

氏 名 (生年月日) ^し清 ^{みず}水 ^{りょう}涼 ^{へい}平 (1991 年 8 月 15 日)

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 博 薬 第 203 号

学位授与の日付 2021 年 3 月 20 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 トランスクリプトーム解析によるダウン症脳発達遅滞原因遺伝子 *Erg* と
記憶学習障害関連候補遺伝子 *Tbx1* の同定

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 秋 葉 聡
 (副査) 教 授 長 澤 一 樹
 (副査) 教 授 中 山 祐 治

論 文 内 容 の 要 旨

序章

ダウン症候群 (DS) はヒト 21 番染色体 (HSA21) がトリソミーとなり発症する染色体異常であり、ほぼ全ての患者は知的障害を呈する。ヒト DS 胎児の脳では神経細胞数の減少が認められることから脳発達遅滞の一因であると示唆されており、これが知的障害の原因であると推察されているが、これらの分子メカニズムおよび関連性は不明である。近年、HSA21 と相同のマウス 16 番染色体 (MMU16) のテロメア側領域を 3 コピーもつ DS モデルマウスが数種樹立されており、胎児期から成体期までの過程に亘り DS の病態解析に有用である。この DS モデルの 1 つとして、約 70 遺伝子を含む HSA21 相同 MMU16 領域を 3 コピーもつ Ts1Cje マウスは、記憶学習障害を示すことから知的障害の病態解析に有用であり、また、神経新生減少を伴った胎生期大脳皮質形成遅滞を呈することから胎生期脳発達遅滞と成体期の記憶学習障害の分子メカニズムおよび関連性の解明に適している。本研究では、Ts1Cje マウスの胎生期および成体期脳での遺伝子発現を網羅的に解析し、脳発達遅滞と記憶学習障害の分子メカニズムの解明およびこれらの関連性の検証を試みた。

第 1 章 DS モデルマウス胎生期脳での炎症関連遺伝子群の発現亢進とその原因遺伝子の同定

Ts1Cje マウスの胎生期脳発達遅滞の分子メカニズムの解明を目的として、SurePrint G3 Mouse GE microarray 8x60K Chip を用いた DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行ったところ、Ts1Cje マウスの胎生 14.5 日目の脳において 61 遺伝子の発現変動を検出し、このうち発現増加量の多い上位 10 種の遺伝子のほとんどが炎症関連遺伝子であることがわかった。また、変動遺伝子の機能的特徴について分類する、遺伝子オントロジーをベースとしたデータベース The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) を用いた Functional Annotation Clustering 解析によっても、炎症反応に関するクラスターの有意な変動を確認した。これら炎症関連遺伝子群の発現増加は、Ts1Cje マウスのトリソミー遺伝子を含む約 90 遺伝子を 3 コピーもつ Ts2Cje マウス、および、Ts1Cje マウスのトリソミー領域のうちの約 30 遺伝子を 3 コピーもつ Ts1Rhr マウスでもみられたことから、炎症関連遺伝子群発現亢進の原因遺伝子が Ts1Rhr マウスのトリソミー領域に含まれることが示唆された。そこで、Ts1Rhr マウスのトリソミー領域内にコードされ、炎症関連遺伝子の転写制御機能が示唆されている *Ets transcription factor (Erg)* 遺伝子に着目した。Erg 遺伝子のみを正常の 2 コピーと

した Ts1Cje マウス (Ts1Cje-Erg^{+/mld2} マウス) を機能喪失 Erg アレル (Erg^{mld2}) をヘテロ接合体としてもつ Erg^{mld2/+} マウスと Ts1Cje マウスを交配することで作出し、本マウス胎生期脳での炎症関連遺伝子群の mRNA の発現を検討した。Ts1Cje-Erg^{+/mld2} マウスの胎生期脳での炎症関連遺伝子群の mRNA 発現量は、WT マウスに比し高かったが、Ts1Cje マウスより低かったことから、Erg 遺伝子のコピー数増加が DS モデルマウス胎生期脳での炎症関連遺伝子群発現増加を引き起こすことが明らかとなった。炎症関連遺伝子群の多くは炎症性細胞で発現する遺伝子であったため、Ts1Cje マウス胎生期脳での炎症性細胞数の増加を想定し、フローサイトメトリーにより炎症性細胞数を測定した。その結果、Ts1Cje マウス胎生期脳では野生型マウスに比し、約 4 倍の単球および約 7 倍の好中球が存在しており、Ts1Cje-Erg^{+/mld2} マウスにおいては野生型マウスに比しそれぞれ 2 倍および 4 倍程度の細胞数であったが、Ts1Cje マウスに比し有意に少なかった。一方、Ts1Cje マウス胎仔の脳内マクロファージ数は野生型マウスに比し 9 割程とわずかではあるが有意に少なかったが、Ts1Cje-Erg^{+/mld2} マウスにおいては野生型マウスと同程度であった。このように、Ts1Cje マウス胎生期脳での炎症性遺伝子群の増加は炎症性細胞数の増加に起因すると考えられ、Erg 遺伝子の 3 コピー化が脳内の炎症性細胞数の増加やマクロファージ数の減少を引き起こすことが示唆された。

第2章 Ts1Cje マウスの胎生期神経新生に Erg 遺伝子 3 コピー化が及ぼす影響

マウス胎生期脳における炎症の亢進は神経新生を減少させると示唆されていることから、Erg 遺伝子のコピー数の増加が Ts1Cje マウス胎生期大脳皮質での神経新生減少の一因となる可能性を考えた。そこで、核酸誘導体 bromodeoxyuridine で標識した新生神経幹・前駆細胞を免疫染色法により検出することで Ts1Cje-Erg^{+/mld2} マウスの胎生期神経新生について評価したところ、Ts1Cje マウスでみられた神経新生の減少は本マウスでは認められなかった。これに対し、成体期 (12 週齢) 海馬における神経新生の低下およびモリス水迷路試験での空間記憶学習能力の低下によって示唆される記憶学習障害は Ts1Cje マウスと同様の傾向が Ts1Cje-Erg^{+/mld2} マウスでもみられた。以上のことから、Ts1Cje マウスにおける Erg 遺伝子の 3 コピー化は胎生期脳での神経新生減少の一因であるが、成体期記憶学習障害の一因ではないことが示された。

第3章 DS モデルマウス胎生期脳および成体期海馬における共通変動遺伝子 Tbx1 の発見

DS 記憶学習障害の関連分子の同定を目的として、Ts1Cje マウスの成体期海馬において胎生期脳と同様にトランスクリプトーム解析をしたところ、101 遺伝子の発現が変動していたが、DAVID 解析では胎生期脳と異なり炎症反応関連のクラスターは検出されなかった。しかし、胎生期脳および成体期海馬では、*T-box1* (*Tbx1*) 遺伝子の発現が共通して半減していた。*Tbx1* 遺伝子の発現減少は、HSA21 相同 MMU16 領域の全域を 3 コピーもち Ts1Cje マウスより重度の記憶学習障害を示す Dp(16)1Yey/+ マウスでも Ts1Cje マウスと同程度であったが、Ts1Cje マウスより軽度の記憶学習障害を示す Ts1Rhr マウスでは胎生期でのみ認められ、成体期では認められなかった。以上より、DS モデルマウスの胎生期脳と成体期海馬で *Tbx1* 遺伝子の発現が減少しており、特に成体期海馬では記憶学習障害の重症度と対応して発現が減少していたことから、*Tbx1* 遺伝子の発現減少が記憶学習障害に関連している可能性が考えられた。

総括

本研究では、DS モデルマウスのトランスクリプトーム解析の結果を基に、胎生期脳において Erg 遺伝子のコピー数増加が炎症性細胞数の増加、脳内マクロファージ数の減少および脳発達遅滞を引き起こすものの、成体期での記憶学習障害の原因ではない可能性を示した。一方、DS マウスの胎生期

脳および成体期海馬で *Tbx1* 遺伝子の発現減少を明らかにした。*Tbx1* 遺伝子は、DS と同様、知的障害を呈する 22q11.2 欠失症候群の欠失領域内の遺伝子であることから、両症候群の知的障害への TBX1 発現減少の関与の可能性が考えられる。このように、本研究では、DS 脳発達遅滞の原因遺伝子 *Erg* と記憶学習障害関連候補遺伝子 *Tbx1* を提示した。これら両遺伝子やその産物は、DS の発達遅滞・知的障害の予防治療標的となる可能性があり、本研究での成果は DS の薬物治療の実現化に貢献すると考える。

審 査 の 結 果 の 要 旨

《緒言》

ダウン症はヒト 21 番染色体のトリソミーに起因した染色体異常であり、ほぼ全ての患者は知的障害を呈する。この知的障害の要因として、胎児の脳での神経細胞数の減少に伴う脳発達遅滞が関与することが推察されているが、トリソミー遺伝子が多種多様であることから、知的障害における責任遺伝子や胎生期の病態との関連性については不明である。近年、ダウン症モデルマウスが数種樹立されており、ヒト 21 番染色体と相同のマウス 16 番染色体のうち、約 70 遺伝子を 3 コピーもつ Ts1Cje マウスは、神経新生の減少を伴う胎生期大脳皮質形成遅滞を呈し、かつ、成体期では記憶学習障害を示すダウン症候モデルとして、知的障害の病態解析に用いられている。本研究では、知的障害における胎児脳発達遅滞との関連性や、胎児脳発達遅滞および知的障害の病態に関連する分子の同定を目的とし、Ts1Cje マウスの胎生期脳および成体期海馬でのトランスクリプトーム解析の結果に基づいて、主に脳発達遅滞に関連する遺伝子について検証した。

《審査結果の要旨》

第 1 章 ダウン症モデルマウス胎生期脳での炎症関連遺伝子群の発現亢進とその原因遺伝子の同定

Ts1Cje マウスの胎生期脳を試料としたトランスクリプトーム解析により、単球および好中球に高発現する炎症関連遺伝子群の mRNA 発現が野生型マウスに比し増加していることを見出した。この結果を基に、Ts1Cje マウスの胎生期脳において、好中球や、単球、炎症性形態を有する脳内マクロファージが増加していることも示した。さらに、これらの異常表現型が、3 コピーとなった遺伝子のうち、*Erg* 遺伝子のみを 2 コピーとした Ts1Cje-*Erg*^{+/+mkd2} マウスにおいては認められないことを示した。以上の知見から、Ts1Cje マウスにおける *Erg* 遺伝子の 3 コピー化が、胎生期脳内での炎症性細胞や脳内マクロファージの変動に関与することを明らかにした。

第 2 章 Ts1Cje マウスの胎生期神経新生に *Erg* 遺伝子 3 コピー化が及ぼす影響

Ts1Cje マウスにおける胎生期脳内での炎症性細胞や脳内マクロファージの変動が、脳発達遅滞の要因となる神経細胞数の減少に関与する可能性について検証した。その結果、Ts1Cje マウスの胎生期大脳皮質領域における神経新生の低下が、*Erg* 遺伝子のみを 2 コピーとした Ts1Cje-*Erg*^{+/+mkd2} マウスでは認められなかったことを示し、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化が脳発達遅滞の一因であることを明らかにした。しかしながら、成体の Ts1Cje-*Erg*^{+/+mkd2} マウスは、成体 Ts1Cje マウスと同様の海馬領域の神経新生低下および空間記憶学習障害の傾向を示したことから、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化に伴う胎生期の脳発達遅滞は成体期における空間記憶学習障害には関与しない可能性が示された。

第3章 ダウン症モデルマウス胎生期脳および成体期海馬における共通変動遺伝子 *Tbx1* の発見

Ts1Cje マウスの成体期海馬を試料としたトランスクリプトーム解析では、胎生期脳でみられた炎症関連遺伝子群の発現増加は認められなかったが、胎生期脳と成体期海馬の両時期に唯一共通して mRNA 発現が半減している *Tbx1* 遺伝子を発見した。さらに、Ts1Cje マウスとは別の空間記憶学習障害を示すダウン症モデルマウスと、本障害を呈さないダウン症モデルマウスを用いた検討では、前者のモデルマウスでのみ、成体期で *Tbx1* 遺伝子の mRNA 発現が減少していることを見出した。以上の知見より、ダウン症モデルマウスにおける空間記憶学習障害と *Tbx1* 遺伝子の発現減少が関連している可能性が考えられた。

《審査の結論》

本研究からは、*Erg* および *Tbx1* の両遺伝子が、それぞれダウン症における脳発達遅滞の原因遺伝子および記憶学習障害関連候補遺伝子として提示された。*Erg* 遺伝子の発現増加は、言語発達遅滞など、記憶学習障害以外の知的障害に関与する可能性があること、また、*Tbx1* 遺伝子はダウン症と同様、知的障害を呈する 22q11.2 欠失症候群の欠失領域内の遺伝子であることを踏まえると、これら両遺伝子は、ダウン症の脳発達遅滞・知的障害の予防・治療標的となる可能性が期待される。本研究での成果はダウン症の病態の理解において意義ある新規知見であり、ダウン症の薬物治療の実現化の礎となることから、本論文は本学学位論文として相応しいと結論する。

以上、学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。