同研究により樹立したマウスであり、Ts65Dn マウスのトリソミー領域の一部（約 70 遺伝子を含む）が偶発的にマウス 12 番染色体（MMU12）の末端に転座したものを樹立することで得た DS モデルマウスである<sup>6)</sup>。ただし、本マウスモデルも転座部位である MMU12 のテロメア側の一部の領域が削れており、期せずして 10 遺伝子ほどが 1 コピーとなっている。Ts1Cje マウスも Ts65Dn マウスと同様に記憶学習障害を示すが、記憶の保持過程においては Ts65Dn マウスよりは軽度であることが示唆されている<sup>7)</sup>。3 つ目のモデルマウスは Ts1Cje マウスのトリソミー領域のうちの約 30 遺伝子をコードする領域が 3 コピーとなった Ts1Rhr マウスである。本マウスは、遺伝子改変技術の Cre-loxP システムを利用して狙った MMU16 の一部を片側アレルに転座させ、その後野生型マウスと交配させることで得られる DS モデルマウスであり、これまで紹介した DS モデルとは異なり、標的染色体領域のみが 3 コピーとなっている<sup>8)</sup>。Ts1Rhr マウスのトリソミー領域は、DS critical region (DSCR) と呼ばれる DS の精神遅滞を呈する為に必須となる領域とされていたが、Ts1Rhr マウスの記憶学習障害は非常に軽度であったことから、本トリソミー領域には DS での記憶学習障害の主要な責任遺伝子はコードされていないと考えられた<sup>8)</sup>。

### 3. DS モデルマウスの記憶学習障害に関連する異常表現型

DS モデルマウスで見られる記憶学習障害は、ほぼ全ての DS 者で検出される知的障害を反映

したものと考えられ、そのメカニズムを明らかにすることは DS 知的障害の治療戦略を構築するうえで必須である。現在、そのメカニズムは不明であるが、基盤メカニズム候補としては、成体期脳における酸化ストレス亢進やリン酸化タウの蓄積、また胎生期での脳発達遅滞および興奮性—抑制性神経伝達の均衡崩壊が示唆されている。

#### 3.1 酸化ストレス亢進

成人 DS 者の特徴として、記憶学習障害のほか、白髪、女性の早期閉経、甲状腺障害、早発性の皮膚のシワおよび記憶障害といった“老化の促進”によると考えられる特徴的な症状の出現頻度が高いことも知られており、これらの基盤には酸化ストレスの亢進の関与が考えられる<sup>9,10)</sup>。これに対し、記憶学習障害と酸化ストレスの亢進との間に関連性が見いだせなかったとの報告もあり<sup>11)</sup>、明確な答えは出ていない。酸化ストレスの亢進の責任遺伝子としては、HSA21 にコードされるスーパーオキシドジスムターゼ 1 (*Sod1*) 遺伝子が候補として挙げられる。生体内で生じたスーパーオキシドアニオン ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) は SOD1 によって酸素と過酸化水素へ不均化され、次いで、産生した過酸化水素はグルタチオンペルオキシダーゼやカタラーゼによって水と酸素へと代謝されることで無毒化される。すなわち、*Sod1* 遺伝子のコピー数増加により SOD1 とカタラーゼ／グルタチオンペルオキシダーゼの量的な均衡が崩れ、過酸化水素量の増加および過酸化水素から産生する酸化能の強いヒドロキシラジカルが増加し（図 2）、酸化ストレスの亢進が基盤となった老化促進による記憶学習障害が DS 者で起こっている可能性が考えられる<sup>12)</sup>。DS 者の尿中における 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (DNA 酸化損傷マーカー) や malondialdehyde (脂質過酸化マーカー) の増加が報告されており<sup>13)</sup>、*in vivo* での酸化ス

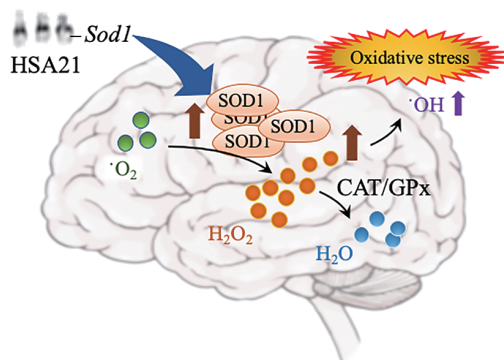


図2 DSでの *Sod1* 遺伝子の3コピー化による酸化ストレス亢進仮説

DS 脳では HSA21 がトリソミーとなることで、HSA21 遺伝子量の増加が見られる。HSA21 遺伝子のうち、スーパーオキシドジスムターゼ 1 (*Sod1*) 遺伝子量が 1.5 倍となることで、スーパーオキシドから過剰に過酸化水素が生じる。通常、その代謝酵素であるカタラーゼ (CAT) やグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) により無毒化されるが、DS では、SOD1 と CAT/GPx の量的不均衡によって過酸化水素の蓄積が予測される。その結果、過酸化水素の蓄積に付随するヒドロキシラジカル (OH) の過剰な発生を招き酸化ストレスが亢進している。

トレスの亢進が示唆された。ヒトでの知見と同様、我々は DS モデルの Ts1Cje および Ts2Cje マウスの脳における脂質過酸化の亢進を検出したことから、モデルマウスでも酸化ストレスの亢進を見いだした<sup>14)</sup>。また、電子スピン共鳴装置を用いた抗酸化能評価方法を用いて Ts1Cje マウスの抗酸化能を評価したところ、野生型マウスと同程度であったことから、Ts1Cje マウスでは活性酸素種の過剰産生に起因した酸化ストレスの亢進が起こっていると考えられた<sup>14)</sup>。*Sod1* 遺伝子は Ts2Cje マウスのトリソミー領域に含まれるが、Ts1Cje マウスのトリソミー領域には含まれないことから、Ts1Cje マウスのトリソミー領域に DS 脳での活性酸素種産生亢進に関与する遺伝子がコードされていることを示している。

### 3.2 リン酸化タウの蓄積

DS モデルマウスの記憶学習障害のメカニズ

ムとしては、アルツハイマー病 (AD) と共通したメカニズムが基盤となっている可能性も指摘されている。DS 者の多くは、65 歳までという早期に脳内でのアミロイド  $\beta$  の蓄積を伴う認知症、すなわち AD 様認知症を発症することが知られている<sup>15)</sup>。その原因は、HSA21 上にコードされるアミロイド前駆タンパク質 (App) 遺伝子であると考えられている。AD の発症において重要な役割を演じていると考えられているアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) は、AD 脳の特徴である老人斑の主成分であり、APP が  $\beta$ -セクレターゼおよび  $\gamma$ -セクレターゼによる分解を受けることで産生される。つまり、App 遺伝子のコピー数増加は  $A\beta$  の産生増加を招き、結果として早期の老人斑の蓄積を伴う AD 様の認知症の発症に至ると推察されている。しかし、APP の発現レベルがその遺伝子量に依存した増加、すなわち 1.5 倍程度の増加でここまで早期の AD 様認知症の発症を説明できるとは思えない。HSA21 上には、他の  $A\beta$  蓄積に関連する遺伝子がコードされていると考えられる。AD 脳の病理変化において、 $A\beta$  を含む老人斑の蓄積の他に、リン酸化タウによる神経原線維変化の形成および神経細胞脱落が知られており、タウ病変の形成よりも  $A\beta$  の蓄積が先行する特徴をもつ<sup>16)</sup>。ヒト APP を過剰発現する APP トランスジェニックマウスにおいて、内因性のタウ発現量を低下させることで  $A\beta$  による神経毒性が抑制されたことが報告されたことから、リン酸化タウの蓄積も AD 発症に深く関係していることが分かる<sup>17)</sup>。App 遺伝子をトリソミー領域に含まない Ts1Cje マウスの脳では、3 ヶ月齢という若齢期においてリン酸化タウの蓄積が見られるが<sup>18)</sup>、Ts1Cje マウスの記憶学習障害と関連している可能性が考えられる。今後さらに解析を進めることで、DS 遺伝子が新規 AD 治療標的となり新規治療薬の開発につながると期待される。



### 3.3 胎生期の脳発達遅滞

DS は AD とは異なり発達遅滞による知的障害を特徴とすることから、胎生期あるいは生後すぐの脳発達期における神経新生や成熟の発達遅滞が原因となって成体期の記憶学習に障害が起こっている可能性が考えられる。DS 者の妊娠後期から出生までの海馬歯状回や大脳皮質の神経細胞数の減少が報告されており、特に海馬歯状回の細胞数と知的障害の程度の相関性が示唆されている<sup>19,20)</sup>。これらの研究の他にも、多数の DS 者の発達脳における神経成熟異常を示唆する報告があり、DS 胎児や生後間もない DS 者の脳神経系の発達遅滞が示されている。また、ボストン大学の Haydar 教授らは、Ts65Dn マウスの胎生 14.5 日目の大脳皮質での神経新生減少を示し、胎生期における脳発達遅滞を初めて明らかにした<sup>21)</sup>。我々の研究グループも、Ts65Dn マウスよりも短いトリソミー領域をもつ Ts1Cje マウスの胎仔大脳皮質での神経新生減少を明らかとし、Ts65Dn と同様、脳発達遅滞が見られることを報告したこと<sup>22)</sup>、胎生期大脳皮質での神経新生減少の原因遺伝子は Ts1Cje マウストリソミー領域にコードされることが明らかとなった。また、Haydar らは、Ts65Dn マウスの抑制性神経新生が亢進していることを示し、その原因が *Olig1* および *Olig2* 遺伝子の 3 コピー化であることを明らかとし、DS 発達脳において興奮性神経と抑制性神経の均衡崩壊が起こっていることを示した<sup>23)</sup>。

### 3.4 興奮性—抑制性神経伝達の均衡崩壊

脳の活動は、興奮性神経と抑制性神経のバランスによって調節されている。現在、DS モデルマウスを用いた研究から、DS 脳における過剰な GABA シグナルが記憶学習障害の基盤となっている可能性が示唆されている。記憶学習の基盤として理解されているシナプス可塑性は

LTP として評価され、海馬スライスを用いた電気生理学的手法により検出される。Ts65Dn マウスや Ts1Cje マウスの海馬スライスでは LTP の有意な減少がみられ<sup>24,25)</sup>、Ts65Dn マウス海馬スライスで見られる LTP の減少は、 $\text{Cl}^-$  チャンネルを内包するチャンネル型  $\text{GABA}_A$  受容体の阻害剤であるピクロトキシンの存在下では抑制される<sup>26)</sup>。さらに、 $\text{GABA}_A$  受容体の非競合的阻害剤であるペンチレンテトラゾールのでんかんを誘発しない濃度での長期経口投与は Ts65Dn マウスの LTP の減少を改善する<sup>27)</sup>。これら一連の研究成果は、DS の記憶学習障害における過剰抑制の関与を示しており、DS 記憶障害における興奮性—抑制性神経伝達の不均衡の関与を示唆している。一方、DS 者の特徴の 1 つとして、てんかんを高率に発症することが知られており、GABA 抑制性神経伝達の過剰仮説に疑念が残る事実である。この矛盾を説明できる可能性のある知見が報告された。通常 GABA が  $\text{GABA}_A$  受容体に結合するとチャンネルが開口し、細胞外  $\text{Cl}^-$  が神経細胞内に流入し過分極を引き起こすことで興奮が抑制されるが、Ts65Dn マウスの神経細胞では逆に脱分極が誘導される<sup>28)</sup>。これは、Ts65Dn マウスの海馬での  $\text{Cl}^-$  を細胞内に取り込む  $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$  共輸送体 NKCC1 の発現増加によって細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度が恒常的に高く、GABA の作用によって  $\text{GABA}_A$  受容体が開口すると  $\text{Cl}^-$  が流出し脱分極が起こると考えられている<sup>28)</sup>。つまり、DS 者の脳における特定の神経細胞では、GABA が抑制性ではなく興奮性の神経伝達を担う可能性があり、てんかん発作の発生率の上昇の要因となっている可能性が考えられる。

## 4. Ts1Cje マウスの成体脳における発現分子の網羅的解析による DS 病態の理解

DS モデルマウス、特に Ts1Cje マウスの成体期および胎仔期の脳における発現変動分子を同定することは、記憶学習障害などの脳の病態を理解する手がかりとなると考え、我々の研究グループは、タンパク質や転写産物、あるいは脂質や元素といった様々な分子の網羅的な発現解析法である OMICS 解析を行った。

### 4.1 プロテオミクス解析

Ts1Cje マウスの記憶学習障害は 3 ヶ月齢以降の雄性マウスにて確認されていることから、この月齢の Ts1Cje マウス脳において野生型マウスと比較して発現変動の見られるタンパク質を二次元電気泳動による分離を用いたプロテオミクス解析により同定を試みた。驚くことに、3 ヶ月齢の雄性 Ts1Cje マウスの脳抽出物の二次元電気泳動像は野生型マウスのものと完全に一致しており、発現変動の見られるタンパク質を検出することは出来なかった<sup>29)</sup>。また、我々は神経新生減少を伴う脳発達遅滞が見られる胎生期 14.5 日目脳についてもプロテオミクス解析を行い、Ts1Cje マウスの胎仔脳での発現変動タンパク質の同定を行った。胎生期では、成体期とは異なり Ts1Cje マウス脳において 4 つのタンパク質の発現増加および 1 つのタンパク質の発現減少を見いだした<sup>29)</sup>。これらのうち、細胞増殖関連分子である Calcyclin 結合タンパク質<sup>30)</sup>の発現増加および細胞増殖抑制因子として知られる Nucleoside diphosphate kinase B<sup>31)</sup>の発現減少が見られたことから、細胞増殖の増加が考えられ、さらに細胞の代謝に関わる Transketolase および Pyruvate kinase の発現増加からも Ts1Cje マウスの胎仔脳での細胞増殖の亢進が示唆され

た。そこで、Ts1Cje マウスの胎仔脳で細胞増殖活性が増加している部分を調べたところ、抑制性神経の新生領域である大脳基底核原基において増殖細胞数の増加が見られた<sup>29)</sup>。Ts65Dn マウスでの抑制性神経新生亢進の原因遺伝子として *Olig1* および *Olig2* が示唆されており<sup>23)</sup>、これら両遺伝子は Ts1Cje マウスのトリソミー領域にコードされていることから、Ts1Cje マウスの大脳基底核原基における細胞増殖活性の増加は、抑制性神経の新生亢進によるものである可能性も考えられた。

### 4.2 トランスクリプトミクス解析

胎仔期の神経新生減少や大脳基底核原基における抑制性神経新生亢進の可能性について分子レベルでの理解を目指して転写産物の網羅的な解析であるマイクロアレイを用いたトランスクリプトミクス解析を行った。Ts1Cje マウスのトリソミー領域にコードされた遺伝子に関しては、いくつかの例外を除き、その遺伝子量に依存した発現量の増加が見られた<sup>32)</sup>。また、非トリソミー領域遺伝子の発現変動も見られ、プロテオミクス解析で見られた発現変動タンパク質の mRNA に関しては、有意な発現変動を検出できず、抑制性神経新生亢進を示唆する遺伝子発現変動は見られなかったが、炎症関連遺伝子群の発現増加が顕著であった<sup>32)</sup>。そこで、炎症関連遺伝子群の発現変動の責任遺伝子の同定を行い、その病態生理学的意義を解明することを試みた。Ts1Cje トリソミー遺伝子のうち、既に炎症への関連性が示唆されている 2 つの E26 transformation-specific sequence (ETS) 転写因子、*Ets2* および *Erg* 遺伝子に着目し、これらの遺伝子の 3 コピー化による炎症遺伝子群の発現上昇の可能性について“*in vivo* gene subtraction 法”を用いて同定を試みた (図 3)。Ets2 遺伝子のみを正常コピー数である 2 コピーとした Ts1Cje マウスではなく、Erg 遺伝子のみを 2 コピーに

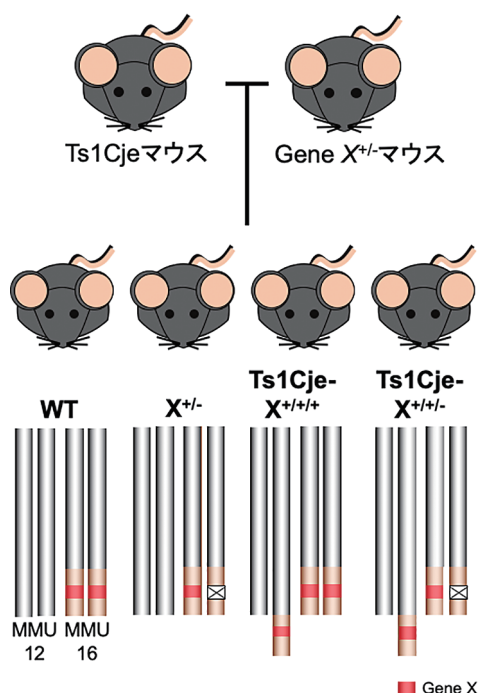


図3 DSモデルマウスを用いた“*in vivo* 遺伝子引き算法”による異常表現型責任遺伝子の同定

DSモデルマウスであるTs1CjeマウスとTs1Cjeマウスのトリソミー領域にコードされるX遺伝子のヘテロ欠損マウスを交配することで、X遺伝子のみが正常の2コピーとなったTs1Cjeマウス (Ts1Cje-X<sup>+/-</sup>マウス)が得られる。このマウスの異常表現型を解析し、Ts1Cjeマウスで見られた異常が改善されれば、その異常に関してはX遺伝子の3コピー化が少なくとも原因の1つであることが分かる。

戻したTs1Cjeマウスでのみ、Ts1Cjeマウスで見られた炎症関連遺伝子群の発現増加が改善されたことからErg遺伝子の3コピー化がこの遺伝子群の異常発現の原因であることを突き止めた<sup>32)</sup>。さらに我々は、炎症遺伝子群が炎症性細胞のマーカー分子であるものが多かったことから、Ts1Cjeマウスの胎仔脳内への炎症性細胞の浸潤を想定してフローサイトメトリーによる解析を行い、脳内での単球や好中球といった炎症性細胞数の増加を明らかとし、その原因がErg遺伝子の3コピー化であることも確認した<sup>32)</sup>。また、このフローサイトメトリー解析において脳内の免疫細胞であるミクログリアを含む脳内マクロファージの細胞数がTs1Cjeマウス胎仔

脳において減少していることを見いだした。驚くことに、この脳内マクロファージ数の減少の原因もErg遺伝子の3コピー化であった<sup>32)</sup>。最後に、これら炎症性細胞や免疫細胞数の異常が胎仔脳の大脳皮質での神経新生減少に関与する可能性について検討し、Erg遺伝子のみを2コピーとしたTs1Cjeマウスにおいて神経新生減少の改善が見られたことから、Erg遺伝子の3コピー化が胎生期Ts1Cjeマウスの神経新生減少の原因の一つであることを明らかにした<sup>32)</sup>。Ts1Cjeマウスの胎生期大脳皮質の発達遅滞がDYRK1Aの阻害剤〔化合物名：altered generation of neuron (ALGERNON)〕によって改善されることが示されており<sup>33)</sup>、今後はトリソミー遺伝子であるDyrk1aとErgの機能的相互作用を明らかにすることで、DSの胎生期大脳皮質の神経新生減少を伴う発達遅滞のメカニズムをより詳細に解明できると考えている。

#### 4.3 リピドミクス解析およびエレメントミクス解析

前項で概説したように、2種類のOMICS解析によって胎生期の異常発現分子を捉えることに成功し、さらにErg遺伝子の3コピー化がTs1Cjeマウスの胎仔脳での炎症性細胞や免疫細胞の不均衡や大脳皮質の神経新生の減少を引き起こすことを明らかとしたが、記憶学習障害が見られる成体期脳での発現変動分子が捉えられないことから、この時期でのタンパク質や転写産物以外の発現変動分子の同定を試みた。まず、膜のリン脂質の組成について比較検討するリピドミクス解析を行った。3ヶ月齢の雄性Ts1Cjeマウスおよび同腹の野生型マウスの脳を摘出し、抗酸化剤であるジブチルヒドロキシルエー存在下にて小脳および海馬を分離した。これらの脳部位から脂質をBligh & Dyer法にて抽出し、リン脂質をシリカゲルにて分離し、含まれる脂肪酸をGC-MSにて分析したところ、12種

類検出することができたが、Ts1Cje マウスにおいて有意に変動が見られる脂肪酸はなかった（石原ら未発表データ）。次に、脳内の元素に関して着目し、誘導結合プラズマ質量分析（ICP-MS）による網羅的な元素分析を行ったところ、いくつかの元素に関して Ts1Cje マウスで量的異常を見いだした<sup>34)</sup>。そのうち、銅イオンのみは複数の脳部位において高濃度を示したことから、Ts1Cje マウスの中枢性症状への深い関与が考えられた。銅は、鉄と同様、フェントン反応により過酸化水素からヒドロキシラジカルの発生が示唆され<sup>35, 36)</sup>、さらに Cl<sup>-</sup> の共存下において銅 - フェントン反応が促進されることから<sup>37)</sup>、先述したように神経細胞内の Cl<sup>-</sup> の過剰蓄積が示唆されている DS モデルマウス脳での銅蓄積が酸化ストレス亢進を惹起している可能性が疑われた。そこで、Ts1Cje マウスに3ヶ月間低銅含有食を与え、脳での銅濃度の低下を確認した後、酸化ストレスの亢進について検討したところ、低銅含有食を投与した Ts1Cje マウス群では、酸化ストレスの亢進の抑制が見られたことから、銅蓄積が酸化ストレスの原因であることが明らかとなった<sup>34)</sup>。また、Ts1Cje マウスの脳でのリン酸化タウの蓄積に関しても低銅含有食投与により改善が見られた<sup>34)</sup>。しかしながら、残念なことにモリス水迷路試験における記憶学習障害に関しては、低銅含有食投与による改善効果はみられず、むしろ悪化した。これは、低銅食投与による銅低下作用が強く、Ts1Cje マウスに低銅含有食を投与したグループでは、野生型マウスレベルよりも海馬や大脳皮質における銅濃度が低かったことが原因の可能性も考えられ、今後、銅蓄積と記憶学習障害との関係に関してはさらに精査が必要であると考えている。また、我々は Ts1Cje マウスが過活動であり且つ不安欠如様の行動異常を呈することを見いだしており<sup>37)</sup>、低銅含有食投与による不安欠如様行動の改善を見いだした<sup>34)</sup>。一方、過活動に関

しては低銅含有食投与による改善は見られなかった。以上の行動試験の結果から、銅の蓄積が不安欠如様行動の原因であることが分かり、また、これまで過活動と不安欠如様行動が連関している可能性も考えていたが<sup>37)</sup>、今回の低銅含有食投与実験によってこれらの行動異常は非依存적であることが明らかとなった。

## 5. おわりに

本稿では、私がこれまでに理化学研究所脳科学総合研究センターの神経遺伝研究チームの研究員として、また京都薬科大学・病態生化学分野の教員として行ってきた研究成果を紹介した。特に京都薬科大学での研究では、治療薬開発を見据えて多種類の OMICS 解析を駆使した治療標的分子の同定を行い、本稿にて紹介したように治療に結びつく可能性がある標的を見出すことに成功したと考えている。研究を開始した当初は、DS の知的障害は、胎生期における異常が原因となり成体期での記憶学習障害に繋がる一連の異常表現型と考えており、この仮説に基づいて治療戦略を構築しようとしていたが、OMICS 解析などの一連の研究成果を考察し、現在では胎生期における脳発達遅滞と記憶学習障害は非依存적である可能性が高いと考えており、胎児期での脳発達遅滞の改善を目的とした胎内治療の実現化と成体期での記憶学習障害に対する治療の実現化を各々目指した個別治療戦略の構築が必要であると思っている。しかしながら、まだメカニズムや原因遺伝子が不明なものも多く、特に胎生期脳での炎症性細胞数の増加が起こる理由やその病態生理学的意義についての答え、また成体期脳での銅蓄積が起こる分子レベルでの説明が必要である。さらに今後は、ヒトでの応用を見据えたトランスレーショナル・リサーチを展開することで、“bench



to bedside”を実現させ、未だ無いDSの知的障害に対する薬物治療を実現化させたいと考えている。一方、DSの診断においては、母体血から胎児の染色体の異数性を検出できる無侵襲的遺伝学的出生前検査（NIPT）が開発され、目覚ましい進歩を遂げているが、現在そのあり方に関して厚生労働省も巻き込んだ議論が行われている最中である<sup>38)</sup>。特に、NIPTによりDS陽性となった場合の高い人工妊娠中絶率や確定診断でないNIPTの結果のみでの人工中絶に関しては大きな問題として扱われているが、これは治療法のない疾患に対する検査であるがゆえの問題であり、DSに対する有効な治療法がないことが問題の根本であることは明白である。我々は、DSの発達遅滞や知的障害の病態メカニズムを解明し、新規治療法を確立することが、DS児を育てることに対するハードルを下げ、NIPTの意義の向上へと繋がると期待している。

## 【謝辞】

本稿で紹介した我々の研究は、科研費 若手研究（B）や基盤研究（C）（課題番号 22790091, 25460077, 18K06940）、私立大学戦略的研究基盤形成事業（課題番号 S120100）、武田科学振興財団・薬学系研究奨励（2011年、2016年）、清水免疫学・神経科学振興財団研究助成金（2014年）、車両競技公益資金記念財団 医療の基礎的先駆的研究への助成事業（2017–2019年度）、京都薬科大学科学振興基金（2011–2013年度、2014–2016年度）の助成を受けて行った。この場を借りて深く御礼申し上げます。前半部のDSモデルマウスでの酸化ストレス亢進に関する研究は、理化学研究所脳科学総合研究センター神経遺伝チームで行われたもので、多大なご支援をいただきました山川和弘チームリーダー、研究室のメンバーならびに多くの共同研

究者に深く御礼申し上げます。また、後半部のOMICS解析を用いたDS知的障害治療標的分子の同定研究は、京都薬科大学・病態生化学分野にて行なったものであり、秋葉 聡教授をはじめ研究室スタッフ、ダウン症研究チームの一員として研究をサポートしてくれた多くの大学院生や学部生諸氏および多くの共同研究者にこの場を借りて感謝申し上げます。

## 【利益相反】

本研究において利益相反はない。

## 【引用文献】

- 1) Joan Morris, David Mutton, Eva Alberman. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J. Med. Screen.* **2002**, 9, 2–6.
- 2) Hernández-González S, Ballestín R, López-Hidalgo R, Gilabert-Juan J, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Nacher J, Varea E. Altered distribution of hippocampal interneurons in the murine Down Syndrome model Ts65Dn. *Neurochem. Res.* **2015**, 40, 151–164.
- 3) Muriel T. Davisson, Cecilia Schmidt, Ellen C. Akeson. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1990**, 360, 263–280.
- 4) Roger H. Reeves, Nicholas G. Irving, Timothy H. Moran, Anny Wahn, Cheryl Kitt, Sangram S. Sisodia, Cecilia Schmidt, Roderick T. Bronson, Muriel T. Davisson. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* **1995**, 11, 177–184.
- 5) Lina Chakrabarti, Zygmunt Galdzicki, Tarik F. Haydar. Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 11483–11495.
- 6) Haruhiko Sago, Elaine J. Carlson, Desmond J. Smith, Joshua Kilbridge, Edward M. Rubin, William C. Mobley, Charles J. Epstein, Ting-Ting Huang. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1998**, 95, 6256–6261.
- 7) Haruhiko Sago, Elaine J. Carlson, Desmond J. Smith, Edward M. Rubin, Linda S. Crnic, Ting-Ting Huang,

- Charles J. Epstein. Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr. Res.* **2000**, 48, 606–613.
- 8) Lisa E Olson, Joan T Richtsmeier, J Leszl, Roger H Reeves. A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science* **2004**, 306, 687–690.
  - 9) Anna J. Esbensen. Health conditions associated with aging and end of life of adults with Down syndrome. *Int. Rev. Res. Ment. Retard.* **2010**, 39, 107–126.
  - 10) Jorge Busciglio, Bruce A. Yankner. Apoptosis and increased generation of reactive oxygen species in Down's syndrome neurons *in vitro*. *Nature* **1995**, 378, 776–779.
  - 11) Andre Strydom, Mark J Dickinson, Simadevi Shende, Domenico Pratico, Zuzana Walker. Oxidative stress and cognitive ability in adults with Down syndrome. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2009**, 33, 76–80.
  - 12) Marianna Zana, Zoltán Janka, János Kálmán. Oxidative stress: A bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2007**, 28, 648–676.
  - 13) Slobodan V. Jovanovic, Debbie Clements, Kent MacLeod. Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, 25, 1044–1048.
  - 14) Keiichi Ishihara, Kenji Amano, Eiichi Takaki, Abdul Shukkur Ebrahim, Atsushi Shimohata, Noriko Shibasaki, Ikuyo Inoue, Mayuko Takaki, Yuto Ueda, Haruhiko Sago, Charles J. Epstein, Kazuhiro Yamakawa. Increased lipid peroxidation in Down's syndrome mouse models. *J. Neurochem.* **2009**, 110, 1965–1976.
  - 15) Frances K. Wiseman, Tamara Al-Janabi, John Hardy, Annette Karmiloff-Smith, Dean Nizetic, Victor L. J. Tybulewicz, Elizabeth M.C. Fisher, André Strydom. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.* **2015**, 16, 564–574.
  - 16) Heiko Braak, Eva Braak. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol. Aging* **1997**, 18, 351–357.
  - 17) Erik D. Roberson, Kimberly Scarce-Levie, Jorge J. Palop, Fengrong Yan, Irene H. Cheng, Tiffany Wu, Hilary Gerstein, Gui-Qiu Yu, Lennart Mucke. Reducing endogenous Tau ameliorates Amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **2007**, 316, 750–754.
  - 18) Ebrahim A. Shukkur, Atsushi Shimohata, Takumi Akagi, Wenxin Yu, Mika Yamaguchi, Miyuki Murayama, Dehua Chui, Tamaki Takeuchi, Kenji Amano, Karthik Harve Subramhanya, Tsutomu Hashikawa, Haruhiko Sago, Charles J. Epstein, Akihiko Takashima, Kazuhiro Yamakawa. Mitochondrial dysfunction and Tau hyperphosphorylation in Ts1Cje, a mouse model for Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2006**, 15, 2752–2762.
  - 19) Naftali Raz, Ivan J. Torres, Susan D. Briggs, Wesley D. Spencer, Allen E. Thornton, Wendy J. Loken, F M Gunning, J McQuain, Naomi R. Driesen, James D. Acker. Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates: evidence from MRI morphometry. *Neurology* **1995**, 45, 356–366.
  - 20) Jeffrey A. Golden, Bradley T. Hyman. Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **1994**, 53, 513–520.
  - 21) Lina Chakrabarti, Zygmunt Galdzicki, Tarik F. Haydar. Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 11483–11495.
  - 22) Keiichi Ishihara, Kenji Amano, Eiichi Takaki, Atsushi Shimohata, Haruhiko Sago, Charles J. Epstein, Kazuhiro Yamakawa. Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome. *Cereb. Cortex* **2010**, 20, 1131–1143.
  - 23) Lina Chakrabarti, Tyler K. Best, Nathan P. Cramer, Rosalind S.E. Carney, John T.R. Isaac, Zygmunt Galdzicki, Tarik F. Haydar. Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat. Neurosci.* **2010**, 13, 927–934.
  - 24) Richard J. Siarey, James Stoll, Stanley Isaac Rapoport, Zygmunt Galdzicki. Altered long-term potentiation in the young and old Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Neuropharmacology* **1997**, 36, 1549–1554.
  - 25) Richard J. Siarey, Angela J. Villar, Charles J. Epstein, Zygmunt Galdzicki. Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology* **2005**, 49, 122–128.

- 26) Alexander M. Kleschevnikov, Pavel V. Belichenko, Angela J. Villar, Charles J. Epstein, Robert C. Malenka, William C. Mobley. Hippocampal Long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a Genetic model of Down syndrome. *J. Neurosci.* **2004**, 24, 8153–8160.
- 27) Fabian Fernandez, Wade Morishita, Elizabeth Zuniga, James Nguyen, Martina Blank, Robert C. Malenka, Craig C. Garner. Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome. *Nat. Neurosci.* **2007**, 10, 411–413.
- 28) Gabriele Deidda, Martina Parrini, Shovan Naskar, Ignacio F. Bozarth, Andrea Contestabile, Laura Cancedda. Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. *Nat. Med.* **2015**, 21, 318–326.
- 29) Keiichi Ishihara, Shiho Kanai, Haruhiko Sago, Kazuhiro Yamakawa, Satoshi Akiba. Comparative proteomic profiling reveals aberrant cell proliferation in the brain of embryonic Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome. *Neuroscience* **2014**, 281, 1–15.
- 30) Gabriela Schneider, Anna Filipek. S100A6 binding protein and Siah-1 interacting protein (CacyBP/SIP): spotlight on properties and cellular function. *Amino Acids* **2011**, 41, 773–780.
- 31) Mi-Young Lee, Woo-Jeong Jeong, Jong-Won Oh, Kang-Yell Choi. NM23H2 inhibits EGF- and Ras-induced proliferation of NIH3T3 cells by blocking the ERK pathway. *Cancer Lett.* **2009**, 275, 221–226.
- 32) Keiichi Ishihara, Ryohei Shimizu, Kazuyuki Takata, Eri Kawashita, Kenji Amano, Atsushi Shimohata, Donovan Low, Takeshi Nabe, Haruhiko Sago, Warren S. Alexander, Florent Ginhoux, Kazuhiro Yamakawa, Satoshi Akiba. Perturbation of the immune cells and prenatal neurogenesis by the triplication of the *Erg* gene in mouse models of Down syndrome. *Brain Pathol.* **2020**, 30, 75–91.
- 33) Akiko Nakano-Kobayashi, Tomonari Awaya, Isao Kii, Yuto Sumida, Yukiko Okuno, Suguru Yoshida, Tomoe Sumida, Haruhisa Inoue, Takamitsu Hosoya, Masatoshi Hagiwara. Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2017**, 114, 10268–10273.
- 34) Keiichi Ishihara, Eri Kawashita, Ryohei Shimizu, Kazuki Nagasawa, Hiroyuki Yasui, Haruhiko Sago, Kazuhiro Yamakawa, Satoshi Akiba. Copper accumulation in the brain causes the elevation of oxidative stress and less anxious behavior in Ts1Cje mice, a model of Down syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, 134, 248–259.
- 35) John M.C. Gutteridge, Stephanie Wilkins. Copper salt-dependent hydroxyl radical formation: Damage to proteins acting as antioxidants. *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 759, 38–41.
- 36) David A. Rowley, Barry Halliwell. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: A physiologically significant reaction? *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, 225, 279–284.
- 37) Zhi Shan, Mingsheng Lu, Li Wang, Bruce MacDonald, Judy MacInnis, Martin Mkandawire, Xu Zhang, Ken D. Oakes. Chloride accelerated Fenton chemistry for the ultrasensitive and selective colorimetric detection of copper. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 2087–2090.
- 38) Atsushi Shimohata, Keiichi Ishihara, Satoko Hattori, Hiroyuki Miyamoto, Hiromasa Morishita, Guy Ornathanalai, Matthieu Raveau, Abdul Shukkur Ebrahim, Kenji Amano, Kazuyuki Yamada, Haruhiko Sago, Satoshi Akiba, Nobuko Mataga, Niall P. Murphy, Tsuyoshi Miyakawa, Kazuhiro Yamakawa. Ts1Cje Down syndrome model mice exhibit environmental stimuli-triggered locomotor hyperactivity and sociability concurrent with increased flux through central dopamine and serotonin metabolism. *Exp. Neurol.* **2017**, 293, 1–12.
- 39) 野崎亜紀子. 無侵襲的遺伝学的出生前検査(NIPT)への規律のあり方をかんがえるために. 京都薬科大学紀要. **2020**, 1, 47–57.

## Analyzing the pathophysiological mechanisms of Down syndrome and identification of therapeutic targets using mouse models of Down syndrome

Keiichi Ishihara

Department of Pathological Biochemistry, Kyoto Pharmaceutical University

Down syndrome (DS), caused by triplication of human chromosome 21, is the most frequent aneuploidy. The characteristics of DS include certain constant phenotypic characteristics such as craniofacial features, intellectual disability, and cognitive impairment in adulthood. The last decade has seen incredible advances in the diagnosis of DS, what is called as non-invasive prenatal testing (NIPT). NIPT can detect abnormal fetal chromosomes in the maternal plasma by next-generation sequencing of cell-free DNA in the maternal plasma. In contrast to the advances in diagnosis, the molecular mechanisms leading to the development of phenotypic changes are poorly understood. We have studied using the DS model mice to elucidate the molecular mechanisms underlying intellectual disability and cognitive impairment in adulthood so far. In the current review, I present our recent comprehensive (OMICS) analysis to identify disturbed molecules in the brain of mouse models of Down syndrome for developing the pharmacological therapy of DS.

**Keywords:** Down syndrome, mouse models, OMICS analysis, pathophysiological mechanisms, intellectual disability