

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

2020 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】病態生化学分野

清水 涼平





## 課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程  
氏名 (英字名) : 清水涼平 (Ryohei Shimizu)  
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

**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*<sup>+/+mld2</sup> マウス) を機能喪失 *Erg* アレル (*Erg*<sup>mld2</sup>) をヘテロ接合体としてもつ *Erg*<sup>mld2/+</sup> 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*<sup>+/+mld2</sup> 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<sup>+/+mld2</sup> 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<sup>+/+mld2</sup> 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<sup>+/+mld2</sup> 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<sup>+/+mld2</sup> 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。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また、本論文は、一部、未発表のデータも含んでいる。

- 1 . 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. [第 1 章、第 2 章]
- 2 . Ryohei Shimizu, Keiichi Ishihara, Eri Kawashita, Haruhiko Sago, Kazuhiro Yamakawa, Ken-ichi Mizutani, Satoshi Akiba. Decrease in the *T-box1* gene expression in embryonic brain and adult hippocampus of down syndrome mouse models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 87-92. [第 3 章]

## 目次

序論	.....1
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	
1-1. 緒言	.....4
1-2. 実験方法	.....5
1-2-1. 動物実験	
1-2-2. DNA マイクロアレイ	
1-2-3. アノテーション解析	
1-2-4. 定量リアルタイム RT-PCR	
1-2-5. ウェスタンブロッティング	
1-2-6. フローサイトメトリー	
1-2-7. 免疫組織化学染色法	
1-2-8. 統計解析	
1-3. 実験結果	.....9
1-3-1. DS モデルマウス Ts1Cje 胎生期脳における遺伝子発現解析	
1-3-2. 複数の DS モデルマウス胎生期脳における炎症関連遺伝子の発現増加	
1-3-3. 炎症関連遺伝子の発現増加の原因遺伝子の探索	
1-3-4. <i>Erg</i> 遺伝子の3コピー化による Ts1Cje 胎生期脳における炎症性細胞の増加	
1-3-5. <i>Erg</i> 遺伝子の3コピー化による Ts1Cje 胎生期脳における脳内マクロファージの形態変化	
1-4. 考察	.....21
1-5. 小括	.....24
第2章 Ts1Cje マウスの胎生期神経新生に <i>Erg</i> 遺伝子3コピー化が及ぼす影響	
2-1. 緒言	.....25
2-2. 実験方法	.....26
2-2-1. 実験動物	
2-2-2. Bromodeoxyuridine ラベリング	
2-2-3. 胎生期脳組織に対する免疫組織化学的染色法	
2-2-4. モリス水迷路試験	
2-2-5. 成体期海馬に対する抗 Doublecortin 抗体を用いた免疫組織化学染色法	
2-2-6. 成体期海馬に対する抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学染色法	
2-3. 実験結果	.....29
2-3-1. <i>Erg</i> 遺伝子の3コピー化による Ts1Cje 胎生期脳における神経新生の低下	
2-3-2. <i>Erg</i> 遺伝子の3コピー化が記憶学習障害に及ぼす影響	
2-3-3. <i>Erg</i> 遺伝子の3コピー化による Ts1Cje 成体海馬における神経新生の低下	
2-4. 考察	.....33
2-5. 小括	.....35

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 <i>Tbx1</i> の発見	
3-1. 緒言	.....36
3-2. 実験方法	.....37
3-2-1. 実験動物	
3-2-2. DNA マイクロアレイ	
3-2-3. アノテーション解析	
3-2-4. 定量リアルタイム RT-PCR	
3-2-5. 統計解析	
3-3. 実験結果	.....39
3-3-1. DSモデルマウス Ts1Cje 成体期海馬における遺伝子発現解析	
3-3-2. 複数のDSモデルマウスにおける <i>Tbx1</i> 遺伝子発現の減少	
3-4. 考察	.....45
3-5. 小括	.....47
総括	.....48
謝辞	.....50
参考文献	.....51

## 略語一覧表

Akr1c13	aldo-keto reductase family1, member C13
ANOVA	analysis of variance
BBB	blood brain barrier
BSA	bovine serum albumin
BrdU	bromodeoxyuridine
DAPI	4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DAVID	the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DCX	doublecortin
Dnahc11	dynein axonemal heavy chain 11
Dp(16)1Yey/+	Dp(16Lipi-Zbtb21)1Yey
DS	Down syndrome
E14.5	embryonic day 14.5
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMP	erythro-myeloid progenitor
Erg	Ets transcription factor
Fam3b	FAM3 metabolism regulating signaling molecule B
GEO	gene expression omnibus
Gpr65	G-protein coupled receptor 65
HSA	human chromosome
HSC	hematopoietic stem cell
HRP	horseradish peroxidase
Itgb2l	integrin beta-2-like
Itgb8	integrin beta-8
Irx1	iroquois homeobox 1
Kcne1	potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1
Kcnj15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6
LSD	least significant difference
LTP	long-term potentiation
Ly6c1	lymphocyte antigen 6C1
MGI	Mouse Genome Informatics
MMU	mouse chromosome
Mrap	melanocortin 2 receptor accessory protein
Mthfsl	5,10-methylenetetrahydrofolate synthetase-like
Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1
Olig1/2	oligodendrocyte transcription factor 1/2
PBS	phosphate-buffered saline
Ripply3	rippy transcriptional repressor 3
RT-PCR	reverse transcript polymerase chain reaction

S100a8/9	S100 calcium-binding protein A8/9
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
Stfa1/2/3	stefin-1/2/3
Sp4/8	trans-acting transcription factor 4/8
TBS	tris-buffered saline
Tbx1	T-box 1
Tmprss	transmembrane serine protease 2
Ts1Cje	Ts(16C-tel)1Cje
Ts1Rhr	Dp(16Cbr1-ORF9)1Rhr
Ts2Cje	Ts[Rb(12.17 <sup>16</sup> )]2Cje
Ts65Dn	Ts(17 <sup>16</sup> )65Dn
WT	wild-type
VE-cadherin	vascular endothelial-cadherin
Vil1	villin 1

## 序論

ダウン症 (DS) はヒト 21 番染色体 (HSA21) が 3 本 (トリソミー) となることによって発症し、知的障害の最も一般的な遺伝的要因の一つである。DS の出生率はおよそ 700 人に一人と高く、またその割合は母体の年齢が高くなるに従い増加することから (1, 2)、晩婚化や、高齢出産の増加により DS 患者の出生数はさらに増加すると危惧されている。

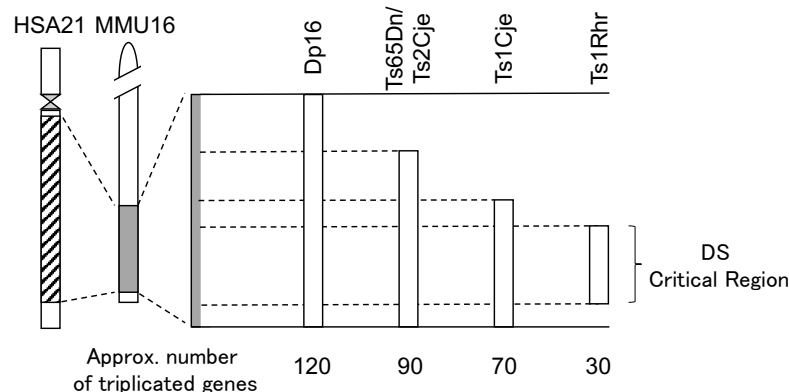
DS は知的障害の他に、特徴的な顔貌、先天性心疾患、眼科的障害など様々な症状を呈する。これらの症状の中で、先天性心疾患や眼科的障害などについては、外科的治療法の進歩によって、大幅に改善されたが (3, 4)、多くの症状については未だ有効な治療法がない。さらに、DS 患者の平均寿命の延長に伴い、最近では新たに早期アルツハイマー病様認知症などの成体期 DS 患者で発症する合併症が問題となってきた (5)。そのため、DS に現れる中枢神経系疾患の治療法の確立は急務である。

DS で現れる中枢神経系疾患様の所見としては、知的障害、自閉症スペクトラム障害、てんかん、脳血管疾患、アルツハイマー病様認知症など多岐にわたる。中でも知的障害は、ほぼ全ての DS 患者に認められることから、治療優先度が高い所見である (6)。DS における知的障害は幼少期からすでに現れ、低知能指数、言語発達の遅れ、認知機能発達の遅れなどによって特徴づけられる (7-9)。その後、成人期にかけ、急速な老化に伴い認知能力がさらに低下し、短期記憶学習障害や長期記憶学習障害などが認められる (9, 10)。DS 知的障害の発症は、主に脳内の神経細胞の異常に起因していると考えられている。DS 成人期患者の脳においては、神経細胞数が減少し、神経細胞の分布や形態にも異常が生じている (11-13)。さらにこの神経細胞の異常は、DS 胎生期の脳においてすでに現れており、神経細胞数の減少、脳容積の低下、大脳皮質の形成異常などの特徴をもった脳発達遅滞がみられる (14-16)。これらの知見から、DS 知的障害は胎生期での脳発達遅滞が原因であると推測されているが、胎生期脳発達遅滞と知的障害の直接的な関連性についての証拠は提示されていない。本研究では、DS 胎生期の脳発達遅滞と生後の知的障害の関連性について、胎生期および成体期脳における発現変動分子を DS モデルマウス脳のトランスクリプトーム解析により明らかとすることで検証した。

DS 病態の解析には、モデルマウスが広く用いられている。HSA21 の長腕は、マウス 10 番染色体 (MMU10)、MMU16 および MMU17 の一部と相同であり (17)、特に、MMU16 のテロメア側の領域は HSA21 の大部分と相同であることから、HSA21 と相同な様々な長さの MMU16 を 3 コピー有するマウスが DS モデルマウスとして樹立されている (Figure 1) (18)。最も古くから存在するモデルマウスの一つである Ts(17<sup>16</sup>)65Dn (Ts65Dn) マウスは、HSA21 と相同な約 90 個の遺伝子をコードする領域をトリソミー領域として有しており、記憶学習障害や神経の変性・機能異常などの DS 患者の特徴に類似した多くの異常表現型を示すことから最もよく利用されている (17, 19)。しかし、本系統は一般的に雄に妊孕性がなく、メスは仔マウスの世話を放棄する場合は指摘されている (20)。この Ts65Dn マウスと同等のトリソミー領域を有するマウスとして、Ts[Rb(12.17<sup>16</sup>)]2Cje (Ts2Cje) マウスが知られている (21)。本マウスでは、Ts65Dn マウスに存在する HSA21 と相同の MMU16 を含む余剰染色体が MMU12 にロバートソン転座しており、雄性マウスに妊孕性があるため Ts65Dn マウスよりも



系統維持がし易い (21)。Ts(16C-tel)1Cje (Ts1Cje) マウスは、Ts65Dn および Ts2Cje マウスよりも短いおよそ 70 個の遺伝子をコードしたトリソミー領域をもつモデルである (22)。本マウスは MMU16 の一部が MMU12 のテロメア側の領域に転座したマウスであり、Ts65Dn より軽度であるが、モリス水迷路試験で評価される空間記憶学習障害を示す (20, 22)。Ts1Cje マウスのトリソミー領域の一部のおよそ 30 個の遺伝子がコードされた領域を 3 コピー有する Dp(16Cbr1-ORF9)1Rhr (Ts1Rhr) マウスも使用されている。Ts1Rhr マウスは、DS 症状を引き起こすのに必要最低限の領域であると考えられていた「ダウン症責任領域」(23, 24) のみを 3 コピーもつように染色体操作を行い作製されたマウスである (24)。しかし本マウスは、Ts65Dn マウスや Ts1Cje マウスで見られる海馬の構造異常や空間記憶学習障害を示さず、現在のところ短期作業記憶の異常のみが検出されているにすぎず、非常に軽度の記憶学習障害を有する DS モデルとされている (25, 26)。最近樹立された Dp(16Lipi-Zbtb21)1Yey (Dp(16)1Yey+) マウスは、HSA21 と相同の MMU16 領域を全て 3 コピーもつマウスで、Ts1Rhr マウスと同様の染色体操作によって作製されたモデルであり、空間記憶学習障害やその電気生理学的指標となる海馬のシナプス可塑性の一つである長期増強 (LTP) の低下を呈する (27, 28)。このように、トリソミー領域長の異なる数種の DS モデルマウスが樹立されており、おおよそトリソミー領域長依存的に記憶学習障害の程度が重くなる傾向が認められる。



**Figure 1. Trisomic segments of the DS mouse models**

The DS mouse models (Dp(16)1Yey/+ (Dp16), Ts65Dn, Ts2Cje, Ts1Cje and Ts1Rhr mice) have the various trisomic segments. The approximate number of protein-coding genes in the trisomic segments is based on the data of NCBI Mouse Genome Resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=mus%20musculus>).

本研究は胎生期脳発達遅滞および生後の知的障害に関連する分子の同定を通じて、胎生期脳発達遅滞および知的障害の関係性についての検証を目的としており、病態に関与するトリソミー領域の遺伝子数が少ないほうが実験結果の解釈が比較的容易となる。それゆえ、可能な限りトリソミー領域が短く、胎生期での脳発達遅滞と生後の知的障害を呈するモデルを選択することが望ましい。DS における生後の知的障害はヒトでは主に知能指数が指標となるが、マウスでは記憶学習能力が指標として用いられる (29, 30)。Dp(16)1Yey/+マウス、Ts65Dn マウスおよび Ts1Cje マウスはモリス水迷路試験における空間記憶学習障害を示し、海馬の

LTP の顕著な低下が認められる (28, 31)。また Ts65Dn マウスおよび Ts1Cje マウスでは、胎生期の脳皮質における神経新生減少を伴う脳発達遅滞が報告されている (32, 33)。これらの知見や繁殖の容易性を考慮した結果、本研究の目的達成には、Ts1Cje マウスの選択が適していると判断した。

第 1 章では、マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析により、まず、Ts1Cje マウス胎生期脳において発現変動する遺伝子産物を同定した。同定した発現変動遺伝子群は、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 解析によってその機能に基づいたクラスターに分類した。また、最も顕著に発現が増加していた炎症関連遺伝子群の転写産物量について、他の DS モデルマウスでの発現変動と比較することで、その発現変動の原因遺伝子のコードされるトリソミー領域の絞り込みを行い、最終的にその原因が *Ets transcription factor* (*Erg*) 遺伝子であることを同定するに至った。また、発現が増加していた炎症関連遺伝子の多くが、炎症性細胞マーカーであることから、マウス胎生期脳における炎症性細胞数やその形態について解析した。

第 2 章では、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化が DS の胎生期脳発達遅滞および知的障害の原因であると仮定し、*Erg* 遺伝子のみを正常の 2 コピーに戻した Ts1Cje マウスにおける、胎生期脳での神経新生、成体期記憶学習能力および成体期海馬での神経新生を評価し、胎生期脳発達遅滞と知的障害の関係性について検討した。

最後に、第 3 章では、マウスにおける胎生期脳発達遅滞と成体期記憶学習障害における共通変動因子の発見を目的として、マイクロアレイにて成体期海馬における発現変動遺伝子の網羅的な解析を行った。胎生期脳と成体期海馬における遺伝子転写産物の発現変動について比較したところ、両期で共通して発現変動する遺伝子として *T-box1* (*Tbx1*) 遺伝子を同定した。

## 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

### 1-1. 緒言

HSA21 のトリソミーによって引き起こされる DS は、知的障害の最も一般的な遺伝的原因の一つであり (9)、特に DS 患者においては、知的障害、特徴的顔貌、筋緊張低下などのさまざまな症状を呈することが知られている (34)。DS における知的障害には様々な症状が含まれており、それらは生後に認められる脳領域の発達遅滞やシナプス形成の異常などが原因であると考えられている (35)。一方、DS 胎児は頭蓋骨が小さく、大脳皮質や海馬領域の容積が小さくなっており (14, 15, 36)、シナプスの形成異常や神経細胞数および密度の減少、大脳皮質層構造の異常などが現れることから (11, 37)、DS 患者は胎生期においてすでに脳発達遅滞を引き起こしていると考えられている。そのため、DS における知的障害発症には、この胎生期における脳発達遅滞が原因であると推察されているが、これらの関係性を示唆する証拠は未だ提示されていない。

胎生期と成体期の異常表現型の関係性の解明には、胎生期から成体期までの病態について観察でき、比較的容易に遺伝子改変が可能な DS モデルマウスを用いた研究が非常に有用である。中でも Ts1Cje マウスは、DS 患者に現れる身体的特徴である特徴的顔貌を反映するような頭蓋骨の形成異常を呈するほか、一部で胎生期に心室中隔欠損が生じることや小脳容積が小さいなど DS 患者の特徴を多数有している (23, 38, 39)。また、本モデルマウスは、脳室の拡大、活性酸素量の増大、脂質過酸化の亢進、モノアミンの代謝異常など、脳機能や構造の異常に関する報告が多数あり、これらの異常が DS における知的障害の一因となっていると考えられている (32, 40, 41)。それゆえ、DS 様症状を模倣している本マウスにおける脳異常表現型の解明は、DS の知的障害に対する新たな治療法の確立につながることを期待できる。

そこで本章では、Ts1Cje マウスにおける脳発達遅滞に関連する分子を同定するために、大脳皮質領域において神経新生が減少していることが報告されている胎生 14.5 日目 (E14.5) の脳においてトランスクリプトーム解析を行い、得られた遺伝子発現データを基に Ts1Cje マウス胎生期脳における遺伝子発現変動について検討した。また、トランスクリプトーム解析によって判明した炎症関連遺伝子の発現増加について、新たなモデルマウスを作製し、その遺伝子産物の発現を解析することによって、原因となるトリソミー領域上に存在する遺伝子の同定を試みた。

## 1-2. 実験方法

### 1-2-1. 実験動物

すべての動物実験は、京都薬科大学の動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。DS モデルマウスとして、Ts1Cje マウス、Ts1Rhr マウス (stock No. 005383, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) および Ts2Cje マウス (stock No. 004850, Jackson Laboratory) を使用した。動物は 25°C の恒温において飼育し、水や餌は自由に摂取させた。照明は 12 時間サイクルとした。(8:00~20:00 : 照明あり、20:00~8:00 : 照明なし)。各 DS モデルマウス雄性マウスと C57BL/6J (OrientalBioService, Kyoto, Japan) の雌性マウスを交配して系統を維持し実験に用いた。Ts1Cje-Ets<sup>+/+</sup> マウスは山川和弘教授 (名古屋市立大学) より Ets2<sup>+/+</sup> マウスをご供与いただき Ts1Cje の雄性マウスと交配することで作製した。Ts1Cje-Erg<sup>+/mld2</sup> マウスは Warren S. Alexander 教授 (Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research) より Erg<sup>mld2/+</sup> マウスをご供与いただき Ts1Cje の雄性マウスと交配することで作製した。マウス胚は、DS モデルの雄性マウスと C57BL/6J (OrientalBioService) または同系統の野生型 (WT) の雌性マウスを交配することで得た。臍栓を確認した時点を E0.5 とし、実験に使用した胎生期脳はすべて E14.5 に摘出した。DS モデルマウスは正倍数体の同腹仔 (WT マウス) と比較した。

### 1-2-2. DNA マイクロアレイ

DNA マイクロアレイを用いてトランスクリプトーム解析を行なった。3 匹の妊娠マウスから各 1 対ずつ、同腹仔 (WT および Ts1Cje マウス) を摘出し解析に利用した。解剖後すぐに凍結保存した E14.5 胎生期脳組織を RNAiso (Takara Bio, Siga, Japan) 溶液中でダウンス型ホモジナイザーを用いて破碎し、本製品で指示された方法に従って総 RNA を抽出したのち、さらに deoxyribonuclease I (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いて本製品で指示された方法に従い 37°C、15 分間処置した。Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を使用して RNA の逆転写を行い、100 ng の総 RNA から Cy3 標識 cRNA を合成した。合成した cRNA を断片化したのち、約 3 万種の遺伝子の発現を解析することのできる SurePrint G3 Mouse GE マイクロアレイ 8×60K (Agilent Technologies) にハイブリダイゼーションし、Agilent G2565CA Microarray Scanner System (Agilent Technologies) を用いてスキャンした。スキャンした画像データをもとに、Feature Extraction ソフトウェア 8.5.1 (Agilent Technologies) を用いて画像の蛍光強度を定量化したのち、測定値をバックグラウンドレベルに合わせて補正し、数値化データを算出した。マイクロアレイ解析の生データは、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) の公開リポジトリである Gene Expression Omnibus (GEO) に寄託した (accession no. GSE121449)。

### 1-2-3. アノテーション解析

Ts1Cje マウスの胎生期脳において発現変動がみられた遺伝子産物に対する Functional Annotation Clustering 解析は、網羅的発現変動解析結果の Clustering 解析において最も広く用いられている解析ソフトである DAVID v.6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用いて行った (42)。WT マウスと比較して Ts1Cje マウスで差次的に発現した遺伝子の中から DAVID

上で要求される Mouse Genome Informatics (MGI) database を基にした MGI Accession ID の付与されている遺伝子のリストを、DAVID にアップロードし機能解析を行った。

#### 1-2-4. 定量リアルタイム RT-PCR

解剖後すぐに凍結保存した胎生期脳組織を RNAiso (Takara Bio) 溶液中でダウンス型ホモジナイザーを用いて破碎し、本製品で指示された方法に従って総 RNA を抽出した。Random-Primers (Promega, Madison, WI, USA) および ReverTra Ace® (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて反応溶液 20 µL 中に総 RNA 量が 5 µg 相当量になるように調製し逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA サンプルを用いて mRNA 発現量を、LightCycler® Nano システム (Roche Applied Science) を使用して解析した。定量リアルタイム PCR 反応は、SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Bio) および、以下に示すプライマーを用いて行った (Table 1)。各遺伝子の mRNA 発現レベルは 60S acidic ribosomal protein, large, P0 をコードし、内部標準物質として広く用いられている 36B4 遺伝子の mRNA 発現量を対照として相対的に定量した (43)。

**Table 1. Primers used in a quantitative real-time RT-PCR.**

Gene		Sequence	Temperature (°C)		Taq polymerase
			Annealing	Extension	
<i>Stfa1</i>	F	5'-GCTGGAGAAAATATCTTCATTAAGATGGATGTAGGTC-3'	63		SYBR® Premix Ex Taq™
	R	5'-ATTCATGGCTGAATCTCTTCCACTGAGAG-3'			
<i>Stfa2</i>	F	5'-CGTCTTAAGTGGTATTTCCAGTGAAAACGAT-3'	63		SYBR® Premix Ex Taq™
	R	5'-CTCTTTACAATGGGGTTAGGG-3'			
<i>Stfa3</i>	F	5'-CTTACATGAAAGTCTTCAGAGGCC-3'	63	72	SYBR® Premix Ex Taq™
	R	5'-GTCACITTTAGAATTGGCTGCTTACATGG-3'			
<i>S100a8</i>	F	5'-ATGATGACTTTATTTCTGTAGACATATCCAGG-3'	63		SYBR® Premix Ex Taq™
	R	5'-GTGATAAAAAGTGGGTGTGGCATCT-3'			
<i>S100a9</i>	F	5'-CTTTCTTCATAAAGGTTGCCAACTGT-3'	63		SYBR® Premix Ex Taq™
	R	5'-CGACACCTCCATCAATACTCTAGG-3'			
<i>Ly6c1</i>	F	5'-CGTGAAGTGTGCCACCAGC-3'	63		SYBR® Premix Ex Taq™
	R	5'-CGAACGGGAGACCATAATCCT-3'			
<i>36B4</i>	F	5'-GACCTCACTGAGATTCGGGATA-3'	63		SYBR® Premix Ex Taq™
	R	5'-GGTCCTAGACCAGTGTCTGAGC-3'			

#### 1-2-5. ウェスタンブロッティング

-80°Cにて凍結した E14.5 の WT および Ts1Cje マウスの脳からタンパク質を、protease inhibitor cocktail tablet (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) および phosphatase inhibitor cocktail (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) を含む冷 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40 Substitute, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)) 中でポッター型ホモジナイザーを用いて氷冷しながら抽出した。得られたホモジネートは 14000 rpm、4°Cで 30 分間遠心し、タンパク質抽出液として上清を回収した。タンパク質濃度は Bradford 法により定量した (44)。25 µg の胎生期脳タンパク質は、15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis にて分離後、ニトロセルロース膜にセミドライ式転写装置を用いて電氣的に転写した。ニトロセルロース膜は、ブロッキング溶液 (3% skim milk 含有 TBS-T (0.05% Tween-20 を含むトリス緩衝生理食塩水)) 中で室温にて 1 時間インキュベートした。一次抗体として、抗マウス S100 calcium-binding protein A9 (S100a9) ポリクローナル抗体 (catalog No. AF2065, 1:2000; Research&Diagnostic Systems, Minneapolis, MN, USA) および抗 β-actin モノクローナル抗体 (catalog No. A5441, 1:5000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用し 4°Cで一晩反応させ、翌日二次抗体として、各々 horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヒツジ IgG 抗体または

HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (1:10000) を使用して目的のタンパク質を検出した。発色には、Chemi-lumi One Super (Nacalai tesque) を使用し、LAS-3000 mini image analysis system (ver. 2.21, FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いてバンドを検出した。バンド強度は、Image J (ver. 1.52k, National Institute of Health; NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて定量した。

#### 1-2-6. フローサイトメトリー

E14.5 の WT および Ts1Cje マウス胎生期脳を摘出し、2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 含有 phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄した後、0.2 mg/mL collagenase type IV (Sigma-Aldrich) 含有 Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (FUJIFILM Wako Recruitment, Osaka, Japan) で満たしたチューブに摘出脳を移し、細断後 37°C で 30 分間インキュベートすることで脳細胞懸濁液とした。脳細胞懸濁液は、BD Falcon Cell Strainer, 70  $\mu$ m (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いてろ過し、洗浄バッファー (0.5% ウシ血清アルブミン (BSA) および 2 mM EDTA を含む PBS) で洗浄後、1% マウス血清 (Sigma-Aldrich) および 1% ラット血清 (Sigma-Aldrich) を含んだ洗浄バッファー中で Table 2 に示す抗体と反応させた。各抗体の希釈倍率は、CD45; 1:200、CD11b; 1:400、F4/80; 1:400、Ly6G; 1:200、Ly6C; 1:200 とした。死細胞の検出には 7-amino-actinomycin D (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を使用した。細胞表面の蛍光強度を BD LSRFortessa™ Flow Cytometer (BD Biosciences) を用いて測定し、Kaluza ソフトウェアプログラム (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて解析した。

**Table 2. Antibodies used in flow cytometry experiments.**

Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* **2020**, 30, 75-91, Supplementary Table S5.

Antigen	Antibody clone	Fluorochrome <sup>a)</sup>	Catalog No.	Company <sup>b)</sup>
CD45	30-F11	APC-Cy7	557659	BD Biosci.
CD11b	M1/70	PE-Cy7	25-0112-81	eBioscience
F4/80	BM8	APC	123116	Biolegend
Ly6G	1A8	FITC	127605	Biolegend
Ly6C	HK1.4	Pacific Blue	128014	Biolegend

a) APC, Allophycocyanin; Cy7, indotricarbocyanine; PE, Phycoerythrin; FITC, Fluorescein isothiocyanate

b) BD, Becton-Dickin

#### 1-2-7. 免疫組織化学染色法

E14.5 マウス脳の冠状切片を、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有 PBST (0.3% Triton X-100 含有 PBS) 中で 15 分間、室温でインキュベートし、ブロッキング溶液 (0.2% BSA 含有 PBST)、Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) の avidin-blocking solution および biotin-blocking solution (1 drop/PBST 500  $\mu$ L) を用いて室温にて各 15 分間ブロッキングを行った。次いで、ビオチン標識ラット抗マウス F4/80 抗体 (catalog No. MCA497BT, 1:200; AbD Serotec, Raleigh, NC, USA) と一晩 4°C でインキュベートした。F4/80 の免疫反応性は TSA Biotin System (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) を用いて本製品で指示された方法に従って行い、切片を streptavidin HRP

(1:100; PerkinElmer) と 30 分間、次いで streptoavidin-Cy3 (1:500; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) と 2 時間反させることでシグナルを増幅した。細胞核は 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (1:800; Nacalai tesque) にて染色した。切片画像は、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM800 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用して取得した。細胞の密度 (cells/mm<sup>2</sup>) は、Image J (ver. 1.52k, NIH) を使用して、胎生期脳切片の面積を測定し、ISODATA 法を基に決定されたしきい値をもって識別された F4/80 陽性細胞の数を計数することで求めた。細胞形態の指標としての真円度は、識別された脳実質中の F4/80 陽性細胞の中からランダムに 100 個を抽出し、Image J (ver. 1.52k, NIH) を使用して各細胞の円形度を計測し、その平均を求めた (45)。

#### 1-2-8. 統計解析

3 群以上の比較における統計学的解析は分散分析法 (analysis of variance; ANOVA) を用い、検定には最小有意差検定を用いた。2 群間の平均値の比較には Student の *t* 検定を用いた。統計解析ソフトは StatMate5 ver. 5.01 (ATMS, Chiba, Japan) を使用した。得られた実験値は全て、平均値±標準誤差 (standard error of the mean; SEM) で表示した。危険率 5%以下両側を統計学的に有意差ありと判定した。

### 1-3. 実験結果

#### 1-3-1. DS モデルマウス Ts1Cje 胎生期脳における遺伝子発現解析

DS モデルマウスにおける脳発達遅滞の関連分子を同定するために、Ts1Cje マウス胎生期脳における発現変動遺伝子をマイクロアレイにより解析した。解析対象として、神経新生に富み、Ts1Cje マウスにおいて大脳皮質神経新生の減少が報告されている E14.5 の脳を用いた。その結果、61 遺伝子の転写産物（うち 21 遺伝子は DS トリソミー領域に含まれる遺伝子）の発現は WT マウスと Ts1Cje マウス間で有意に異なっていた（発現量比が 1.5 倍より大きいまたは 0.5 倍未満かつ  $p < 0.05$ ）(Tables 3, 4)。Ts1Cje マウスのトリソミー領域内遺伝子の発現量の変動を Figure 2 に示した。全トリソミー遺伝子の内、少なくとも 3 分の 1 以上の遺伝子については mRNA 発現が 1.5 倍以上に増加しており、そのほかの大多数の遺伝子も mRNA 発現量が遺伝子量依存的に増加していた。しかし、*melanocortin 2 receptor accessory protein (Mrap)*、*potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, member 1 (Kcne1)*、*potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6 (Kcnj6)*、*Kcnj15*、*Integrin beta-2-like (Itgb2l)*、*FAM3 metabolism regulating signaling molecule B (Fam3b)*、*myxovirus (influenza virus) resistance 1 (Mx1)* および *transmembrane serine protease 2 (Tmprss2)* の mRNA 発現は E14.5 マウス脳において検出されず、加えて、Ts1Cje マウス脳における *SR-related CTD-associated factor 4 (Scaf4)*、*oligodendrocyte transcription factor 2 (Olig2)* および *claudin-14 (Cldn14)* の mRNA 発現レベルは WT マウスと同程度であった。

トリソミー領域外の遺伝子に関しては、33 個の常染色体上の遺伝子と 3 個の X 染色体上の遺伝子の mRNA 発現が変動していた。これらのマイクロアレイにおける発現変動の結果を確かめるために、いくつかの発現変動遺伝子の遺伝子産物発現レベルを定量リアルタイム RT-PCR によって確認した (Figure 3A)。その結果、E14.5 の Ts1Cje マウス脳において、炎症関連遺伝子 *S100a8*、*S100a9*、*lymphocyte antigen 6C1 (Ly6c1)*、*Stefin-1 (Stfa1)*、*Stfa2* および *Stfa3* の mRNA 発現量について、WT マウスに比し数倍～十数倍の増加が認められマイクロアレイによって得られた結果と同様であった (*S100a8*:  $t(8) = 5.69, p = 4.6E-4$ 、*S100a9*:  $t(8) = 3.98, p = 0.0041$ 、*Ly6c1*:  $t(8) = 3.43, p = 8.9E-04$ 、*Stfa1*:  $t(8) = 5.15, p = 8.7E-4$ 、*Stfa2*:  $t(8) = 5.24, p = 7.8E-4$ 、*Stfa3*:  $t(8) = 5.05, p = 9.9E-4$ )。また、*S100a9* については、WT マウスと比較し Ts1Cje マウス胎生期脳において、タンパク質レベルで約 8 倍増加していることをウェスタンブロット法により明らかにした (*S100a8*、*Stfa1*、*Stfa2*、*Stfa3* および *Ly6c1* に対するウェスタンブロット可能な抗体は市販されておらず未検討) ( $t(10) = 3.38, p = 0.0096$ ) (Figure 3B, C)。



**Table 3. The upregulated transcripts in embryonic Ts1Cje brain at E14.5.**

Values are expressed as fold change compared to the WT value. Genes were selected based on a *p* value threshold of 0.05 and a minimum fold-change absolute value of 1.5 (n = 3 in each group). Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* 2020, 30, 75-91, Supplementary Table S1.

Gene Symbol	Gene Name	Probe_Name (Agilent)	Fold Change	<i>p</i> -value	Copy number
<i>Dnahc11</i>	<i>dynein, axonemal, heavy chain 11</i>	A_55_P2119907	342.55	0.00002	1
<i>BC100530</i>	<i>cDNA sequence BC100530</i>	A_52_P487686	11.34	0.034	2
<i>S100a8</i>	<i>S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)</i>	A_51_P256827	10.15	0.032	2
<i>Stfa1</i>	<i>stefin A1</i>	A_55_P1963017	10	0.028	2
<i>S100a9</i>	<i>S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)</i>	A_55_P1998471	9.67	0.033	2
<i>Stfa3</i>	<i>stefin A3</i>	A_51_P504815	7.3	0.01	2
<i>Stfa2</i>	<i>stefin A2</i>	A_66_P139618	4.78	0.029	2
<i>Mpo</i>	<i>myeloperoxidase</i>	A_55_P1995537	3.91	0.03	2
<i>Camp</i>	<i>cathelicidin antimicrobial peptide</i>	A_55_P2039699	2.96	0.018	2
<i>Ifi2712a</i>	<i>interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A</i>	A_52_P90363	2.84	0.0011	2
<i>Ly6c1</i>	<i>lymphocyte antigen 6 complex, locus C1</i>	A_55_P2064771	2.13	0.011	2
<i>Anxa1</i>	<i>annexin A1</i>	A_55_P2092826	2.11	0.002	2
<i>Ifi2711</i>	<i>interferon, alpha-inducible protein 27 like 1</i>	A_52_P86693	1.87	0.02	2
<i>Bace2</i>	<i>beta-site APP-cleaving enzyme 2</i>	A_55_P2157033	1.87	0.0031	3
<i>B230307C23</i>	<i>RIKEN cDNA B230307C23 gene Gene</i>	A_55_P2032302	1.86	0.019	3
<i>9330102E08Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 9330102E08 gene</i>	A_55_P2199717	1.82	0.019	2
<i>Lyz2</i>	<i>lysozyme 2</i>	A_51_P321150	1.81	0.0003	2
<i>Samd9l</i>	<i>sterile alpha motif domain containing 9-like</i>	A_66_P121787	1.8	0.034	2
<i>Madcam1</i>	<i>mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1</i>	A_55_P2020326	1.74	0.00008	2
<i>Tmem50b</i>	<i>transmembrane protein 50B</i>	A_51_P510849	1.73	0.034	3
<i>A930006K02Rik</i>	<i>RIKEN cDNA A930006K02 gene</i>	A_55_P2206461	1.72	0.0042	3
<i>Cbr3</i>	<i>carbonyl reductase 3</i>	A_51_P481159	1.68	0.012	3
<i>Ppbbp</i>	<i>pro-platelet basic protein</i>	A_51_P428372	1.65	0.0006	2
<i>Sod1</i>	<i>superoxide dismutase 1, soluble</i>	A_55_P2177539	1.65	0.0006	3 <sup>1*</sup>
<i>Lyz1</i>	<i>lysozyme 1</i>	A_55_P2181738	1.63	0.01	2
<i>Gm8566</i>	<i>Sod1 pseudogene</i>	A_55_P2025283	1.63	0.0004	2
<i>Vwf</i>	<i>Von Willebrand factor homolog</i>	A_51_P103397	1.63	0.047	2
<i>Rhox5</i>	<i>reproductive homeobox 5</i>	A_51_P376445	1.62	0.032	1 (X) <sup>2*</sup>
<i>Chaf1b</i>	<i>chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)</i>	A_51_P367310	1.62	0.026	3
		A_55_P2085181	1.57	0.0078	
<i>Gimap4</i>	<i>GTPase, IMAP family member 4</i>	A_55_P2147831	1.6	0.031	2
<i>Dopey2</i>	<i>dopey family member 2</i>	A_51_P481238	1.57	0.0072	3
<i>Donson</i>	<i>downstream neighbor of SON</i>	A_55_P1981739	1.57	0.0056	3
<i>Pcp4</i>	<i>Purkinje cell protein 4</i>	A_51_P253984	1.56	0.042	3
<i>Ifnar2</i>	<i>interferon (alpha and beta) receptor 2</i>	A_52_P190405	1.56	0.01	3
<i>Psmg1</i>	<i>proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 1</i>	A_66_P134728	1.56	0.011	3
		A_55_P2091671	1.51	0.009	
<i>Itsn1</i>	<i>intersectin 1 (SH3 domain protein 1A)</i>	A_52_P396498	1.54	0.0015	3
<i>Gcfc1</i>	<i>GC-rich sequence DNA-binding factor 1</i>	A_52_P478745	1.54	0.0067	3
<i>Setd4</i>	<i>SET domain containing 4</i>	A_55_P2052425	1.54	0.002	3
<i>Tic3</i>	<i>tetratricopeptide repeat domain 3</i>	A_66_P106065	1.53	0.0029	3
<i>Mall</i>	<i>mal, T-cell differentiation protein-like</i>	A_55_P2057459	1.53	0.041	2
<i>Gcgr</i>	<i>glucagon receptor</i>	A_55_P2056995	1.53	0.031	2
<i>Gja5</i>	<i>gap junction protein, alpha 5</i>	A_52_P525317	1.53	0.032	2
<i>Mfap5</i>	<i>microfibrillar associated protein 5</i>	A_55_P2062777	1.52	0.026	2
<i>Brwd1</i>	<i>bromodomain and WD repeat domain containing 1</i>	A_51_P181538	1.52	0.0054	3
<i>4930520P13Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4930520P13 gene</i>	A_66_P130348	1.52	0.03	2
<i>Sh2d7</i>	<i>SH2 domain containing 7</i>	A_55_P2135516	1.52	0.0026	2
<i>Ehd2</i>	<i>EH-domain containing 2</i>	A_55_P2076906	1.51	0.031	2
<i>Mrps6</i>	<i>mitochondrial ribosomal protein S6</i>	A_52_P58257	1.51	0.0042	3
<i>Ifngr2</i>	<i>interferon gamma receptor 2</i>	A_52_P471395	1.51	0.034	3
<i>Ifnar1</i>	<i>interferon (alpha and beta) receptor 1</i>	A_55_P2454784	1.51	0.032	3
<i>1110004E09Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 1110004E09 gene</i>	A_51_P196395	1.5	0.0018	3
<i>BC022960</i>	<i>cDNA sequence BC022960</i>	A_55_P2032633	1.5	0.016	1 (X)

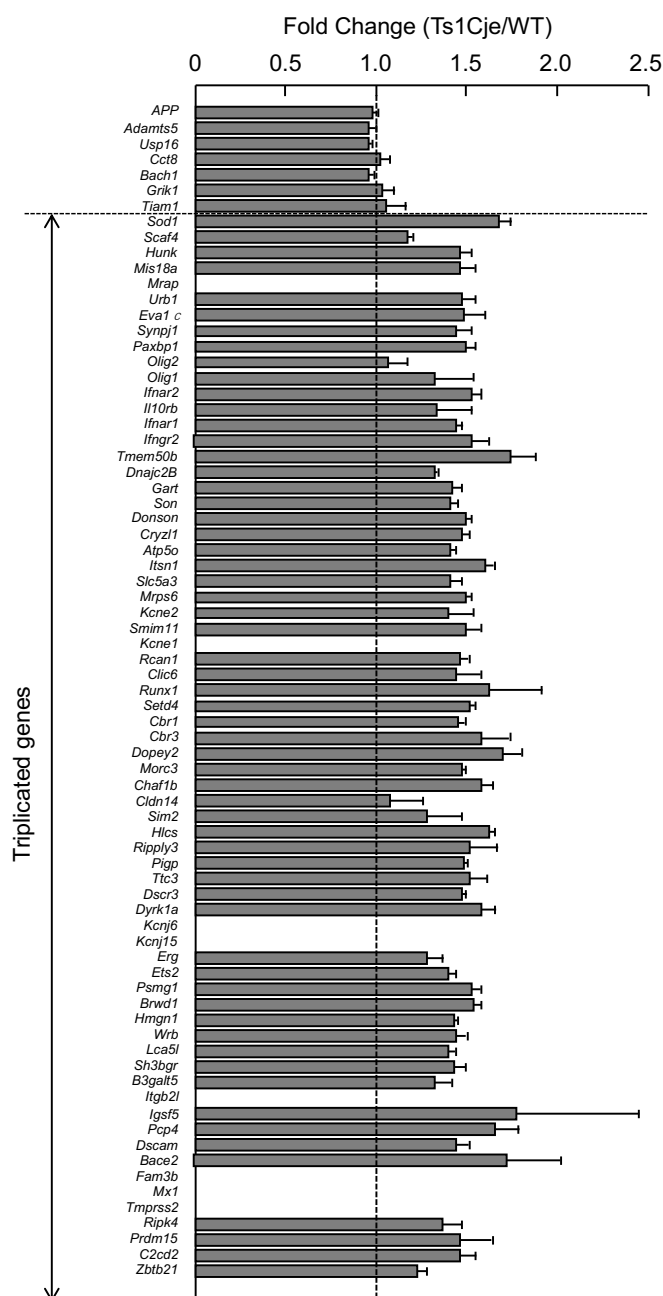
1\* *Sod1* is inactivated by insertion of neomycin cassette.

2\* "1 (X)" means a gene coded on X-chromosome.

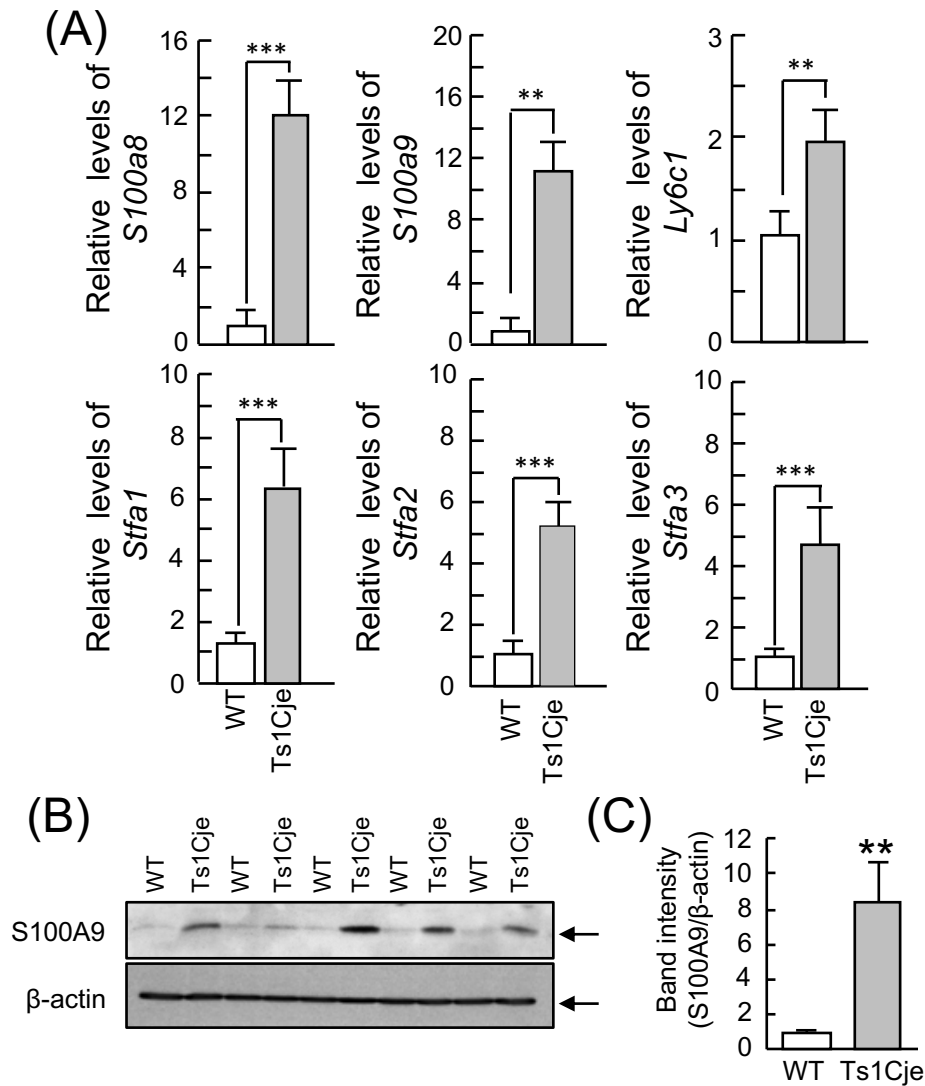
**Table 4. The downregulated transcripts in embryonic Ts1Cje brain at E14.5.**

Values are expressed as fold change compared to the WT value. Genes were selected based on a *p* value threshold of 0.05 and a minimum fold-change absolute value of 1.5 (n = 3 in each group). Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* 2020, 30, 75-91, Supplementary Table S2.

Gene Symbol	Gene Name	Probe_Name (Agilent)	Fold Change	<i>p</i> -value	Copy number
<i>Tbx1</i>	<i>T-box 1</i>	A_55_P2051716	0.43	0.0015	2
<i>Itgb8</i>	<i>integrin beta 8</i>	A_55_P1998244	0.45	0.0012	1
<i>Slc15a2</i>	<i>solute carrier family 15 (H<sup>+</sup>/peptide transporter), member 2</i>	A_51_P267278	0.47	0.0036	2
<i>Gng4</i>	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4</i>	A_52_P586821	0.53	0.014	2
<i>Sp8</i>	<i>trans-acting transcription factor 8</i>	A_66_P138898	0.56	0.014	1
<i>Armxc4</i>	<i>armadillo repeat containing, X-linked 4</i>	A_55_P2377645	0.61	0.034	1 (X)
<i>Npnt</i>	<i>nephronectin</i>	A_55_P1993549	0.61	0.045	2
<i>Sp4</i>	<i>trans-acting transcription factor 4</i>	A_55_P2368625	0.66	0.017	1
<i>Arpp21</i>	<i>cAMP-regulated phosphoprotein 21</i>	A_52_P38208	0.66	0.049	2



**Figure 2. The gene dose-dependent overexpression of genes in the trisomic region of the brain of Ts1Cje embryos.** Genes are arranged from the proximal end (top) to the distal end (bottom) of the MMU16 according to the mapping data of the NCBI Mouse Genome Resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>). The region marked by the arrows is the triplicated segment in Ts1Cje. Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* 2020, 30, 75-91, Figure 1.



**Figure 3. The increased expression of inflammatory-related genes in Ts1Cje mice.**

(A) The mRNA levels, which are annotated in the microarray analysis, were validated by a quantitative real-time RT-PCR. The expression of *36B4* mRNA was used as an internal control. Each value represents the mean ratio  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined with Student's *t*-test ( $n = 5$  in each genotype, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). (B) The expression levels of S100A9 and  $\beta$ -actin (internal control) proteins were detected by Western blotting. (C) The intensity of bands in B was quantified using the NIH Image J software program with a gel analysis macro. The level of S100A9 protein in the fetal brain of Ts1Cje mice was significantly increased on E14.5. Each value represents the mean ratio  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined using Student's *t*-test ( $n = 5$  in each genotype, \*\*  $p < 0.01$ ). Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* **2020**, 30, 75-91, Figure 2.

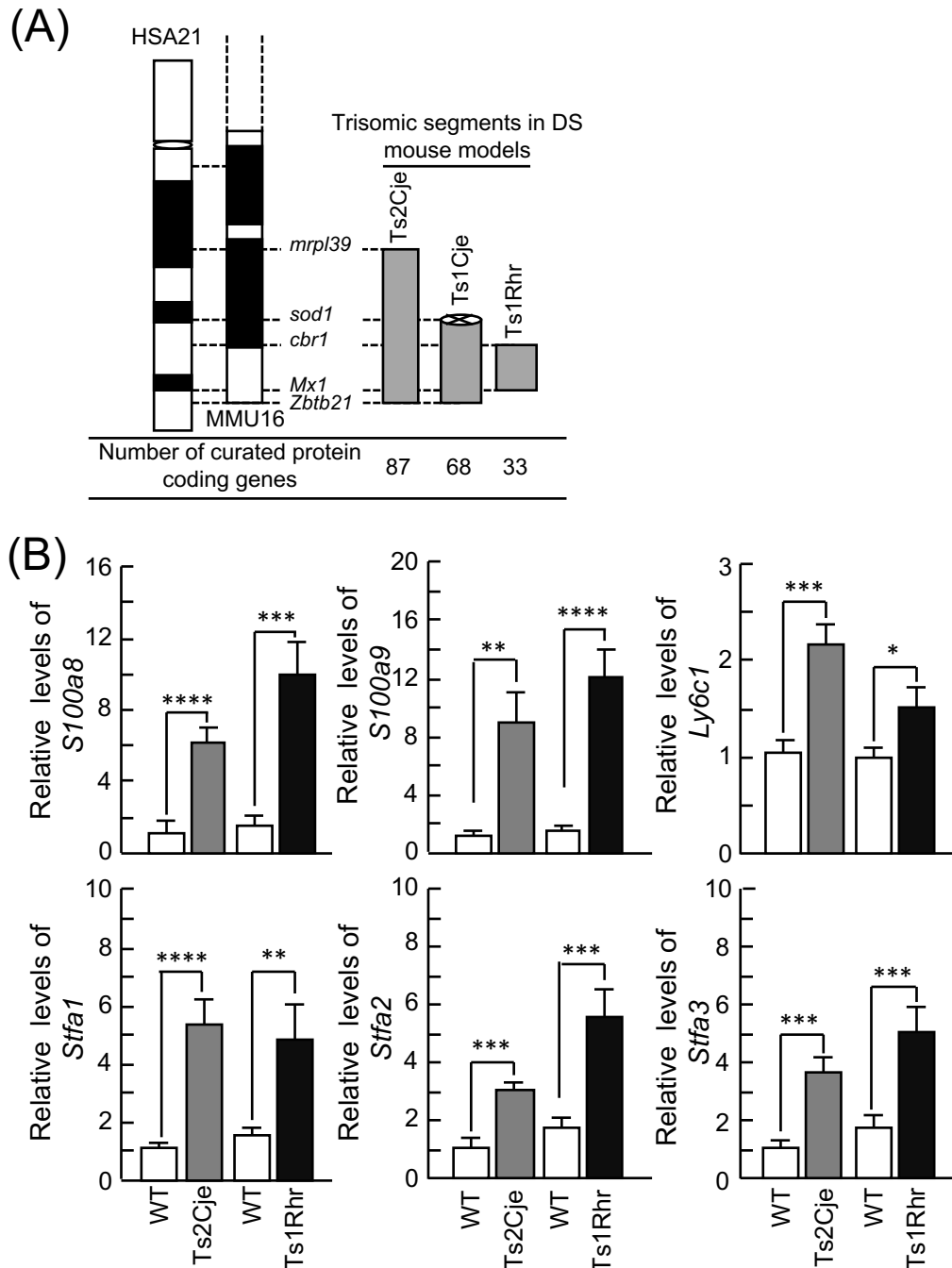
マイクロアレイにより検出した発現変動遺伝子群を機能的特徴により分類するために、遺伝子オントロジーをベースとしたデータベースである DAVID を用いた Functional Annotation Clustering 解析を行った。その結果、“Antimicrobial”、“Thiol protease inhibitor”、“Calcium”、“Bacteriolytic enzyme”、“Secreted”、“Disulfide bond”、“Protease inhibitor”、“Antioxidant”、“Signal”、“Inflammatory response”、“Endosome” および “Cell adhesion” といった機能に関する遺伝子クラスターが Ts1Cje マウス胎生期脳における発現変動遺伝子群から有意差をもって検出された (Table 5)。

**Table 5. The enriched functional annotation terms associated with differentially expressed genes. Ishihara et al., Brain Pathol. 2020, 30, 75-91, Supplementary Table S6.**

Term	Genes	List Total	Pop Hits	Pop Total	Fold Enrichment	p-Value	Bonferroni	Benjamini	FDR
Antimicrobial	<i>Lyz2, S100a8, S100a9, Camp, Lyz1</i>	54	119	22680	17.6	1.73E-04	0.02	0.02	0.2
Thiol protease inhibitor	<i>Sf1a3, Sf1a2, Sf1a1</i>	54	25	22680	50.4	0.0016	0.164	0.085	1.75
Calcium	<i>Pcp4, Ehd2, Anxa1, Itsn1, Mpo, S100a8, S100a9, Npnt</i>	54	827	22680	4.1	0.003	0.291	0.11	3.35
Bacteriolytic enzyme	<i>Lyz2, Lyz1</i>	54	2	22680	420	0.0047	0.416	0.13	5.19
Secreted	<i>Mfap5, Lyz2, Ifnar2, Anxa1, Pp1b, S100a8, S100a9, Npnt, Camp, Vwf, Lyz1</i>	54	1685	22680	2.7	0.0051	0.445	0.11	5.67
Disulfide bond	<i>Ly6c1, Mfap5, Lyz2, Gcgr, Anxa1, Mpo, Bace2, Camp, Ifnar1, Ifnar2, Madcam1, Npnt, Vwf, Lyz1</i>	54	3124	22680	1.9	0.025	0.946	0.39	25.15
Protease inhibitor	<i>Sf1a3, Sf1a2, Sf1a1</i>	54	121	22680	10.4	0.033	0.978	0.42	31.44
Antioxidant	<i>S100a8, S100a9</i>	54	15	22680	56	0.034	0.982	0.4	32.96
Signal	<i>Ly6c1, Mfap5, Lyz2, Gcgr, Mpo, Bace2, Camp, Itgb8, Ifnar1, Ifnar2, MGI:107654, Pp1b, Madcam1, Ifi2712a, Npnt, Vwf, Lyz1</i>	54	4543	22680	1.6	0.052	0.998	0.49	45.32
Inflammatory response	<i>Anxa1, S100a8, S100a9</i>	54	161	22680	7.8	0.055	0.998	0.48	47.2
Endosome	<i>Ifnar1, Ehd2, Anxa1, Bace2</i>	54	443	22680	3.8	0.085	1	0.6	63.58
Cell adhesion	<i>Madcam1, Npnt, Vwf, Itgb8</i>	54	459	22680	3.7	0.092	1	0.6	66.7

### 1-3-2. 複数の DS モデルマウス胎生期脳における炎症関連遺伝子の発現増加

マイクロアレイ解析により検出した炎症関連遺伝子群の mRNA 発現量の増加について他の DS モデルマウスでも検証した。各々約 90 および約 30 遺伝子を含むトリソミー領域をもつ Ts2Cje マウス (21) および Ts1Rhr マウス (24) の胎生期脳での *S100a8*, *S100a9*, *Ly6c1*, *Sf1a1*, *Sf1a2* および *Sf1a3* の mRNA 発現量について定量リアルタイム RT-PCR 法により定量した (Figure 4A)。その結果、解析した全ての mRNA 発現量が Ts1Cje マウスでの検討結果と同様、両モデルマウスにおいて有意に増加していた (WT vs. Ts2Cje *S100a8*:  $t(15) = 5.83, p = 3.3E-5$ , *S100a9*:  $t(15) = 3.94, p = 0.0013$ , *Ly6c1*:  $t(15) = 4.85, p = 2.1E-04$ , *Sf1a1*:  $t(15) = 5.68, p = 4.4E-5$ , *Sf1a2*:  $t(15) = 4.72, p = 2.7E-4$ , *Sf1a3*:  $t(15) = 4.84, p = 2.2E-4$ )、(WT vs. Ts1Rhr *S100a8*:  $t(18) = 4.17, p = 5.8E-4$ , *S100a9*:  $t(18) = 5.35, p = 4.4E-5$ , *Ly6c1*:  $t(18) = 2.28, p = 0.034$ , *Sf1a1*:  $t(18) = 3.44, p = 0.0029$ , *Sf1a2*:  $t(18) = 4.34, p = 3.9E-4$ , *Sf1a3*:  $t(18) = 3.94, p = 9.6E-4$ )。 (Figure 4B)。

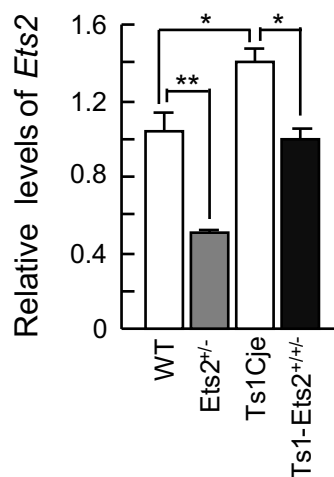


**Figure 4. The increased expression of inflammation/immunity-related genes in other mouse models of DS, Ts2Cje and Ts1Rhr mice.**

(A) Trisomic segments of DS mouse models, Ts2Cje, Ts1Cje and Ts1Rhr mice harboring partial trisomy 16 are indicated. The trisomic segment of Ts2Cje mice is equal to that of Ts65Dn mice. The number of curated protein coding genes is based on the GenBank and SwissProt databases. (B) The expression levels of genes related to inflammation and immunity, which are annotated in Figure 3A, in the embryonic brain from Ts2Cje and Ts1Rhr mice were quantified by a quantitative real-time RT-PCR. Increased mRNA levels for inflammation/immunity-related genes, *S100a8*, *S100a9*, *Ly6c1*, *Sffa1*, *Sffa2* and *Sffa3* were conserved in both lines. The expression of *36B4* mRNA was used as internal control. Each value represents the mean ratio  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined using Student's *t*-test (WT for Ts2Cje [n = 10], Ts2Cje [n = 7], WT for Ts1Rhr [n = 12] and Ts1Rhr [n = 8]); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* **2020**, 30, 75-91, Figure 3.

### 1-3-3. 炎症関連遺伝子の発現増加の原因遺伝子の探索

Ts1Rhr マウス胎生期脳においても炎症関連遺伝子群の発現が増加していたことから、炎症関連遺伝子群の発現亢進の原因遺伝子は Ts1Rhr マウスのトリソミー領域の約 30 遺伝子に含まれると考えられる。これら 30 遺伝子のうち、まず ETS 転写因子ファミリーに属する *Ets2* 遺伝子に着目した。これは、*Ets2* が活性化できない変異体を発現するマウスにおいて全身性の炎症が抑制されるとの報告から (46)、*Ets2* の活性化による炎症亢進が推察されたためである。Ts1Cje マウス胎生期脳において観察された炎症遺伝子群の発現亢進に対する *Ets2* 遺伝子の 3 コピー化の役割を調べるために、*Ets2* 遺伝子ヘテロ欠損マウス (*Ets2*<sup>+/-</sup>マウス) と Ts1Cje マウスを交配させることで、*Ets2* 遺伝子のみが正常の 2 コピーとなった Ts1Cje マウス (Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+</sup>) を作出した。この Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+</sup>マウスにおける *Ets* 遺伝子の発現について、定量リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討したところ、Ts1Cje マウスにおいて 1.5 倍程度増加していた *Ets2* mRNA の発現量が Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+</sup>マウスにおいては WT と同程度であった ((*F* (3, 36)=20.39, *p*=5.3E-5)) (Figure 5)。Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+</sup>マウスにおける *Sl100a8*、*Stfal1* および *Ly6c1* の mRNA 発現量を定量リアルタイム RT-PCR 法を用いて検討したところ、検討した全ての mRNA 発現量は *Ets2*<sup>+/-</sup>マウスにおいて WT マウスに比し減少傾向であったが、Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+</sup>マウスにおいては Ts1Cje マウスと同程度であり、WT マウスに比し発現量が多かった (*Sl100a8*: *F* (3, 27)=82.07, *p*=7.4E-7, *Stfal1*: *F* (3, 30)=19.37, *p*=1.7E-4, *Ly6c1*: *F* (3, 30)=12.57, *p*=9.9E-4) (Figure 6A-C)。このことから、*Ets2* 遺伝子以外の Ts1Rhr マウスのトリソミー領域遺伝子が炎症関連遺伝子の発現亢進に関与することが示唆された。

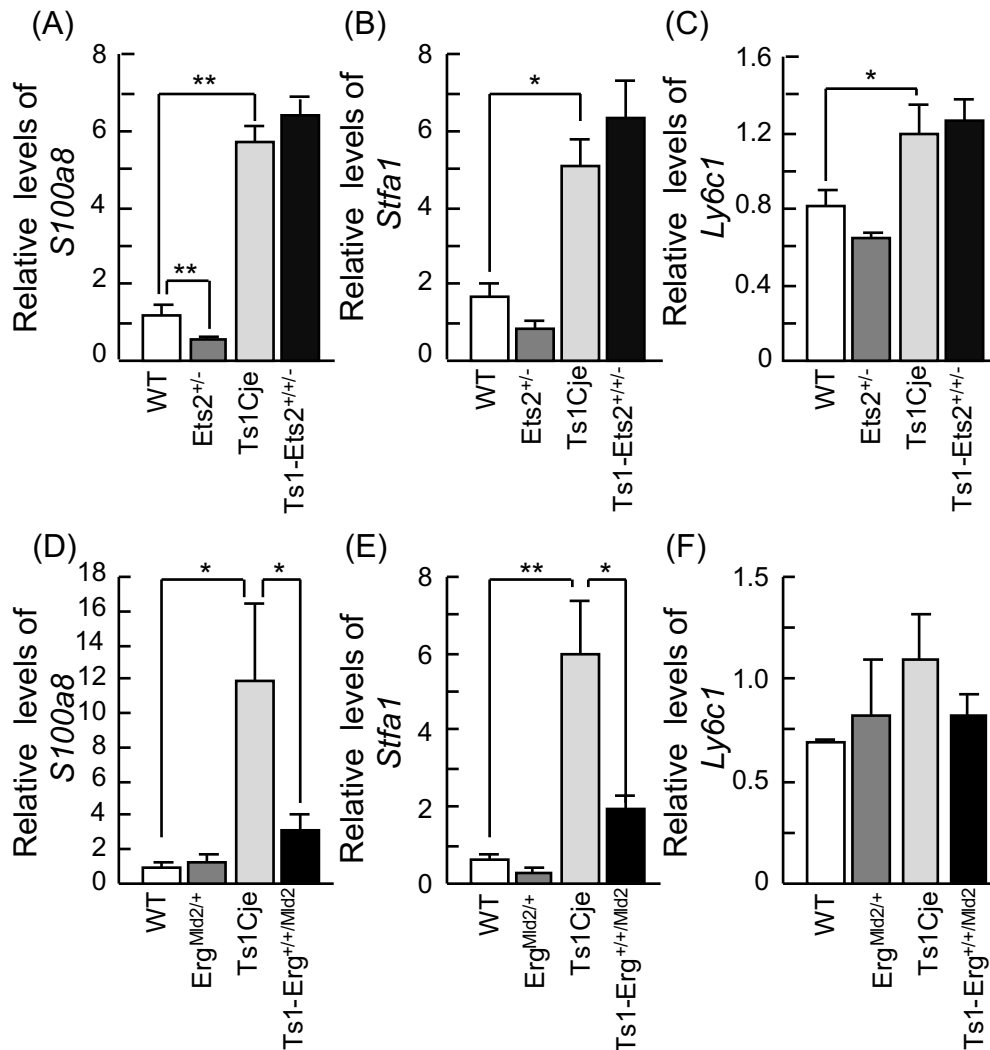


**Figure 5. The expression levels of *Ets2* mRNA in Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+</sup> mice.**

The expression levels of *Ets2* mRNA in embryonic brains from WT, Ts1Cje, *Ets2*<sup>+/-</sup> and Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+</sup> mice were assessed by a quantitative real-time RT-PCR. The expression of *36B4* mRNA was used as internal control. The increased expression of *Ets2* mRNA in Ts1Cje mice was restored to the control level in the Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+</sup> mice. Each value represents the mean ratio  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined by an ANOVA with an LSD post hoc test. (n = 4 in each genotype, \**p* < 0.05 \*\**p* < 0.01). Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* 2020, 30, 75-91, Supplementary Figure S3.

次に、Ts1Rhr マウスのトリソミー領域上に存在し、*Ets2* 遺伝子と同じ ETS ファミリー転写因子である *Erg* 遺伝子に着目した (47)。*Ets2* 遺伝子の検討と同様、Ts1Cje マウス胎生期脳での炎症性遺伝子群の転写産物の発現亢進における *Erg* 遺伝子の役割について、*Erg* 遺伝子のみが正常の 2 コピーとなった Ts1Cje マウスを作出することで検討した。作出には、既に報告されている *Erg* 遺伝子のみが 2 コピーとなった DS モデル Ts65Dn マウスの作出と同じ方法 (48)、すなわち ERG の機能喪失変異体を発現するアレルをヘテロ接合体としてもつ *Erg*<sup>+/mld2</sup> マウス (49) を Ts1Cje マウスと交配することで Ts1Cje-*Erg*<sup>+/mld2</sup> マウスを作出し、解析を行なった。その結果、*Sl100a8* および *Stfal1* 遺伝子の mRNA 発現量は Ts1Cje マウスに比し Ts1Cje-

*Erg*<sup>+/+/*mid2*</sup> マウスにおいて減少していた (*S100a8*:  $F(3, 30) = 6.40, p = 0.011$ , *Stfa1*:  $F(3, 30) = 16.15, p = 3.7E-4$ ) (Figure 6D, E)。一方、*Ly6c1* 遺伝子の mRNA 発現量については、各群間で有意な差はみられなかったが、*S100a8* および *Stfa1* mRNA と同様の傾向にあった ( $F(3, 30) = 1.10, p = 0.39$ ) (Figure 6F)。以上のことから、Ts1Cje マウス胎生期脳における炎症関連遺伝子の発現亢進には、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化が関与していることが明らかとなった。



**Figure 6. The increased expression of inflammation/immunity-related genes in Ts1Cje embryos caused by the triplication of the *Erg* but not *Ets2* gene.**

The *S100a8*, *Stfa1* and *Ly6c1* mRNA levels were assessed by a quantitative real-time RT-PCR. Each mRNA level was normalized with the *36B4* level. The effect of *Ets2* (A–C) or *Erg* (D–F) triplication on the increased expression of these mRNAs was examined using Ts1Cje-*Ets2*<sup>+/+/-</sup> or Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/*mid2*</sup> mice. The data suggest that the triplication of the *Erg* gene causes the upregulation of the inflammation-related genes in the brain of Ts1Cje embryos. Each value represents mean ratio  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined using an ANOVA with a least significant difference (LSD) post hoc test ( $n = 3-4$  in each genotype, respectively, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* **2020**, 30, 75-91, Figure 4.

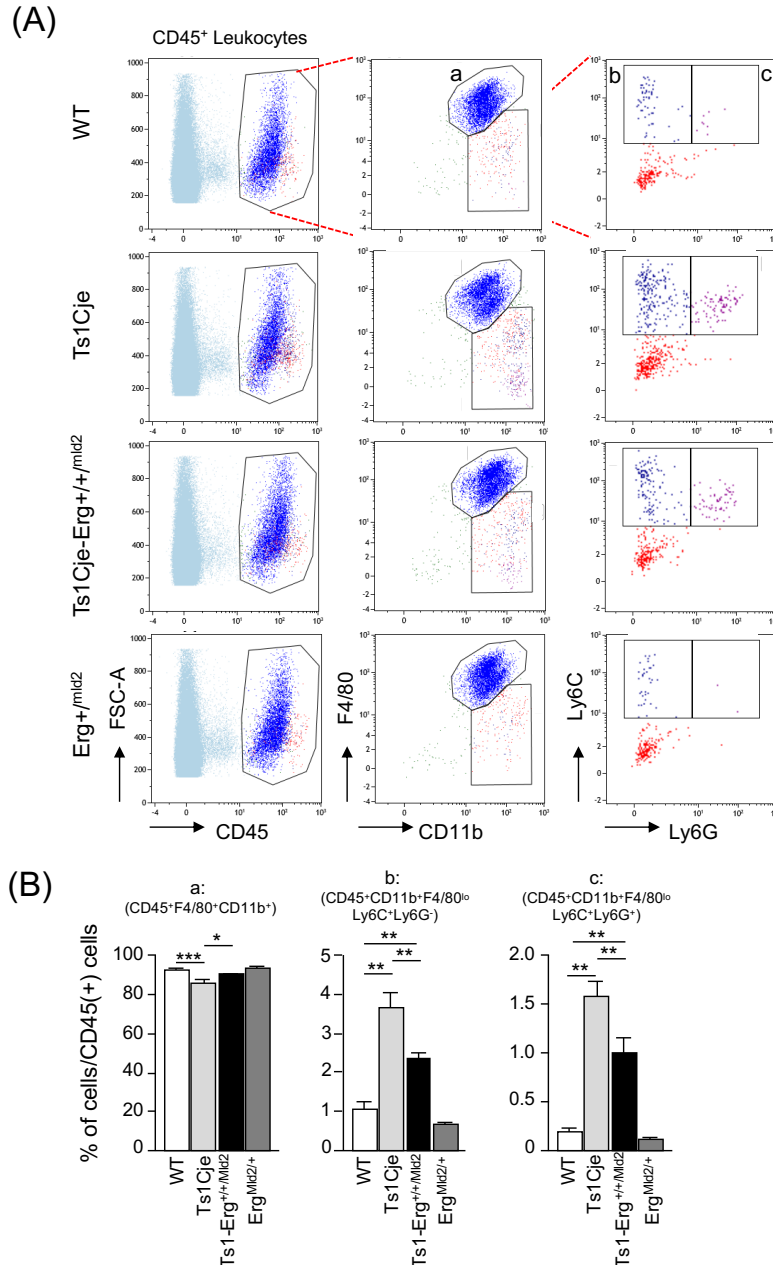
#### 1-3-4. *Erg* 遺伝子の 3 コピー化による Ts1Cje 胎生期脳における炎症性細胞の増加

Ts1Cje マウス胎生期脳において発現が亢進していた炎症関連遺伝子群は、主に単球や好中球などの白血球に高発現しており、これら炎症性細胞のマーカー分子である (50-52)。そこで、Ts1Cje マウスの胎生期脳において炎症性細胞数が増加している可能性を考え、WT、Ts1Cje、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> および *Erg*<sup>+/mld2</sup> マウス胎生期脳における炎症性細胞数をフローサイトメトリーにより定量解析した (Figure 7)。

Ts1Cje マウス胎生期脳における CD45 陽性細胞中の単球 (CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>lo</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, Ly6G<sup>-</sup>; b) および好中球 (CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>lo</sup>, Ly6C<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>; c) の細胞数の割合は WT マウスよりも有意に高かった (Figure 7B)。一方、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスにおいて、これらの細胞数の割合は WT マウスに比し高かったものの、Ts1Cje マウスと比較して有意に低く、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化が Ts1Cje マウスにおける単球および好中球の細胞数の増加に関与していることが示唆された (単球:  $F(3, 51) = 34.22, p = 2.0E-7$ 、好中球:  $F(3, 51) = 43.04, p = 3.7E-8$ )

(Figure 7B)。さらに Ts1Cje マウスにおけるミクログリア、髄膜・血管周囲のマクロファージなどを含む脳内マクロファージ (CD45<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>; a) の CD45 陽性細胞中の細胞数の割合は WT マウスよりも有意に低かったが、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスでは WT マウスと同等であった ( $F(3, 51) = 12.45, p = 1.4E-4$ ) (Figure 7B)。以上の結果から、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化が胎生期脳実質中において、単球および好中球数を増加させるのみならず、脳内マクロファージ数の減少に関与することが示唆された。



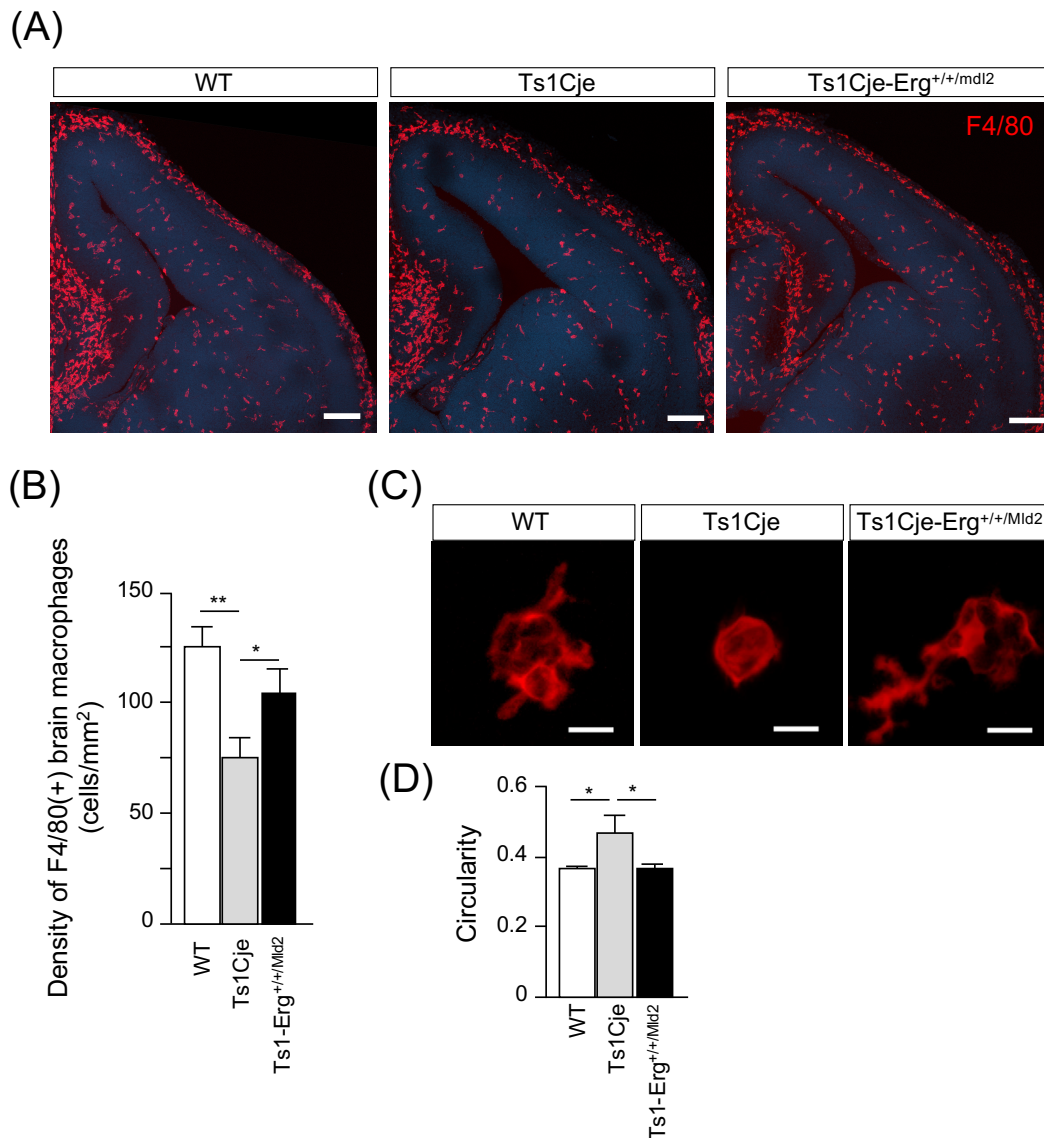


**Figure 7. The ratio of immune cells in the CD45-positive cells of Ts1Cje embryo brain was disturbed by triplication of the *Erg* gene.**

Cells from the whole brain of WT and Ts1Cje embryos at E14.5 were stained with CD45 APC-Cy7, CD11b PE-Cy7, F4/80 APC, Ly6G FITC and Ly6C Pacific Blue antibodies. Dead cells were distinguished by staining with 7-aminoactinomycin D. In Ts1Cje mice, the relative numbers of CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>lo</sup>, Ly6C<sup>int</sup> and Ly6G<sup>+</sup> (neutrophils) and CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>lo</sup>, Ly6C<sup>int</sup> and Ly6G<sup>-</sup> (monocytes) were significantly increased, whereas the decreased relative number of CD45<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> cells (brain macrophages) was detected. (A) Flow cytometry of immune cells in fetal brain from WT, Ts1Cje, Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> and Erg<sup>+/mld2</sup> mice. Leukocytes in the brain were defined by gating on CD45-positive cells (left panels). Brain macrophages were identified as CD45<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> (populations a). Monocytes and neutrophils were identified as CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>lo</sup>, Ly6C<sup>+</sup> and Ly6G<sup>-</sup> (population b) and CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, F4/80<sup>lo</sup>, Ly6C<sup>+</sup> and Ly6G<sup>+</sup> (population c), respectively. (B) The percentage of each population within CD45<sup>+</sup> cells was shown for brains from WT, Ts1Cje, Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> and Erg<sup>+/mld2</sup> mice. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 5 mice in each genotype). Statistical significance was determined by an ANOVA with an LSD post hoc test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* **2020**, 30, 75-91, Figure 5.

### 1-3-5. *Erg* 遺伝子の 3 コピー化による Ts1Cje 胎生期脳における脳内マクロファージの形態変化

脳実質内には数種のマクロファージが存在しており、それらは様々な機能を呈するとともに、その形態も異なることが知られている (53, 54)。そこで、脳内マクロファージの数および形態を解析するために、成熟マクロファージマーカーである F4/80 の抗体を用いた免疫組織染色を行った。胎生期の脳実質内 F4/80 陽性マクロファージの細胞密度は、Ts1Cje マウスでは WT マウスよりも小さかった、一方 Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスの脳内マクロファージ密度は WT マウスと同程度であり、フローサトメトリー解析と同様の結果が得られた ( $F(2, 12) = 15.3$ ,  $p = 0.0044$ ) (Figure 8A, B)。次に、F4/80 陽性脳内マクロファージの細胞の形態について真円度分析を行ったところ、Ts1Cje マウスにおける脳内マクロファージは WT マウスにおける脳内マクロファージよりも円形であり、炎症性形態であるのに対し、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスの脳内マクロファージは WT マウスと同様に突起の多い恒常性の形態であった ( $F(2, 12) = 9.04$ ,  $p = 0.015$ ) (Figure 8C, D)。これらの結果は、Ts1Cje マウス胎生期脳において *Erg* 遺伝子の 3 コピー化により脳内マクロファージの数が WT マウスよりも少ないが、その性質は炎症性のものが多いことを示す。



**Figure 8. The density and phenotype of brain macrophages in Ts1Cje embryos is altered by triplication of the *Erg* gene.**

(A) Brain macrophages in WT, Ts1Cje and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice at E14.5 were detected by immunohistochemistry with anti-F4/80 antibodies (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars: 200  $\mu$ m. (B) The F4/80-positive brain macrophages including microglia and/or perivascular macrophages inside brains but not meningeal macrophages on the surface of the cerebral cortex were counted in a blinded manner, showing that the density of microglia and/or perivascular macrophages in Ts1Cje mice is significantly decreased in comparison to the WT mice, whereas that in Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice is comparable to that in WT mice. The data are presented as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  mice in each genotype). (C-D) Circularity of the microglia and/or perivascular macrophages was assessed by a morphological analysis with the Image J software program. The typical morphology of F4/80-positive microglia and/or perivascular macrophages in the cerebral cortex (C) and their circularity (D) indicate that the microglia and/or perivascular macrophages in the cerebral cortex of Ts1Cje mice are activated in comparison to WT and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice. Scale bars: 10  $\mu$ m. Statistical significance was determined by an ANOVA with an LSD post hoc test. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* 2020, 30, 75-91, Figure 6.

#### 1-4. 考察

本章では、DS 脳発達遅滞の関連分子の同定を目的とし、脳発達遅滞がみられる Ts1Cje マウス胎生期脳におけるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、61 遺伝子の mRNA 発現量の変動を同定した。そのうちの 21 遺伝子はトリソミー領域内遺伝子であったが、そのほかはトリソミー領域外の 33 個の常染色体遺伝子、3 個の X 染色体遺伝子および 4 個の Ts1Cje マウスのもつハプロ不全領域 (19) にコードされている遺伝子であった。発現変動が比較的大きな遺伝子の多くは炎症細胞マーカーとして知られる炎症関連遺伝子群であった (50-53)。既報の E15.5 の Ts1Cje マウス脳を用いたマイクロアレイ解析結果においても、トリソミー領域以外でコードされている多くの遺伝子の発現の変化が明らかにされているが、今回の結果で検出された炎症関連遺伝子群の発現増加は認められていない (55)。このように、トリソミー領域外の遺伝子の mRNA 発現の違いは各胎生期の時期によって異なっており、それぞれ、組織の発達に合わせて時期特異的な影響を受けている可能性がある。実際に、WT および Ts1Cje マウスの発達脳において、Notch シグナル伝達経路関連遺伝子は、発達の進展に伴った発現減少傾向が認められており、時期特異的な遺伝子発現の変動を示す報告がある (56)。

また本研究結果において、一部のトリソミー領域上の遺伝子は発現が検出されなかったが、それらの遺伝子については、既報の E15.5 の Ts1Cje マウス脳を用いたマイクロアレイ解析結果においても発現が検出されていないまたは遺伝子量依存的な顕著な発現の増加が認められておらず (55)、マウス胎生期脳において発現量が非常に少ないまたは発現していない遺伝子であると考えられる。

Ts1Cje マウスでは、トリソミー領域である MMU16 の一部が MMU12 へ転座しており (22)、この転座によって MMU12 のテロメア側にコードされている 7 遺伝子が欠失しヘテロ欠損となっている (19)。今回のトランスクリプトーム解析では、これらのヘテロ欠損遺伝子のうち、*dynein axonemal heavy chain 11 (Dnahc11)* の mRNA の発現増加および *integrin beta-8 (Itgb8)*、*trans-acting transcription factor 8 (Sp8)* および *Sp4* の mRNA 発現の減少が有意差をもって検出された。このうち *Dnahc11* は Ts1Cje マウスにおける MMU12 の転座のブレイクポイントを含んでおり、使用するプローブによってはその発現の顕著な増加を測定することが確認されているが、少なくとも Ts1Cje 胎生期マウスの脳においてはその遺伝子産物の発現増加が脳機能に影響を与えていることはないと考えられている (57)。Ts1Cje マウスにおいてみられた炎症関連遺伝子群の mRNA 発現増加についてはハプロ不全領域上の *Itgb8*、*Sp8* および *Sp4* 遺伝子の発現減少の関与の可能性が考えられるが、Ts1Cje マウス様のハプロ不全領域をもたない Ts2Cje マウスで Ts1Cje マウスと同様に炎症関連遺伝子群の mRNA 発現増加が観察されたことから、この可能性は低いと考えられる。さらに Ts1Cje マウスのもつトリソミー領域よりも短い、およそ 30 遺伝子をトリソミーとしてもつ Ts1Rhr マウスにおいても、Ts1Cje マウスと同様の炎症関連遺伝子群の mRNA 発現の増加が観察されたことから、E14.5 胎生期脳における炎症関連遺伝子群の発現増加は DS モデルマウスにおいて一般的な異常表現型であることが示された。

DAVID を用いた機能解析で、Ts1Cje マウスにおいて炎症反応に関するクラスターを検出しているため、E14.5 胎生期脳において炎症反応が亢進している可能性が考えられた。しかし一

方で、トランスクリプトーム解析の結果では、炎症時に放出されるサイトカインなどの炎症メディエーターやその受容体遺伝子、炎症性細胞の走化性因子などの mRNA 発現の顕著な亢進は認められなかったため、DS モデルマウス胎生期脳における炎症関連遺伝子群の発現亢進は炎症亢進に起因するものではないことが考えられた。Ts1Cje マウス E14.5 胎生期脳において mRNA 発現が増加していた、*S100a8*、*S100a9*、*myeloperoxidase* および *Ly6c1* 遺伝子は単球および好中球で高発現していることが報告されており (50, 51, 58)、フローサイトメトリー解析では好中球と単球の全白血球に対する相対数が Ts1Cje マウスにおいて増加していたことから、E14.5 Ts1Cje マウス胎生期脳における炎症関連遺伝子群の発現亢進は、炎症性細胞の脳内への浸潤に起因すると考えられた。

本研究では *Erg* 遺伝子のみを正常と同じ 2 コピーの状態に戻した Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスについて解析を行うことで、Ts1Cje マウス胎生期脳内における単球や好中球などの炎症性細胞数の相対的な増加および、脳内マクロファージ数の減少は *Erg* 遺伝子の 3 コピー化が原因である可能性を示した。しかし、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスにおける胎生期脳内の炎症性細胞数の正常化に関しては、完全な改善はみられず、依然 WT マウスの炎症性細胞数よりも高値であったことから、これらの変動には *Erg* 遺伝子だけでなく、他の遺伝子の変動も関与している可能性がある。

*Erg* 遺伝子は主に血管内皮細胞などの中胚葉組織に発現していることから (59)、*Erg* 遺伝子の発現量が増えることにより、血管透過性が増すなどの内皮細胞の機能に影響を与えていることが推測できる。しかし、転写制御因子である ERG は Vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) や Claudin-5 といった細胞接着分子の発現を亢進することが知られている (59)。実際にヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた *in vitro* の実験系やマトリゲル基底膜マトリックスを用いた実験系において ERG の発現が血管の安定化に重要であることが示されており (60, 61)、ERG は VE-cadherin の発現増加を介して血管内皮細胞の密着結合を強化していると考えられている。しかし、ERG が過剰に発現した際の胎生期脳血管への影響についての報告はない。また、ERG が活性化する VE-cadherin の発現は内皮の結合を強固にすることが知られているが、一方で VE-cadherin はリン酸化されると細胞へと内在化し、その安定性が崩壊することも報告されている (62, 63)。そのため、DS 胎生期脳内においてはこのような VE-cadherin のリン酸化が促進されている可能性がある。実際、ERG は VE-cadherin のリン酸化を促す、vascular endothelial growth factor シグナルに関与する VEGFR1 や VEGFR2 の発現も活性化することが報告されている (59)。これらの ERG が調節する分子の mRNA の顕著な発現変動は、トランスクリプトーム解析においては検出できなかったが、胎生期脳の発達中の内皮細胞中という限局した領域での変化であるため、胎生期脳全体を対象とした解析結果には現れなかった可能性がある。いずれにしても、*Erg* 遺伝子の発現増加が、Ts1Cje マウス胎生期脳の血管に対して、何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられ、本仮説に基づいたさらなる解析が DS マウス胎生期脳での炎症細胞浸潤機構の解明につながると期待される。

*Erg* 遺伝子以外のトリソミー遺伝子の血管形成への関与も示唆されている。例えば、*regulator of calcineurin 1 (Rcan1)* 遺伝子の 3 コピー化は、DS モデルマウスに移植した腫瘍の形成過程における腫瘍血管の新生を抑制することが示されていることから (64)、胎生期における脳血管形成障害の原因となりうると考えられる。*Erg* 遺伝子は、*Rcan1* 遺伝子などの他の

トリソミー遺伝子と共同して血管形成異常の原因となっている可能性が考えられ、これは Ts1Cje-Erg<sup>+/+mld2</sup> マウスにおいて好中球や単球の細胞数が Ts1Cje マウスよりは少ないものの WT マウスよりも多かった原因であるかもしれない。

*Erg* 遺伝子の 3 コピー化は、好中球と単球の相対数の増加の一因であることに加えて Ts1Cje 胎生期の脳内マクロファージ数の減少の原因でもあることが示唆された。では、なぜ脳内マクロファージ数は Ts1Cje マウスの胎生期脳で減少したのか。著者の考えている Ts1Cje マウス胎生期脳血管透過性亢進仮説に基づき考えると、胚発生期の早期からマウス脳内に存在するミクログリアをはじめとする脳内マクロファージ (65) が *Erg* 遺伝子により亢進した血管透過性により血中へ移行したために脳内マクロファージ数が減少した可能性が考えられる。また、この可能性とは異なり、脳内での単球数が増加していたことから、単に単球のマクロファージへの分化が阻害された結果、脳内マクロファージが減少した可能性も考えられる。さらに、*Erg* 遺伝子は、血管内皮細胞のみならず造血幹細胞 (HSC) でも発現しており、胎生期での HSC 維持に必要であることも報告されている (66)。そのため、Ts1Cje マウスにおける脳内マクロファージ数の減少は *Erg* 遺伝子の過剰発現による胎生期 HSC の調節不全によることも考えられる。ただし、脳内マクロファージのうちミクログリアは、卵黄嚢由来の赤血球骨髄系前駆細胞 (EMP) と他の脳内マクロファージとは起源が異なることから (65)、未だ明らかでない EMP おける ERG の役割が原因となり Ts1Cje マウス脳内のマクロファージ数の減少を引き起こしている可能性も考えられる。そのほか、マクロファージは活性化後、自己細胞死を引き起こすことも知られている (67)。トランスクリプトーム解析において炎症性メディエーターの発現上昇は検出されなかったことから、胎生期脳全体での炎症亢進は考えにくい。炎症性細胞の浸潤などに起因した局所的な炎症の亢進によってマクロファージが炎症性の形態へと変化し、活性化後の細胞死によりその数が減少した可能性も考えられる。この可能性は、Ts1Cje マウス胎生期脳で炎症性形態を示すマクロファージ数の増加から支持される。ただし、この Ts1Cje マウス胎生期脳での脳内マクロファージの形態異常は、ミクログリアの発達遅滞の結果である可能性も考えられる。マウスにおいて、ミクログリアは血液脳関門 (BBB) がある程度形成されてくる E13.5 までに EMP 由来マクロファージとして脳内に浸潤し、その後、発達後期から生後にかけて周辺の細胞環境を維持するために突起を伸ばした形態へと変化していく (68)。*Erg* 遺伝子の発現増加に伴い何らかの原因で BBB の発達が遅れることで、浸潤直後のマクロファージの割合が多くなっており、突起を持つ形態へと変化している細胞が少ない可能性も考えられる。このように、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化による脳内マクロファージ数の減少の原因については、現段階では多くの推測ができるが、今後の解析での *Erg* 遺伝子の 3 コピー化による脳内マクロファージ数の減少機構の解明は DS の病態メカニズム解明に必須である。

## 1-5. 小括

本章では、E14.5 の Ts1Cje マウス脳におけるトランスクリプトーム解析を行い、以下の知見を得た。

1. Ts1Cje マウス胎生期脳において、単球および好中球に高発現する炎症関連遺伝子の発現が増加していた。
2. *Erg* 遺伝子のみを正常の 2 コピーとした Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスでは、Ts1Cje マウスで発現増加が認められた炎症関連遺伝子の mRNA 発現は、Ts1Cje マウスほど高い発現増加は検出されなかった。
3. Ts1Cje マウス胎生期脳において、全白血球に対する好中球と単球の相対数が WT マウスに比し増加していた。一方、全白血球に対する脳内マクロファージの相対数は減少していたが、細胞形態解析を行ったところ、その多くが炎症性形態を示していた。
4. Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスにおける全白血球に対する好中球と単球の相対数は WT マウスに比し増加していたものの、Ts1Cje マウスより少なかった。一方、全白血球に対する脳内マクロファージの相対数は WT マウスと同程度であったが、Ts1Cje マウスに比し増加していた。
5. Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウス胎生期脳における脳内マクロファージの細胞形態は、Ts1Cje マウスで検出された真円に近い炎症性形態ではなく、WT マウスと同程度の円形度であり、Ts1Cje マウスよりも複雑な細胞形態を示した。

以上の知見より、Ts1Cje マウスにおいて *Erg* 遺伝子の 3 コピー化により、Ts1Cje マウス胎生期脳内では、炎症性細胞や脳内マクロファージなどの免疫細胞の構成比が異常となり、組織環境の変動が示唆された。

## 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

### 2-1. 緒言

胎生期における正常な脳の発生は生後の正常な脳発達や機能の発現に重要である。実際に、胎生期大脳皮質の発達障害は、知的障害、自閉症、統合失調症などの要因となることがヒトにおける病態解析や動物モデルを用いた解析結果から示唆されている (69, 70)。そのため、胎生期脳発達には神経細胞の適切な生成や配置が重要となるが、特に胎生期初期においては血管やミクログリアがその役割を担っている (71, 72)。ミクログリアは神経細胞や他の脳内グリア細胞が出現する前から胎生期脳内に存在する重要な細胞である。脳内に存在する常在性マクロファージであるミクログリアは、通常多数の分岐をもった形態をしており、神経細胞のシナプスに接することによって脳内の環境を監視し、不要なシナプスを除去することで神経回路の形成に関わっているとされている (73, 74)。一方、脳障害時などの状況では、ミクログリアは様々な刺激に応答することで、アメボイド型と呼ばれる突起の少ない円形に近い形態へと変化する (73, 74)。このタイプのミクログリアは、運動性に富み、炎症性サイトカインや神経栄養因子など、脳の恒常性を調節する分泌タンパク質を産生する。このようにして、ミクログリアは脳の発達時に周囲の環境要因と連動して機能形態を大きく変化させ、神経細胞の増殖やシナプスの接続、神経回路形成に寄与しているため、ミクログリアなどの神経周辺細胞の環境の変化が胎生期脳発達遅滞の発症要因として関与する可能性がある。

DS においては、複数の中枢神経系の異常が組み合わさることで複雑な神経学的表現型を示す (75, 76)。特に脳形成段階での変化は、神経細胞の発達とシナプス回路の剪定が影響されることにより最終的に認知機能に障害を与える可能性が高い。また、Ts1Cje および Ts65Dn マウスにおいて、胎生期大脳皮質領域では神経新生が減少しており、これが成体期の脳構造や神経活動の形成異常に影響していると示唆されていることから (32, 33, 77)、胎生期の脳発達遅滞が DS 患者の知的障害発症の誘発要因のひとつであると考えられている。よって、DS の初期段階の脳異常を特徴づけることは知的障害発症の分子メカニズムの解明に重要である (78)。

第1章では、Ts1Cje マウス胎生期脳において *Erg* 遺伝子の 3 コピー化が脳内マクロファージ数を減少させる一方、炎症性の形態を示す脳内マクロファージの割合を増加させることを示した。これらの結果は、炎症性細胞数の増加や脳内マクロファージ数の減少を介して、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化が周囲の組織環境に影響している可能性を示唆しているが、DS における *Erg* 遺伝子の 3 コピー化が胎生期脳発達へ関与するののかについては未だ明らかではない。そこで本章では、Ts1Cje マウスにおける *Erg* 遺伝子の 3 コピー化が胎生期の脳発達に及ぼす影響を評価するために、Ts1Cje マウスおよび Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスにおける胎生期大脳皮質領域での神経新生の程度を解析した。また、DS モデルマウスへの胎生期での薬物投与により胎生期脳発達および成体期行動異常が改善されることが報告されており (79, 80)、この知見は胎生期の脳発達遅滞が DS 患者の知的障害発症の原因となり得ることを支持している。さらに本章では、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスの成体期記憶学習能および成体期海馬における神経新生について解析し、成体期における記憶学習障害への *Erg* 遺伝子の影響について検証した。



## 2-2. 実験方法

### 2-2-1. 実験動物

すべての動物実験は、京都薬科大学の動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。実験に使用したマウスの系統およびその飼育方法は全て 1-2-1 と同様である。

### 2-2-2. Bromodeoxyuridine (BrdU) ラベリング

胎生期脳における神経新生を評価するために、妊娠マウス (E13.5) に BrdU (50 mg/kg) (Nacalai tesque) を腹腔内投与した。投与後 24 時間において、胎生期脳を摘出した。また、成体期海馬における神経新生の評価では、12 週齢のマウスに BrdU (300 mg/kg) を 1 日 1 回、7 日間毎日同時刻に腹腔内投与し、最終投与後 24 時間で脳を摘出した。摘出した脳は、4% paraformaldehyde を含む PBS 固定液にて 4°C で 4 日間インキュベートし、次いで、30% sucrose 含有 PBS 溶液にて 4°C で 4 日間浸漬後、15% sucrose 含有 Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) を用いて凍結包埋し、薄切するまで -80°C にて保存した。

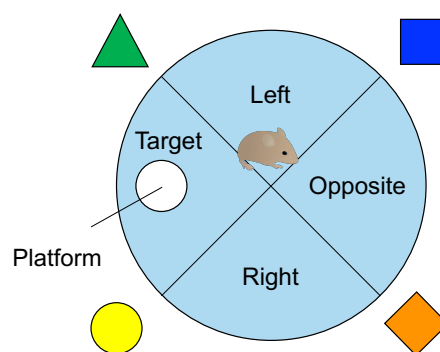
### 2-2-3. 胎生期脳組織に対する免疫組織化学染色法

冠状面で切った胎生期脳切片 (厚さ: 50  $\mu\text{m}$ ) を 2 M 塩酸で 37°C、30 分間インキュベートすることで DNA 変性を行った後、0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) で室温にて 10 分間インキュベートすることで中和した。内在性マウスイムノグロブリンの非特異的染色によるバックグラウンドを抑制することを目的として、切片を、Mouse on Mouse blocking (Vector Laboratories) と室温にて 1 時間インキュベートした。次いで、4% ブロックエース (DS Pharma, Osaka, Japan) 含有 PBS 溶液と室温で 1 時間インキュベートした。切片は、PBS にて洗浄後、抗 Ki67 抗体 (catalog No. AF7649, 1:500; Novacastra, Norwell, MA, USA) および抗 BrdU 抗体 (catalog No. 555627, 1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と 4°C で一晩反応させた。洗浄後、切片は Alexia 594 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:400; Invitrogen) および Alexia 488 標識ロバ抗マウス IgG 抗体 (1:400; Invitrogen) と室温にて 1 時間反応させ、次いで、細胞核を DAPI (1:800; Nacalai tesque) にて染色し、ProLong™ Gold 褪色防止用封入剤 (Thermo Fisher Scientific) を用いて MAS コートスライドガラス (MATSUNAMI, Osaka, Japan) 上に封入した。蛍光免疫染色像は、共焦点レーザー顕微鏡 NIKON A1R (Nikon, Tokyo, Japan) を使用して取得した (z スタックの厚み: 25  $\mu\text{m}$  1 ステップあたりの厚み 1  $\mu\text{m}$  で、計 25 ステップに分割)。BrdU<sup>+</sup>/Ki67 細胞と DAPI で染色された核の数は、3 次元細胞カウント法 (カウントボックス: 150×180×25  $\mu\text{m}$ ) に従って計測した (81)。この計測により切片あたりの BrdU<sup>+</sup>/Ki67 細胞率を算出したが、細胞数のカウントは各遺伝子型 (WT; n = 10, Ts1Cje; n = 9, および Ts1Cje-Erg<sup>+/+mld2</sup>; n = 8) においてそれぞれ 16~20 箇所の大脳皮質領域で盲検法を用いて行った。また、WT、Ts1Cje および Ts1Cje-Erg<sup>+/+mld2</sup> マウス (各遺伝子型につき n = 3) の大脳皮質領域の単位体積あたりの BrdU<sup>+</sup>/Ki67 細胞数について、ステレオロジー解析を用いて定量した。胎生期脳の連続切片をマウス 1 個体あたり 3 枚おきの計 7 枚使用し、蛍光免疫染色を行った。全ての切片の免疫染色像を共焦点レーザー顕微鏡 NIKON A1R (Nikon) にて取得し (z スタックの厚み: 50  $\mu\text{m}$  1 ステップあたりの厚み 1  $\mu\text{m}$  で、計 50 ステップに分割)、StereoInvestigator (MBF Bioscience, Williston,

VT, USA) を用いて三次元的な BrdU<sup>+</sup>/Ki67細胞数の定量を行った。使用した立体パラメータを以下に記す。サンプリンググリッド: 63.2 μm × 63.2 μm、カウントフレーム: 20 μm × 20 μm、ガードゾーン: 5 μm、ディセクタの高さ: 10 μm、誤差係数 (CE; Gundersen  $m = 1$ ) の値は、0.05 から 0.07 の範囲であった。

#### 2-2-4. モリス水迷路試験

マウスの空間記憶学習能を評価するために、12 週齢のマウス (WT,  $n = 10$ ; Ts1Cje,  $n = 9$  および Ts1Cje-Erg<sup>+/+mld2</sup>,  $n = 4$ ) を用いてモリス水迷路試験を行った。まず、マウスから見えないように水面下 0.5 cm に退避用プラットホームを設置した大型の円形プール (直径: 約 100 cm) 用意し、その周りに色や形の異なる 4 つのオブジェクトを設置した (Figure 9)。また、試験開始時に、水温は約 18°C、明るさは約 100 lx となるように調節した。水面下のプラットホーム探索する訓練試行では、水面を 4 分割した任意の 1 区画よりマウスを水面に放ち、プラットホームに到達するまでに要した時間を計測した。プラットホームに到達したマウスは、その場に 20 秒間滞在させた後、すくい上げ、飼育ゲージに戻した。60 秒以内にプラットホームに到達できなかったマウスは、プラットホームに誘導したのち、20 秒間滞在させた。本試行を 1 ブロック 4 回 (4 回とも異なる位置からマウスをプールに入れた)、1 日 2 ブロック繰り返し、計 5 日間行った。その後、6 日目に、プラットホームを撤去したプールにマウスを放ち、プローブテストを行った。プローブテストは 1 匹につき 1 回のみで、マウスの水泳行動を 60 秒間観察した。マウスの水泳時間のうち、プラットホームを設置していた区画における滞在時間の割合を計測し、空間記憶の指標とした。プールにおけるマウスの活動は、コンピューターに接続したビデオカメラで上方から撮影し、解析ソフト EthoVision XT 11.5 (Noldus Information Technology, Wageningen, Nederland) を用いて、プラットホームへの到達時間およびそれぞれの区画における滞在時間を測定した。



**Figure 9. A schematic representation of Morris water maze test.**

In the training phase, the mice were subjected to eight trials per day for five consecutive days. Mice were allowed 60 sec to swim to find the platform in a trial. When the mouse failed to find the platform within 60 sec, it was guided to the platform and allowed to remain there for 20 sec. On day 6, the platform was removed from the pool in the probe trial. Each mouse was subjected to one probe trial. The time spent in each area in 60 sec was recorded.

#### 2-2-5. 成体期海馬に対する抗 doublecortin (DCX) 抗体を用いた免疫組織化学染色法

脳切片 (厚み: 30  $\mu\text{m}$ ) を 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  に 30 分間反応させたのち、Retrievagen A (pH 6.0) (BD Biosciences) 中で 90°C、10 分間熱処理し、抗原賦活化した。非特異的結合を防止するために、Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Labs) の avidin-blocking solution (1 drop/PBST 500  $\mu\text{L}$ )、10% 正常ウマ血清および 0.3% Triton X-100 (Nacalai tesque) を含む PBS と室温にて 1 時間インキュベートした。次いで、切片は抗 DCX 抗体 (catalog No. 18723-50, 1:300; abcam) と 4°C で一晩インキュベートし、ビオチン標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:200; VECTOR) と室温で 1 時間インキュベートした。Vectastain Elite ABC Standard Kit (Vector Laboratories) を用いて Avidin-Biotin Complex と反応させ、免疫染色シグナルを Metal enhanced DAB substrate kit (Thermo Fisher Scientific) により検出した。染色後の切片は、50%、70%、90%、95%、100% のエタノールに順次 3 分ずつ浸して脱水後、キシレンに (5 分、2 回) に浸すことで透徹し、MOUNT-QUICK (Cosmo Bio) を用いて MAS コートスライドガラス (MATSUNAMI) 上に封入したものを標本として顕微鏡下で観察した。

#### 2-2-6. 成体期海馬に対する抗 BrdU 抗体を用いた免疫組織化学染色法

脳切片 (厚み: 30  $\mu\text{m}$ ) は、2 M 塩酸と 37°C にて 30 分間インキュベートし、次いで 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) と室温にて 10 分間インキュベートした。非特異的結合を防止するために、Mouse on Mouse blocking (Vector Laboratories) と室温にて 1 時間インキュベートしたのち、Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Labs) の avidin-blocking solution (1 drop/PBST 500  $\mu\text{L}$ ) および 4% ブロックエース (DS Pharma) 含有 PBS 溶液と室温で 1 時間インキュベートした。次いで、切片は Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Labs) の biotin-blocking solution (1 drop/PBST 500  $\mu\text{L}$ ) および抗 BrdU 抗体 (catalog No. 555627, 1:200; Invitrogen) を含む PBS と 4°C で一晩反応させた。その後、0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  に 30 分間反応させ、ビオチン標識抗マウス IgG 抗体 (1:200; VECTOR) と室温で 1 時間インキュベートした。免疫染色シグナルの検出から観察までの作業は 2-3-5 と同様に行なった。

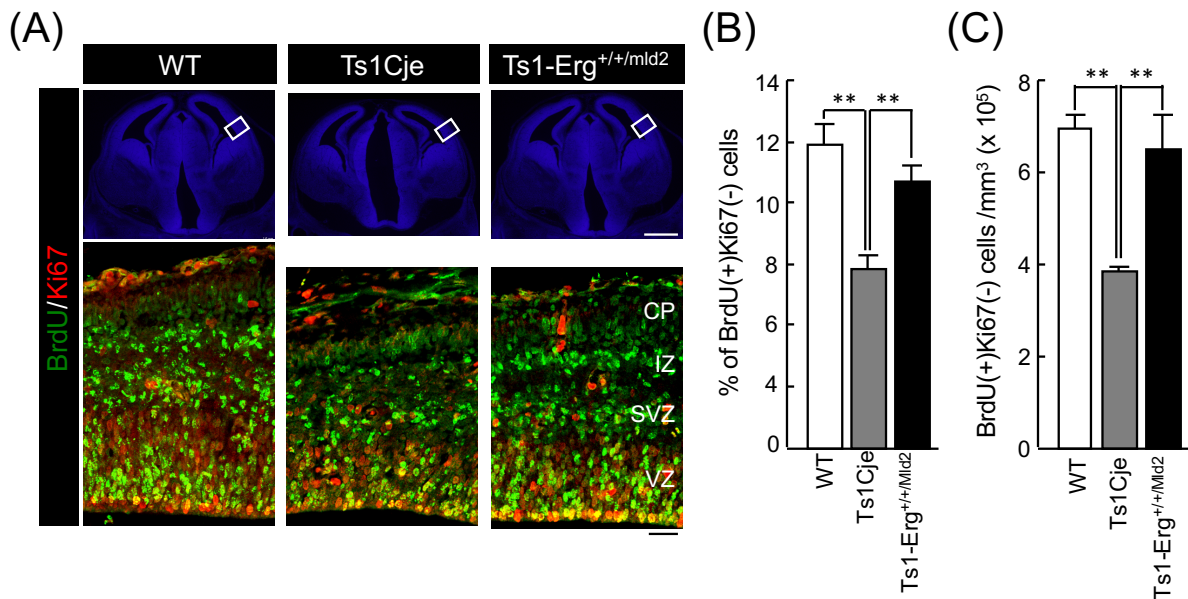
## 2-3. 実験結果

### 2-3-1. *Erg* 遺伝子の 3 コピー化による Ts1Cje 胎生期脳における神経新生の低下

Ts1Cje マウスの胎生期において観察された大脳皮質における神経新生障害 (32) に対する *Erg* 遺伝子の 3 コピー化の影響を評価するために、E14.5 の Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスの胎生期大脳皮質領域における神経新生について免疫染色法を用いて解析した。核酸誘導体 BrdU はチミジンアナログであり、細胞周期の S 期において新たに合成される DNA に取り込まれるので、増殖細胞をラベルすることができる。そこで、妊娠 13.5 日目のマウスに BrdU を腹腔内投与し、24 時間後に胎仔摘出し染色することで、その間に増殖した細胞を標識した。さらに、BrdU で標識された細胞のうち、神経細胞へと分化したために休止期に入った新生神経細胞について、休止期以外の細胞に発現しているマーカーである Ki67 を用いて識別し、BrdU 陽性かつ Ki67 陰性の細胞を新生神経細胞として定量した。Figure 10A に示したように、緑色で示した BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup>細胞数は、以前の報告通り、Ts1Cje マウスで減少した。これに対し、*Erg* 遺伝子のみが正常の 2 コピーとなった Ts1Cje マウスである Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスでは BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup>細胞数に変化はなかった。切片上の全細胞数をカウントする定量法を用いて新生神経細胞数を定量したところ、Ts1Cje マウスで認められた有意な神経新生の低下は Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスでは検出されず、WT マウスと同程度であった ( $F(2, 48) = 14.22, p = 8.4E-5$ ) (Figure 10B)。このことを詳細に検討するために、1 個体当たり 7 切片を用いて立体的に定量する方法でも検討したところ、同様の結果を得ることができた ( $F(2, 12) = 12.60, p = 0.0071$ ) (Figure 10C)。本結果は、Ts1Cje マウス胎生期大脳皮質において *Erg* 遺伝子の 3 コピー化が神経細胞の新生を抑制すること、すなわち Ts1Cje マウスの胎生期大脳皮質発達の遅滞を引き起こすことを示唆している。

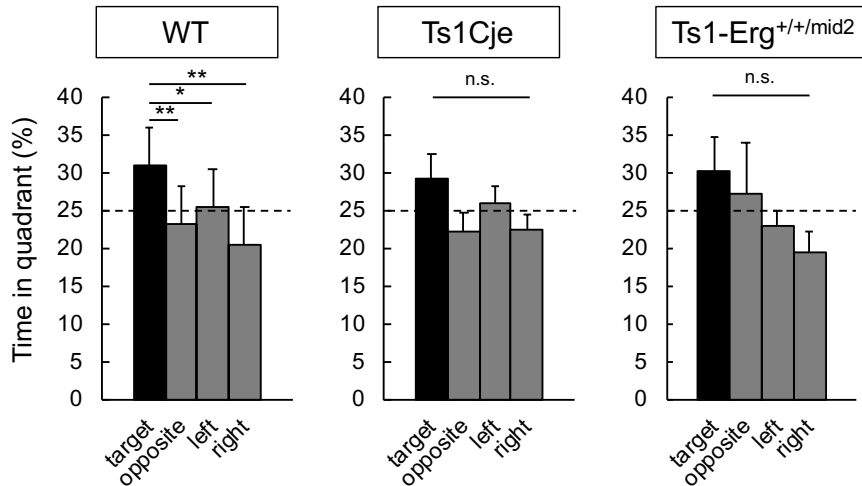
### 2-3-2. *Erg* 遺伝子の 3 コピー化が記憶学習障害に及ぼす影響

*Erg* 遺伝子の 3 コピー化を正常化した Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスにおいて、Ts1Cje マウスで観察される胎生期神経新生の減少がほぼ完全に改善されたことから、胎生期での脳発達遅滞が成体期での記憶学習障害の原因である可能性について Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスのモリス水迷路試験における空間記憶学習能を評価することで検証した。WT マウスにおいては、target 区画への滞在時間の割合が他区画での割合と比べ有意に大きかったのに対し、Ts1Cje マウスおよび Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスでは各区画の滞在時間の割合に有意な差は認められないようであった (WT:  $F(3, 108) = 6.34, p = 0.0014$ , Ts1Cje:  $F(3, 96) = 1.71, p = 0.18$ , Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup>:  $F(3, 36) = 1.11, p = 0.39$ ) (Figure 11)。検討したマウス、特に Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスの個体数が少ないことから、個体数を増やして検証する必要はあるものの、成体期 Ts1Cje マウスの特徴である記憶学習能力の低下は、*Erg* 遺伝子のみを 2 コピーに戻しても改善せず、Ts1Cje マウスにおける記憶学習能力の低下に、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化は関与していない可能性が考えられた。



**Figure 10. Prenatal neurogenesis in the cerebral cortex of Ts1Cje embryos is impaired by triplication of the *Erg* gene.**

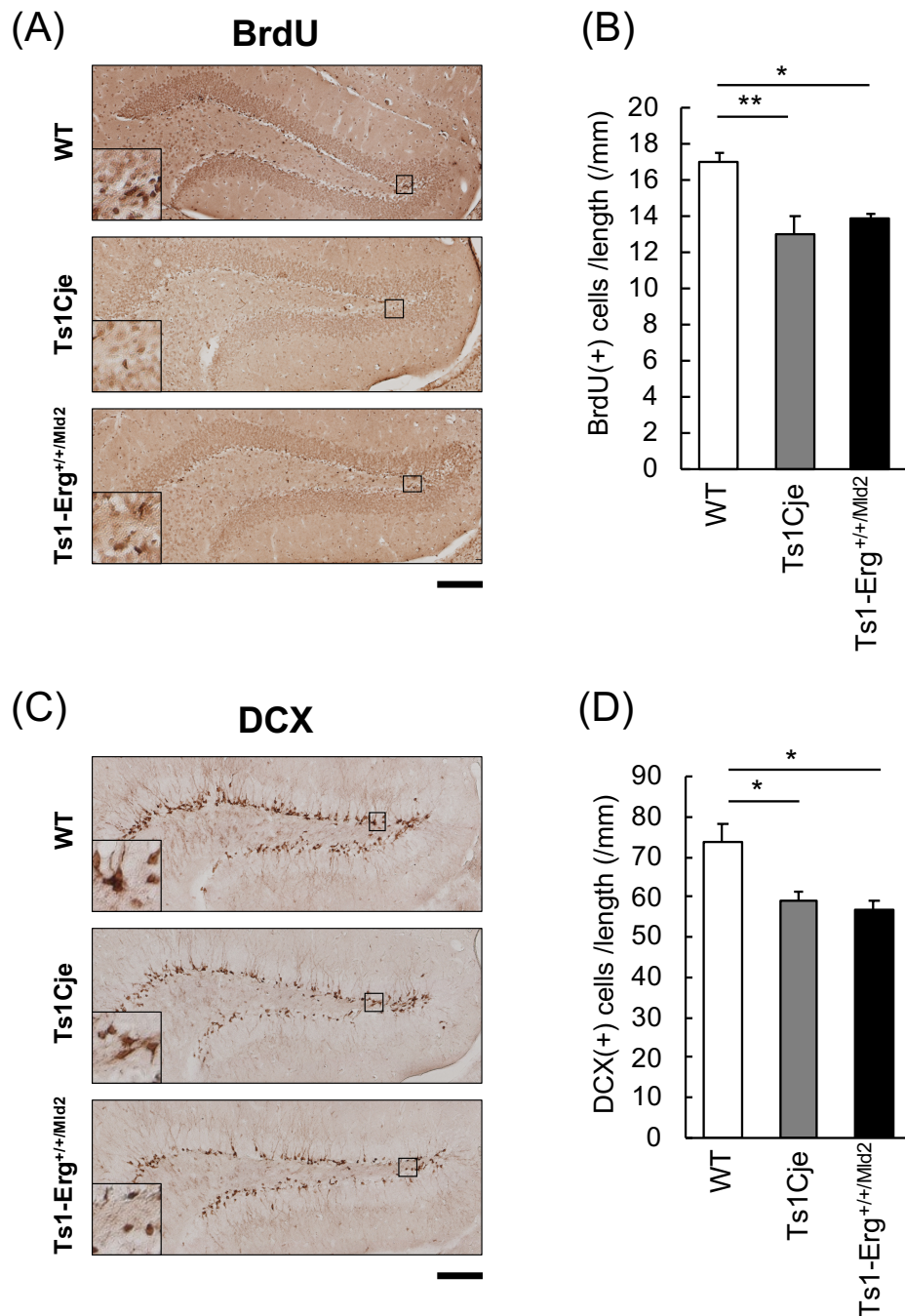
One pulse of 50 mg/kg BrdU was administered to pregnant Ts1Cje females on E13.5, and BrdU-positive cells at 24 h after injection were detected by immunohistochemistry. (A) Double staining images of the cortical wall for Ki67 (red) and BrdU (green) taken at the midpoint between the medial and lateral angles of the LV show that fewer Ki67-negative/BrdU-positive cells (exiting the cell cycle) were detected in WT, Ts1Cje and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice. Nuclei were stained with DAPI (blue). Upper panels show an image of the whole brain. Scale bar: 1 mm. Lower panels show magnified images of the cerebral cortex in the boxed area of the respective upper panel. Scale bar: 200  $\mu$ m. (B) The numbers of cells exiting the cell cycle (BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup>) were counted in a counting box (150  $\times$  180  $\times$  25  $\mu$ m) in a blinded manner, demonstrating that the number of BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup> cells was reduced in embryonic cortices of Ts1Cje mice, whereas no decreased neurogenesis was detected in Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice. Values indicate the ratio of BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup> cell to the total cell number in a counting box (WT [n = 10], Ts1Cje [n = 9] and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> [n = 8], mean  $\pm$  SEM). (C) Estimates of BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup> cell numbers in the cerebral cortex were obtained using stereological cell counting. Values indicate the number of BrdU<sup>+</sup>/Ki67<sup>-</sup> cell ( $\times 10^5$ ) per unit volume (n = 3 in each genotype, mean  $\pm$  SEM). The data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 3 mice in each genotype). Statistical significance was determined by an ANOVA with an LSD post hoc test \*\*  $p < 0.01$  (significantly different). Ishihara *et al.*, *Brain Pathol.* **2020**, 30, 75-91, Figure 7 A-C.



**Figure 11. Impairment of spatial learning and memory in the Ts1Cje and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice.** A Morris water maze test was employed in WT, Ts1Cje and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice to evaluate spatial learning and memory. In the next day of the training phase, the time spent in each area was estimated in the probe test. Data represent means  $\pm$  SEM (WT [n= 10], Ts1Cje [n = 9] and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> [n = 4]). Statistical significance was determined by an ANOVA with an LSD post hoc test \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (significantly different). Shimizu *et al.*, unpublished data.

### 2-3-3. *Erg* 遺伝子の 3 コピー化による Ts1Cje 成体海馬における神経新生の低下

マウスの記憶学習において、成体期での海馬歯状回 (DG) における神経新生が重要な役割を担っていることが示唆されている (82)。そこで、モリス水迷路試験の結果を確認するために、Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウスの成体海馬歯状回における神経新生について評価した。12 週齢の WT、Ts1Cje および Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウスの DG における 7 日間での増殖細胞を *in vivo* BrdU 標識法を行い組織免疫染色によって BrdU 陽性細胞数を計測することで定量した。Figure 12A および 12B に示したように、これまでの報告通り Ts1Cje マウスの BrdU 陽性細胞数は WT マウスよりも有意に少なく (32)、この BrdU 陽性細胞の減少は Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウスでも同様に観察された ( $F(2, 20) = 7.34, p = 0.011$ )。また、未成熟神経細胞マーカーである DCX の発現細胞を組織免疫染色法により検出したところ、BrdU 陽性細胞の検討結果と同様に WT マウスに比し、Ts1Cje マウスおよび Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウスで DCX 陽性細胞数は有意に少なく、それらのマウス間では差はなかった ( $F(2, 20) = 6.55, p = 0.015$ ) (Figure 12C, D)。このように、Ts1Cje マウス成体期海馬における神経新生の低下は、*Erg* 遺伝子を 2 コピーに戻した Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> マウスでも同程度であり、モリス水迷路試験の結果と対応するものであった。



**Figure 12. Hippocampal neurogenesis is impaired in Ts1Cje and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice.**

(A) One pulse of 300 mg/kg BrdU was administered to mice each day for seven consecutive days and the BrdU-positive cells in dentate gyrus (DG) were detected by immunohistochemistry at 24 h after last BrdU injection. (B) The numbers of BrdU-positive cells in DG were counted. In comparison to WT mice, the number of BrdU-positive cells in DG was reduced in Ts1Cje and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice. Values indicate the number of BrdU-positive cell per unit length of DG (means  $\pm$  SEM, WT [n = 5], Ts1Cje [n = 5] and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> [n = 3]). (C) The brain sections were immunostained with anti-DCX antibodies. (D) The numbers of DCX-positive cells were counted. In comparison to WT mice, the number of DCX-positive cells in DG was reduced in Ts1Cje and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> mice. Values indicate the number of BrdU-positive cell per unit length of DG (means  $\pm$  SEM, WT [n = 5], Ts1Cje [n = 5] and Ts1Cje-Erg<sup>+/+/mld2</sup> [n = 3]). Scale bars; 200  $\mu$ m. Statistical significance was determined by an ANOVA with an LSD post hoc test \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  (significantly different). Shimizu *et al.*, unpublished data.



## 2-4. 考察

第1章では、Ts1Cje マウス胎生期脳において単球、好中球および炎症性の形態を示す脳内マクロファージの細胞数が増加しており、その要因のひとつが *Erg* 遺伝子の3コピー化であることを示した。炎症性細胞は神経細胞の増殖や生存を障害する可能性があることから(83)、第2章では、*Erg* 遺伝子の3コピー化の胎生期および成体期における神経細胞新生に及ぼす影響について検証した。E14.5 胎生期において Ts1Cje マウス的大脑皮質で観察される神経新生の低下は、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスにおいては認められず、ほぼ WT マウスと同程度であった。すなわち、この結果は *Erg* 遺伝子のコピー数の正常化でほぼ完全にこの胎生期神経新生減少が正常化することを示している。したがって、Ts1Cje マウスにおける *Erg* 遺伝子の3コピー化が胎生期大腦皮質の神経新生の減少を引き起こす一因となることが示唆された。

この胎生期神経新生低下は第1章の結果より、炎症性細胞数の増加によって引き起こされている可能性があったが、炎症性細胞数が野生型マウスより多かった Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスにおいて、神経新生の程度が野生型マウスと同程度であったことから、胎生期における単球や好中球数の増加は神経新生に関与していない可能性がある。一方、第1章では、Ts1Cje マウスにおける脳内マクロファージ数の減少を示した。近年、脳内マクロファージ中で最も主要な細胞であるミクログリアは、通常時の状態および炎症性の状態のいずれにおいても、神経新生やシナプスの剪定などの多くの過程を通じて、胎生期や生後の脳神経発達に重要な役割を担うことが示されている(71, 84, 85)。Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスでは脳内マクロファージ数が WT マウスレベルであったことから、Ts1Cje マウスにおける *Erg* 遺伝子の3コピー化による脳内マクロファージ数の減少が、胎生期大腦皮質領域における神経新生の減少に関与する可能性は十分に考えられる。

成体期における空間記憶学習能力のテストでは、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスは Ts1Cje マウスと同様に空間記憶学習障害を呈する傾向にあった。これは成体期海馬 DG における神経新生の減少と対応している。一方、これらの結果は *Erg* 遺伝子の3コピー化が成体期記憶学習能力の低下の原因とはならないことを示唆しており、このことは *Erg* 遺伝子をトリソミー領域に含む Ts1Rhr マウスのモリス水迷路試験での正常な空間記憶学習能力を示す報告(25)によっても支持される。したがって、DS マウスにおける空間記憶学習障害の原因遺伝子は、Ts1Rhr マウスのトリソミー領域を除く Ts1Cje マウスのトリソミー領域にコードされる遺伝子であるか、または、Ts1Rhr マウスのトリソミー領域遺伝子と Ts1Rhr マウスのトリソミー領域を除く Ts1Cje マウスのトリソミー領域にまたがって複数存在する可能性が考えられる。

本研究結果では、胎生期神経新生の低下が認められなかった Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスは、成体期では空間記憶学習障害を呈したことから、Ts1Cje マウスでの胎生期脳発達遅滞が成体期での記憶学習障害に関与しないと考えられる。実際に、胎生期大腦皮質と成体期海馬での神経新生機構には共通点がある一方で、相違点も存在している。例えば、胎生期には神経新生がグリア細胞の発生より先行しているために、成熟アストロサイトが周囲に無い環境下で神経新生が主に起こるのに対し、成体期ではアストロサイトが神経前駆細胞に作用することによって成体神経新生を制御している(86)。また、bone morphogenetic protein シグナルの刺激によって胎生初期には神経幹細胞増殖が活性化されるのに対し、成体期では逆に神経幹細胞



の増殖は抑制されている (87, 88)。このように、神経細胞の周囲環境や神経細胞自身の反応性の相違が胎生期と成体期には存在している。それゆえ、Ts1Cje マウスの病態・表現型に関して、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化の関与の程度が胎生期と成体期において異なっていたと考えられる。

本研究によって、Ts1Cje マウスの胎生期大脳皮質では、*Erg* 遺伝子の発現が増加することにより神経新生が減少していることを示した。*Erg* 遺伝子の 3 コピー化が引き起こす脳発達遅滞は成体期記憶学習障害には関与していないと考えられるが、Ts1Cje マウスは他にも多動性、社会性の増加、うつ病様行動の減少など多くの中枢神経系障害を示すことが報告されており (41)、それらの表現型に影響している可能性がある。今後、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化により惹起される胎生期大脳皮質の神経新生低下がどのような病態生理学的意義を持つのか、さらなる研究がその解明につながると期待される。

## 2-5. 小括

本章では Ts1Cje マウスにおいて *Erg* 遺伝子のみを正常の 2 コピーに戻した Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスにおける胎生期大脳皮質での神経新生および成体期の空間記憶学習に関する解析を行い、以下の知見を得た。

1. E14.5 の Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウス大脳皮質領域における神経新生は、WT マウスと同程度であり、Ts1Cje マウスで認められるような減少は検出されなかった。
2. 12 週齢の Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウスにおける空間記憶学習能力について、モリス水迷路試験を用いて評価したところ、Ts1Cje マウスの空間記憶学習障害が改善される傾向は認められなかった。
3. 12 週齢の Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+/mld2</sup> マウス海馬領域における神経新生の程度は WT マウスに比し低下しており、Ts1Cje マウスと同程度であった。

以上の知見より、Ts1Cje マウスにおける *Erg* 遺伝子の 3 コピー化は胎生期脳発達遅滞の原因遺伝子の一つであると考えられたが、一方で、成体期における記憶学習障害には関与していない可能性が示された。

### 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

#### 3-1. 緒言

第1章および第2章では、Ts1Cje マウスの胎生期大脳皮質領域での神経新生に注目し、その変動に関連する *Erg* 遺伝子を同定したが、本遺伝子の発現増加と成体期海馬領域での神経新生および空間記憶学習能力との関係性は見出せなかった。成人期における記憶学習障害や知的障害発症の原因となりうる胎生期脳の異常は、大脳皮質領域における神経新生異常以外にも様々なものが考えられる。例えば、胎生期脳において神経細胞の遊走が障害されると、神経細胞は脳内で適切に配置されることができず、正常な脳の発達が妨げられる (89, 90)。また、マウスにおいては、妊娠時の炎症の亢進などによってもたらされる胎生期のシナプス機能障害が、生後の知的障害につながると考えられている (91, 92)。DSモデルマウスにおいても、細胞を用いた実験系から、神経の増殖や分化能力の異常にミトコンドリアの機能異常が関わっていると報告されているが (93, 94)、このミトコンドリア機能や酸化的リン酸化に関する異常はDS患者の胎生期脳においてすでに起こっていることが報告されている (95, 96)。さらに、Ts65Dn マウスや Ts1Cje マウス胎生期脳において、抑制性神経細胞が産生される神経節隆起領域では、大脳皮質領域と違い神経新生が亢進しており (97, 98)、生後の神経活動の興奮-抑制バランスが崩壊することによって海馬機能に異常が生じると考えられている (99, 100)。このように、胎生期における脳機能異常がもたらす生後の脳機能障害は多数存在するが、DS 知的障害治療に結びつく有効なターゲットはいまだに見つかっていない。よって、DS において胎生期から成体期にかけて共通して変動する因子を同定することが、そのようなターゲットの発見につながると考えられる。

そこで本章では、第1章で解析した Ts1Cje マウス胎生期脳における遺伝子産物の発現変動と成体期海馬における遺伝子産物の発現変動を比較し、その共通点から DS モデルマウスに現れる知的障害様症状のメカニズムに関連する新たな分子の同定を試みた。

## 3-2. 実験方法

### 3-2-1. 実験動物

すべての動物実験は、京都薬科大学の動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。DSモデルマウスとして、Ts1Cje マウス、Ts1Rhr マウスおよび Dp(16)1Yey/+マウス (stock No. 013530, Jackson Laboratory) を使用した。飼育方法等については 1-2-1 と同様に行なった。

### 3-2-2. DNA マイクロアレイ

12 週齢のマウス海馬における DNA マイクロアレイは、1-2-1 と同様の方法を用いて行なった。マイクロアレイの生データは、1-2-2 と同様に GEO に寄託した (accession No. GSE160185)。

### 3-2-3. アノテーション解析

12 週齢の Ts1Cje マウス海馬において発現が変動していた遺伝子に対する Functional Annotation Clustering 解析は、DAVID v.6.8 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) を用いて 1-2-3 との方法と同様に行なった。

### 3-2-4. 定量リアルタイム RT-PCR

胎生期脳における RNA 抽出法および cDNA 合成法は 1-2-4 に示す方法と同様に行なった。12 週齢のマウス海馬については、1-2-4 に示す方法と同様に総 RNA を抽出したのち、反応溶液 20  $\mu$ L 中に総 RNA 量が 5  $\mu$ g 相当量になるように調製し逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した各 cDNA サンプルを用いて mRNA 発現量を、LightCycler<sup>®</sup> Nano システム (Roche Applied Science) を使用して解析した。定量リアルタイム PCR 反応は、TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Takara Bio) および、以下に示すプライマーを用いて行った (Table 6)。各遺伝子の mRNA 発現レベルは 36B4 遺伝子を内部標準に用いて相対的に定量した。

**Table 6. Primers used in a quantitative real-time RT-PCR.**

Shimizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 87-92, Supplementary Table S1

Gene		Sequence	Temperature (°C)	Taq polymerase
			Annealing	
36B4	F	5'- GACCTCACTGAGATTCGGGATA-3'	63	TB Green <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>
	R	5'- GGCCTAGACCACTGTTCTGAGC-3'		
Vill	F	5'- AAGAACAACCTGGAGCCTGTGC -3'	68	TB Green <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>
	R	5'- ATCAGCAACCACTTGGCCATC -3'		
Gpr65	F	5'- ATGCGTATCCTTTCTGCAAGCG -3'	63	TB Green <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>
	R	5'- AACGCCGTGCTGCTGTAAAAG -3'		
Akr1c13	F	5'- AAGCCTGCCTTGGAAAAGTCAC -3'	64	TB Green <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>
	R	5'- AGCTGCCTGTGGTTAAAGTTGG -3'		
Irx1	F	5'- TGTGTAAGGACAACCGTGACGGC -3'	63	TB Green <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>
	R	5'- ATCGGATAATCAATCCGAGCGGCA -3'		
Mthfs1	F	5'- CGGTGCTTGCCAGGAATG -3'	63	TB Green <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>
	R	5'- GCAATCACCTTCTGCGTGAG -3'		
Tbx1	F	5'- ATGCACAGATATCAGCCCCGATTCC -3'	68	TB Green <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup>
	R	5'- TGGCAATCTTAAAGTCTGCGTGATCC -3'		

### 3-2-5. 統計解析

2 群間の平均値の比較には Student の  $t$  検定を用いた。統計解析ソフトは StatMate5 ver. 5.01 (ATMS) を使用した。得られた実験値は全て平均値 $\pm$ SEM で表示し、危険率 5%以下両側を統計学的に有意差ありと判定した。

### 3-3. 実験結果

#### 3-3-1. DS モデルマウス Ts1Cje 成体期海馬における遺伝子発現解析

DS 成体期における認知機能障害の関連遺伝子を同定するために、12 週齢の Ts1Cje マウスの海馬を用いて DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。その結果、トリソミー領域内にコードされた 26 遺伝子を含む 95 遺伝子の mRNA 発現量が、WT マウスに比し Ts1Cje マウスで有意に高かった(発現量比が 1.5 倍より大きくかつ  $p < 0.05$ ) (Table 7)。また、Ts1Cje マウスのトリソミー領域の転座により生じたヘテロ欠損領域内にコードされる 2 遺伝子を含む 6 遺伝子の mRNA 発現量は、WT マウスに比し Ts1Cje マウスにおいて有意に低かった(発現量比が 0.5 倍未満かつ  $p < 0.05$ ) (Table 8)。この Ts1Cje マウス海馬のトランスクリプトーム解析において発現が変動していた遺伝子産物のうち、トリソミー遺伝子の発現変動を Figure 13 に示した。正倍数体領域 (*Sod1* 遺伝子より上流) にコードされる遺伝子は mRNA 発現量が変化しなかったが、多くのトリソミー遺伝子の mRNA 発現量は WT マウスでの発現よりも Ts1Cje マウスで 1.5 倍程度高く、遺伝子量依存的な発現上昇が認められた。しかしながら、トリソミー領域上の遺伝子である *rippy transcriptional repressor 3* (*Ripply3*)、*Kcnj15*、*Itgb2l*、*Mx1*、*Fam3b* および *Tmprss2* を含むいくつかの遺伝子の海馬における mRNA 発現量は、本実験系における検出限界を下回っていた。さらに、Ts1Cje マウスにおける *Kcncl* mRNA の発現は、WT マウスと比較して、有意差はないものの、減少傾向を示した。

マイクロアレイ解析により検出された遺伝子産物の発現変動を確かめるために、いくつかの変動遺伝子の mRNA 発現量について定量リアルタイム RT-PCR による確認を行なった (Figure 14)。マイクロアレイで用いた個体とは別の成体 Ts1Cje マウスの海馬での *villin 1* (*Vill1*)、*G-protein coupled receptor 65* (*Gpr65*)、*aldo-keto reductase family1, member C13* (*Akr1c13*)、*iroquois homeobox 1* (*Irx1*) および *Tbx1* mRNA の発現量について検討したところ、マイクロアレイの結果と同様の発現変動が確認された (*Vill1*:  $t(16) = 4.18, p = 0.004$ 、*Gpr65*:  $t(16) = 2.95, p = 0.043$ 、*Akr1c13*:  $t(16) = 4.71, p = 0.0017$ 、*Irx1*:  $t(16) = 6.31, p = 5.4E-6$ 、*Tbx1*:  $t(16) = 6.74, p = 1.2E-6$ ) (Figure 14)。また、*5,10-methylenetetrahydrofolate synthetase-like 1* (*Mthfsl*) 遺伝子の mRNA 発現量は Ts1Cje マウスでは WT マウスよりも低い傾向を示したが、有意ではなかった ( $t(16) = 1.75, p = 0.071$ ) (Figure 14)。

マイクロアレイ解析によって同定された Ts1Cje マウス成体期海馬における発現変動遺伝子群の機能的特徴について調べるために、発現変動が確認された 101 遺伝子に対して DAVID を用いた Functional Annotation Clustering 解析を行った。その結果、“defense response to virus”、“type I interferon receptor activity”、“Measles”、“type I interferon signaling pathway”、“aging”、“Influenza A”、“positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade”および“response to virus”などの遺伝子クラスターが検出された (Table 9)。

**Table 7. The upregulated transcripts in adult Ts1Cje hippocampus at 12-week-old.**

Values are expressed as the fold change compared to the WT value. Genes were selected based on a *p*-value threshold of 0.05 and a minimum fold-change absolute value of 1.5 (n = 4 in each group).

Shimizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 87-92, Supplementary Table S2.

GeneSymbol	Gene name	Probe_Name (Agilent)	Fold Change	<i>p</i> -value
<i>Dnahc11**</i>	<i>heavy chain 11</i>	A_55_P2119907	123.518	1.65E-08
<i>Vmn1r197</i>	<i>vomeronasal 1 receptor 197</i>	A_55_P2050169	3.684	4.47E-02
<i>Dopey2*</i>	<i>dopey family member 2</i>	A_55_P2029203	2.146	3.99E-04
<i>Vil1</i>	<i>villin 1</i>	A_52_P260555	2.095	2.89E-02
<i>Vmn2r16</i>	<i>vomeronasal 2, receptor 16</i>	A_55_P1970887	2.005	8.69E-04
<i>Gpr65</i>	<i>G-protein coupled receptor 65</i>	A_51_P108459	2.004	1.65E-02
<i>Sgca</i>	<i>sarcoglycan, alpha (dystrophin-associated glycoprotein)</i>	A_55_P2007384	2.001	3.13E-02
<i>Olfr868</i>	<i>olfactory receptor 868</i>	A_51_P120823	1.988	9.00E-03
<i>Akr1c13</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member C13</i>	A_66_P132249	1.952	4.55E-03
<i>Rpe65</i>	<i>retinal pigment epithelium 65</i>	A_55_P2043237	1.896	3.86E-02
<i>C130093G08Rik</i>	<i>RIKEN cDNA C130093G08 gene</i>	A_55_P2422164	1.883	1.76E-02
<i>C2cd2*</i>	<i>C2 calcium-dependent domain containing 2</i>	A_52_P330950	1.806	7.11E-03
<i>Lrrc25</i>	<i>leucine rich repeat containing 25</i>	A_51_P108108	1.799	5.14E-03
<i>Slc25a34</i>	<i>solute carrier family 25, member 34</i>	A_55_P2073248	1.792	4.25E-02
<i>Vmn2r17</i>	<i>vomeronasal 2, receptor 17</i>	A_55_P2183924	1.783	2.58E-02
<i>Gcg</i>	<i>glucagon</i>	A_51_P406253	1.78	4.07E-02
<i>Folr2</i>	<i>folate receptor 2 (fetal)</i>	A_51_P162671	1.768	8.58E-03
<i>Cd36</i>	<i>CD36 antigen</i>	A_51_P375146	1.741	1.66E-02
<i>Ptpnb</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, B</i>	A_51_P290931	1.741	3.07E-03
<i>A930006K02Rik</i>	<i>RIKEN cDNA A930006K02 gene</i>	A_55_P2206461	1.727	2.55E-04
<i>Sod1*</i>	<i>superoxide dismutase 1, soluble</i>	A_55_P2177539	1.727	4.29E-07
<i>Spem1</i>	<i>sperm maturation 1</i>	A_52_P115541	1.72	2.19E-03
<i>Erdrl</i>	<i>erythroid differentiation regulator 1</i>	A_55_P2034481	1.706	7.72E-03
<i>Ube1y1</i>	<i>ubiquitin-activating enzyme E1, Chr Y 1</i>	A_55_P1987424	1.698	4.25E-04
<i>Runx1*</i>	<i>runt related transcription factor 1</i>	A_55_P2183438	1.697	4.32E-02
<i>Erg*</i>	<i>avian erythroblastosis virus E-26 (v-ets) oncogene related</i>	A_55_P2015862	1.694	2.96E-02
<i>Ifnar2*</i>	<i>interferon (alpha and beta) receptor 2</i>	A_52_P190405	1.683	2.20E-05
<i>Gm15535</i>	<i>predicted gene 15535</i>	A_55_P2125791	1.681	9.27E-03
<i>Alox12</i>	<i>arachidonate 12-lipoxygenase</i>	A_52_P467449	1.68	2.02E-03
<i>Oas2</i>	<i>2'-5' oligoadenylate synthetase 2</i>	A_55_P2019719	1.68	1.99E-03
<i>Chaf1b*</i>	<i>chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)</i>	A_51_P367310	1.678	4.48E-04
<i>Kcnj6*</i>	<i>potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6</i>	A_52_P191086	1.673	1.44E-03
<i>Gm10632</i>	<i>predicted gene 10632</i>	A_55_P2053575	1.671	3.30E-02
<i>Gm3853</i>	<i>predicted gene 3853</i>	A_55_P2142453	1.671	2.72E-02
<i>Bcl2l15</i>	<i>BCL2-like 15</i>	A_55_P1975877	1.666	8.74E-03
<i>Orly</i>	<i>oppositely-transcribed, rearranged locus on the Y</i>	A_55_P1953540	1.661	8.92E-04
<i>Olfr691</i>	<i>olfactory receptor 691</i>	A_51_P309998	1.66	7.41E-03
<i>Rnf207</i>	<i>ring finger protein 207</i>	A_66_P115693	1.655	3.63E-04
<i>Nars2</i>	<i>asparaginyl-tRNA synthetase 2 (mitochondrial)(putative)</i>	A_51_P426994	1.649	2.84E-02
<i>4930447C04Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4930447C04 gene</i>	A_52_P420369	1.647	2.41E-03
<i>Rnase1</i>	<i>ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)</i>	A_52_P249798	1.641	6.84E-03
<i>Znf41-ps</i>	<i>ZNF41, pseudogene</i>	A_55_P2121151	1.635	6.92E-03
<i>Ifi2712a</i>	<i>interferon, alpha-inducible protein 27 like 2A</i>	A_52_P90363	1.633	2.94E-02
<i>Klhl15</i>	<i>kelch-like 15</i>	A_55_P2021368	1.632	1.30E-02
<i>Hmgcs2</i>	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2</i>	A_55_P2109033	1.628	3.69E-02
<i>Clic6*</i>	<i>chloride intracellular channel 6</i>	A_52_P447284	1.624	2.53E-02
<i>Gsta2</i>	<i>glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)</i>	A_55_P2170454	1.618	6.77E-03
<i>Ifnar1*</i>	<i>interferon (alpha and beta) receptor 1 (Ifnar1)</i>	A_55_P2454784	1.611	1.06E-04
<i>4930473H19Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4930473H19 gene</i>	A_55_P2396312	1.611	1.16E-02
<i>Sh2d7</i>	<i>SH2 domain containing 7</i>	A_55_P2135516	1.611	1.52E-03

<i>Mx2*</i>	<i>myxovirus (influenza virus) resistance 2 (Mx2)</i>	A_51_P514085	1.609	3.35E-03
<i>Gbp4</i>	<i>guanylate binding protein 4 (Gbp4)</i>	A_55_P2103837	1.603	3.21E-02
<i>Donson*</i>	<i>downstream neighbor of SON</i>	A_55_P1981739	1.602	9.92E-05
<i>Setd4*</i>	<i>SET domain containing 4</i>	A_55_P2052425	1.601	3.04E-04
<i>Paxbp1*</i>	<i>PAX3 and PAX7 binding protein 1</i>	A_52_P478745	1.601	2.95E-03
<i>Hbq1a</i>	<i>hemoglobin, theta 1A</i>	A_51_P185869	1.597	2.15E-02
<i>B230307C23Rik</i>	<i>RIKEN cDNA B230307C23 gene</i>	A_55_P2032297	1.585	1.67E-05
<i>Masp2</i>	<i>mannan-binding lectin serine peptidase 2</i>	A_55_P1990500	1.582	1.53E-02
<i>Dyrk1a*</i>	<i>dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1a</i>	A_51_P313483	1.581	1.15E-06
<i>Dscam*</i>	<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i>	A_51_P189943	1.581	2.60E-05
<i>Gm13023</i>	<i>predicted gene 13023</i>	A_52_P175679	1.578	5.16E-06
<i>Gpr158</i>	<i>G protein-coupled receptor 158</i>	A_55_P2157730	1.576	2.10E-02
<i>Itk</i>	<i>IL2 inducible T cell kinase</i>	A_55_P1953788	1.573	1.23E-02
<i>Sim2*</i>	<i>single-minded homolog 2</i>	A_55_P2190426	1.568	4.51E-03
<i>Esr1</i>	<i>estrogen receptor 1 (alpha)</i>	A_52_P237077	1.564	3.20E-02
<i>Yy2</i>	<i>Yy2 transcription factor</i>	A_55_P2014347	1.561	4.36E-02
<i>Papln</i>	<i>papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein</i>	A_55_P2071526	1.56	3.25E-02
<i>Hlcs*</i>	<i>holocarboxylase synthetase (biotin- [propionyl-Coenzyme A-carboxylase (ATP-hydrolysing)] ligase)</i>	A_51_P176912	1.551	1.58E-04
<i>Kcne2*</i>	<i>potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 2</i>	A_55_P1979242	1.55	4.98E-02
<i>Lgals3bp</i>	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein</i>	A_51_P359636	1.548	9.16E-05
<i>4921534A09Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4921534A09 gene</i>	A_55_P2064721	1.548	2.20E-02
<i>Dscr3*</i>	<i>Down syndrome critical region gene 3</i>	A_51_P508191	1.546	1.40E-04
<i>Pcp4*</i>	<i>Purkinje cell protein 4</i>	A_51_P253984	1.543	2.33E-06
<i>Mylk3</i>	<i>myosin light chain kinase 3</i>	A_55_P1990870	1.542	1.38E-02
<i>Frem3</i>	<i>Fras1 related extracellular matrix protein 3</i>	A_55_P2114059	1.541	7.63E-03
<i>Scgb1a1</i>	<i>secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)</i>	A_51_P128575	1.54	3.81E-03
<i>6330407A03Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 6330407A03 gene</i>	A_55_P2238406	1.539	3.21E-02
<i>Sdr9c7</i>	<i>4short chain dehydrogenase/reductase family 9C, member 7</i>	A_52_P670188	1.536	2.03E-03
<i>Sap25</i>	<i>sin3 associated polypeptide</i>	A_52_P38964	1.534	3.59E-02
<i>4930432N10Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4930432N10 gene</i>	A_55_P2208836	1.532	3.91E-02
<i>Ttc3*</i>	<i>tetratricopeptide repeat domain 3</i>	A_66_P106065	1.531	2.27E-04
<i>Gm14025</i>	<i>predicted gene 14025</i>	A_55_P2044992	1.529	1.99E-02
<i>Psmg1*</i>	<i>proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 1</i>	A_55_P2091671	1.527	1.05E-05
<i>Il10rb*</i>	<i>interleukin 10 receptor, beta</i>	A_55_P2181109	1.526	5.96E-04
<i>Asic4</i>	<i>acid-sensing (proton-gated) ion channel family member 4</i>	A_55_P2162747	1.525	1.14E-02
<i>Cryz11*</i>	<i>crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1 (Cryz11)</i>	A_55_P2068330	1.523	2.09E-06
<i>Msh4</i>	<i>mutS homolog 4 (E. coli) (Msh4)</i>	A_55_P2097773	1.52	2.14E-02
<i>Pla2g5</i>	<i>phospholipase A2, group V (Pla2g5)</i>	A_55_P1962693	1.514	4.58E-02
<i>Eva1c*</i>	<i>eva-1 homolog C (C. elegans)</i>	A_55_P2101920	1.512	8.69E-03
<i>Slc1a5</i>	<i>solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5</i>	A_51_P453475	1.507	3.49E-03
<i>Usp24</i>	<i>ubiquitin specific peptidase 24</i>	A_51_P480320	1.506	4.79E-02
<i>Gm13157</i>	<i>predicted gene 13157</i>	A_55_P2008722	1.505	2.77E-03
<i>Ugt2a1</i>	<i>UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A1</i>	A_55_P2098640	1.505	2.55E-02
<i>Gm3004</i>	<i>predicted gene 3004</i>	A_55_P2042600	1.503	5.59E-04
<i>Rspr1</i>	<i>ring finger and SPRY domain containing 1</i>	A_55_P2157335	1.502	1.63E-02

\*differentially expressed genes from the triplicated MMU16 region in Ts1Cje mice.

\*\*differentially expressed genes from the monosomic MMU12 region in Ts1Cje mice.



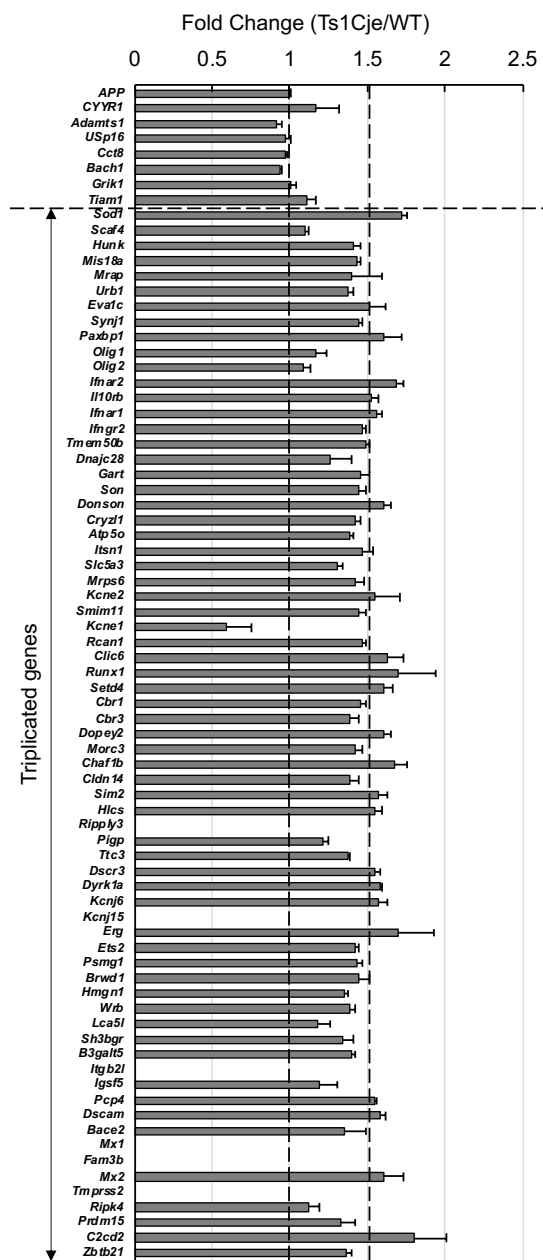
**Table 8. The downregulated transcripts in adult Ts1Cje hippocampus at 12-week-old.**

Values are expressed as fold change compared to the WT value. Genes were selected based on a *p*-value threshold of 0.05 and a max fold-change absolute value of 0.5 (n = 4 in each group).

Shimizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 87-92, Supplementary Table S3.

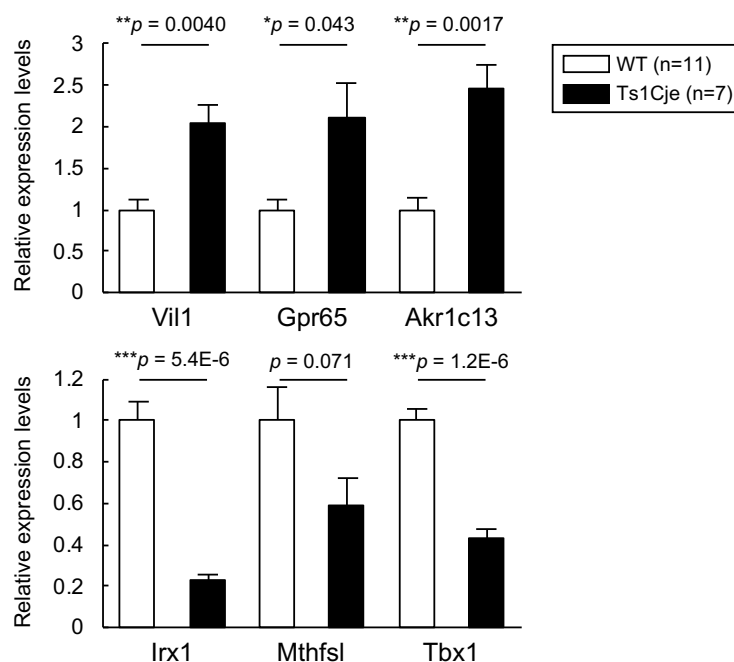
GeneSymbol	Gene name	Probe_Name (Agilent)	Fold Change	<i>p</i> -value
<i>Irx1</i>	<i>Iroquois related homeobox 1 (Drosophila)</i>	A_52_P1092823	0.271	0.001
<i>Mthfs1</i>	<i>5, 10-methenyltetrahydrofolate synthetase-like</i>	A_55_P1963384	0.409	0.039
<i>4930412L05Rik</i>	<i>lipid responsive LXR-induced inhibitor of cholesterol synthesis 1</i>	A_55_P2299186	0.443	0.004
<i>Itgb8*</i>	<i>integrin beta 8</i>	A_55_P1998244	0.46	0.003
<i>Tmem196*</i>	<i>transmembrane protein 196</i>	A_55_P2042738	0.492	0.003
<i>Tbx1</i>	<i>T-box 1</i>	A_55_P2051716	0.495	0.002

\*differentially expressed genes from the monosomic MMU12 region in Ts1Cje mice.



**Figure 13. The dose-dependent overexpression of genes in the trisomic region of the hippocampus of adult Ts1Cje mice.**

Genes are arranged from the proximal end (top) to the distal end (bottom) of the MMU16 according to the mapping data of the NCBI Mouse Genome Resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term1/4mus%20musculus>). The region marked by the arrows is the triplicated segment in Ts1Cje. Shimizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 87-92, Figure 1.



**Figure 14. The differentially expressed genes on non-MMU16 aneuploid in Ts1Cje mice.** The expression of *Vil1*, *Gpr65*, *Akrlc13*, *Irx1*, *Mthfsl* and *Tbx1* mRNAs in the adult hippocampus (12-week-old) of Ts1Cje and WT males was measured by a quantitative real-time RT-PCR. The expression of *36B4* mRNA was used as an internal control. Each value represents the mean ratio  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined with Student's *t*-test (n = 11 (WT), n = 7 (Ts1Cje), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT). Shimizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 87-92, Figure 2.

**Table 9. Functional pathway enrichment by DAVID on differentially expressed genes in adult hippocampus.**

Shimizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 87-92, Supplementary Table 1.

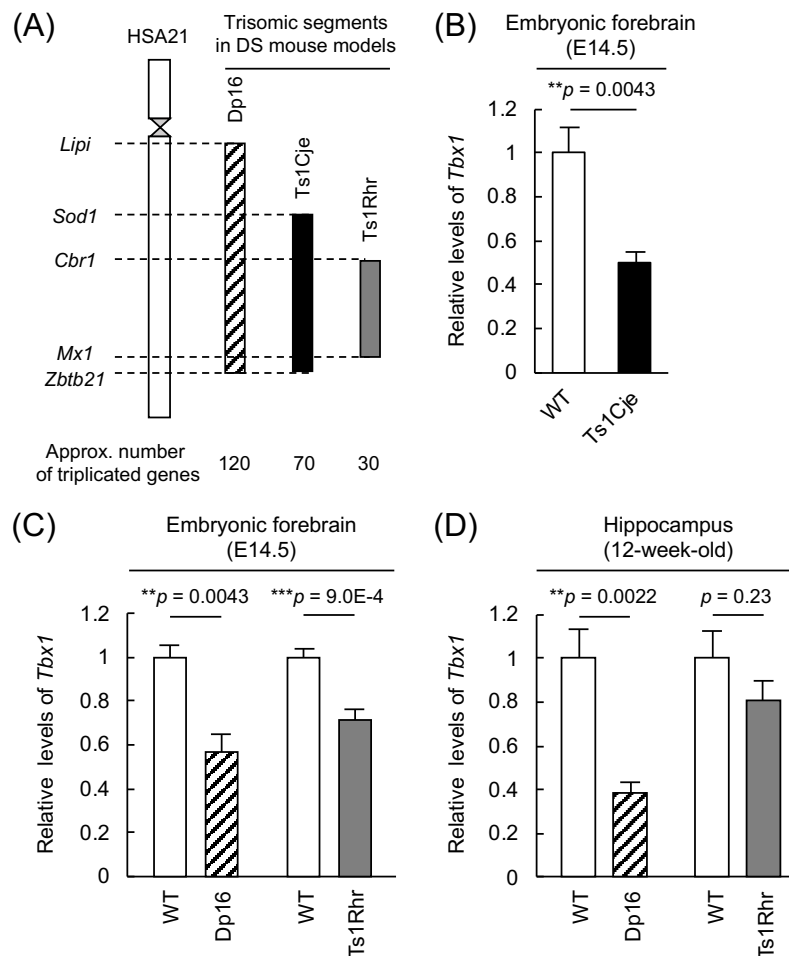
Category	Term	Count	Gene ratio (%)	p-value	Gene IDs	List Total	Pop Hits
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0051607~ defense response to virus	5	5.051	0.0054	<i>Oas2</i> , <i>Ifnar1*</i> , <i>Ifnar2*</i> , <i>Il10rb*</i> , <i>Mx2*</i>	77	167
GOTERM_MF_DIRECT	GO:0004905~type I interferon receptor activity	2	2.02	0.0084	<i>Ifnar1*</i> , <i>Ifnar2*</i>	74	2
KEGG_PATHWAY	mmu05162:Measles	4	4.04	0.0234	<i>Oas2</i> , <i>Ifnar1*</i> , <i>Ifnar2*</i> , <i>Mx2*</i>	36	136
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0060337~type I interferon signaling pathway	2	2.02	0.025	<i>Ifnar1*</i> , <i>Ifnar2*</i>	77	6
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0007568~aging	4	4.04	0.0364	<i>Alox12</i> , <i>Sod1*</i> , <i>Kcne2*</i> , <i>Ifi2712a</i>	77	173
KEGG_PATHWAY	mmu05164: Influenza A	4	4.04	0.042	<i>Oas2</i> , <i>Ifnar1*</i> , <i>Ifnar2*</i> , <i>Mx2*</i>	36	171
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0070374~ positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	4	4.04	0.0448	<i>Gcg</i> , <i>Cd36</i> , <i>Pla2g5</i> , <i>Esr1</i>	77	188
GOTERM_BP_DIRECT	GO:0009615~response to virus	3	3.03	0.0487	<i>Oas2</i> , <i>Ifi2712a</i> , <i>Mx2*</i>	77	84

\*differentially expressed genes from triplicated Mmu16 region in Ts1Cje mice.

### 3-3-2. 複数の DS モデルマウスにおける *Tbx1* 遺伝子発現の減少

第1章で示した Ts1Cje マウス胎生期脳での発現変動遺伝子と成体期海馬における発現変動遺伝子を比較すると、遺伝子のコピー数異常に由来する発現変動遺伝子以外では唯一 *Tbx1* 遺伝子のみ、共通して発現が減少していた (Tables 4, 8)。そこで、*Tbx1* mRNA の発現減少が Ts1Cje マウスの胎生期脳の異常や記憶学習障害を含む出生後の異常に関与する可能性があると考えた。Ts1Cje マウス胎生期脳での *Tbx1* mRNA 発現量の低下は、定量リアルタイム RT-PCR 法により確認した (Figure 15 B)。さらに、Ts1Cje マウスよりも長い約 120 遺伝子がコードされたトリソミー領域をもつ Dp(16)1Yey/+マウスと Ts1Cje マウスのトリソミー領域よりも短い約

30 遺伝子がコードされたトリソミー領域をもつ Ts1Rhr マウス (Figure 15A) の E14.5 胎生期脳および 12 週齢の成体海馬における *Tbx1* mRNA の発現を検討したところ、Dp(16)1Yey/+ マウスでは Ts1Cje マウスと同様、E14.5 脳および成体海馬において *Tbx1* mRNA の発現が WT マウスに比し半減していた (E14.5:  $t(9) = 4.08, p = 0.0043$ 、12-week-old:  $t(11) = 3.47, p = 0.0022$ ) (Figure 15C, D)。一方、Ts1Rhr マウスにおいては、胎生期脳では *Tbx1* mRNA の発現が有意に減少していたが、成体期海馬においては *Tbx1* mRNA の発現は変化していなかった (E14.5:  $t(18) = 4.06, p = 9.0E-4$ 、12-week-old:  $t(20) = 1.18, p = 0.23$ ) (Figure 15C, D)。



**Figure 15. The expression of *Tbx1* mRNA was decreased in mouse models of DS other than Ts1Cje mice.**

(A) Trisomic segments of the DS mouse models Dp(16)1Yey/+ (Dp16), Ts1Cje and Ts1Rhr mice. The approximate number of protein-coding genes is based on the data of NCBI Mouse Genome Resource (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=mus%20musculus>). (B-D) The expression of *Tbx1* mRNA in the forebrains of Ts1Cje (B) Dp16 and Ts1Rhr males (C) at E14.5 and adult hippocampus of Dp16 and Ts1Rhr males (D) was quantified by a quantitative real-time RT-PCR (E14.5 Ts1Cje,  $n = 7$  [WT],  $n = 14$  [Ts1Cje]; E14.5 Dp16,  $n = 6$  [WT],  $n = 5$  [Dp16]; E14.5 Ts1Rhr,  $n = 12$  [WT],  $n = 8$  [Ts1Rhr]; 12-week-old Dp16,  $n = 8$  [WT],  $n = 5$  [Dp16]; 12-week-old Ts1Rhr,  $n = 12$  [WT],  $n = 10$  [Ts1Rhr]). Values are presented as the mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined with Student's *t*-test ( $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  vs. WT). Shimizu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 87-92, Figure 3.

### 3-4. 考察

本研究では、マイクロアレイ解析の結果に基づいて成体 Ts1Cje マウス海馬における発現変動遺伝子を同定した。トリソミー領域上の遺伝子のほとんどは、Ts1Cje マウスで WT マウスと比較して 1.5 倍程度有意に増加しており、この結果は、実験試料としたマウスの週齢などの時期や脳の部位に関わらず、既報のトランスクリプトーム解析結果と一致している (55, 57, 101)。また、一部トリソミー領域上の遺伝子の発現が検出されなかったが、これらの遺伝子は第 1 章と同様に成体期海馬において発現していないまたは発現が顕著に少ない遺伝子であると考えられる。しかし、本研究でのマイクロアレイ解析では、Ts1Cje マウスでの *Olig1* および *Olig2* 遺伝子の mRNA 発現は、WT マウスに比しわずかに多い程度であった。両遺伝子の同様の発現パターンは、8-10 週齢の Ts1Cje マウス海馬でのトランスクリプトーム解析結果 (57) と一致するが、より老齢の 6-7 ヶ月齢の Ts1Cje マウス海馬でのトランスクリプトーム解析結果では *Olig1* および *Olig2* 遺伝子の遺伝子量依存的な mRNA 発現量の増加が報告されている (55)。したがって、Ts1Cje マウス海馬における *Olig1* および *Olig2* mRNA の遺伝子量依存的な発現量の増加は、マウスの加齢による影響を受ける可能性が考えられる。さらに、DAVID を使用したアノテーション解析では、トリソミー領域にある *interferon alpha/beta receptor 1 (Ifnar1)* および *Ifnar2* 遺伝子の発現量増加によって引き起こされるインターフェロン分子関連のクラスターが検出された。この特徴は、以前に報告された成体 Ts1Cje マウス海馬におけるマイクロアレイ分析結果に基づく DAVID 分析結果と一致している (55, 57)。よってこれらの遺伝子の発現増加は第 1 章において胎生期で観察されたような炎症関連遺伝子の発現とは関係がなく、Ts1Cje マウスにおいて一般的な遺伝子発現変動であると考えられる。

胎生期脳におけるマイクロアレイ解析のデータ (第 1 章) との比較から、Ts1Cje マウスの胎生期脳と成体期海馬において、共通して *Tbx1* mRNA の発現が有意に減少していることがわかった。さらに、モリス水迷路試験を用いて記憶学習障害が観測されている *Dp(16)1Yey/+* (27) および Ts1Cje マウス (22) では、成体期海馬での *Tbx1* mRNA 発現が顕著に減少していたのに対して、モリス水迷路試験では記憶学習障害を示さない Ts1Rhr マウス (25) においては *Tbx1* mRNA の発現が有意に減少していなかったことから、本遺伝子が記憶学習障害に関与している可能性があると考えられる。TBX1 は、T-box ファミリーと呼ばれる転写制御因子群のメンバーである。ヒト *Tbx1* 遺伝子は HSA 22q11 領域上に存在しており、22q11.2 欠失症候群 (DiGeorge 症候群とも呼ばれる) 患者においてヘテロ接合で欠失している。最も一般的な生存可能なヒトの遺伝子欠失障害である DiGeorge 症候群は、先天性心疾患、顔面異形症、口蓋異常、免疫不全など DS と共通した症状を呈することが知られているほか (102)、本症候群の患者は、学習障害や精神病、特に統合失調症のリスクが高いなどの中枢神経系における臨床的問題を抱えているとされている (103)。それゆえ、TBX1 は DiGeorge 症候群の脳表現型に関連する原因因子と考えられている (104)。実際、*Tbx1* 遺伝子のハプロ不全は成体マウスの行動異常や大脳皮質異形成に関連することが示唆されている (105, 106)。これらの報告も考慮すると、*Tbx1* 遺伝子の発現低下は、DS における胎児の脳発達遅滞および知的障害発症に関与している可能性がある。

*Tbx1* mRNA の発現は、Ts1Rhr マウスの胎生期脳では WT マウスに比し 7 割程度ではあつ

たが有意性をもって減少していた。一方、Ts1Rhr マウスの成体期海馬では *Tbx1* mRNA の発現は変化しなかった。Ts1Cje マウスにおいて、それが両時期で半減していることを考慮すると、胎生期での *Tbx1* mRNA の発現減少の原因遺伝子は、少なくとも Ts1Rhr マウスのトリソミー領域上に存在しており、成体期での知見からは、Ts1Rhr マウスのトリソミー領域を除く Ts1Cje マウスのトリソミー領域上の遺伝子が *Tbx1* mRNA の発現減少に関与することが考えられる。また、時期による発現変動の違いから、Ts1Rhr マウスのトリソミー領域上に存在する原因遺伝子は胎生期脳では発現しているが、成体期海馬では発現していないか、非常に発現量が低い遺伝子である可能性がある。*Tbx1* 遺伝子の発現を調節する原因遺伝子の候補として、Ts1Rhr マウスのトリソミー領域にコードされている *Ripply3* 遺伝子が挙げられる。*Ripply3* mRNA の発現量は、Ts1Cje 胎生期脳においては増加していたが (Figure 2)、成体期海馬においては検出限界以下であったことから (Figure 13)、*Ripply3* 遺伝子は DS での *Tbx1* mRNA 発現の減少に関与している可能性がある。また、RIPPLY3 は TBX1 の転写活性を抑制することも報告されているため (107)、DS マウスモデルの胎生期脳では *Tbx1* 遺伝子の mRNA 発現の減少に加えて、TBX1 活性が相加的に低下しているかもしれない。また、*Tbx1* 遺伝子の欠損は、胎生期の脳血管新生 (108) および皮質形成異常 (106) を引き起こすことが示されているため、DS モデルマウスの胎生期脳における TBX1 の不活性化が胎生期脳発達遅滞に関与している可能性が考えられる。

TBX1 は、DiGeorge 症候群の心血管、胸腺、副甲状腺などにおける異常表現型に関与する遺伝子として同定されている (109)。興味深いことに、DS と DiGeorge 症候群は、易感染性、T 細胞の発達障害、胸腺における中枢性免疫寛容障害など、いくつかの免疫学的な特徴が共通している (110-112)。これらのことを踏まえると、本研究の成果からは、*Tbx1* 遺伝子という DS と DiGeorge 症候群とに共通した原因遺伝子を提示できたと考える。今後、*Tbx1* 遺伝子を研究対象とした DS と DiGeorge 症候群との関連性に関する研究が、各病態の解明につながると考えられる。

本研究は、*Tbx1* 遺伝子の発現が WT マウスに比し DS モデルマウスで有意に低いことを初めて明らかにした。胎生期脳と成体期海馬の両方で発現の減少している本遺伝子は、DS の病態研究における新しい知見である。さらなる研究が必要ではあるが、DS の病態における本遺伝子の役割を解明することが、DS 患者の知的障害などの中枢神経系異常表現型のメカニズム解明への新しい知見をもたらすと期待する。

### 3-5. 小括

本章では 12 週齢の Ts1Cje マウス海馬におけるトランスクリプトーム解析を行い、以下の知見を得た。

1. 12 週齢の Ts1Cje マウス海馬において、胎生期において観察されたような炎症性細胞で高発現する炎症関連遺伝子群の発現増加は検出されなかった。
2. Ts1Cje マウスの胎生期脳および成体期海馬、両領域において *Tbx1* 遺伝子の mRNA 発現が共通して半減していた。
3. Dp(16)1Yey/+マウスの胎生期脳および成体期海馬、両領域において *Tbx1* 遺伝子の mRNA 発現が共通して減少していたが、Ts1Rhr マウスにおいては胎生期脳においてのみ有意に発現が減少していた。

以上の知見より、DS マウスで認められる記憶学習障害と *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。

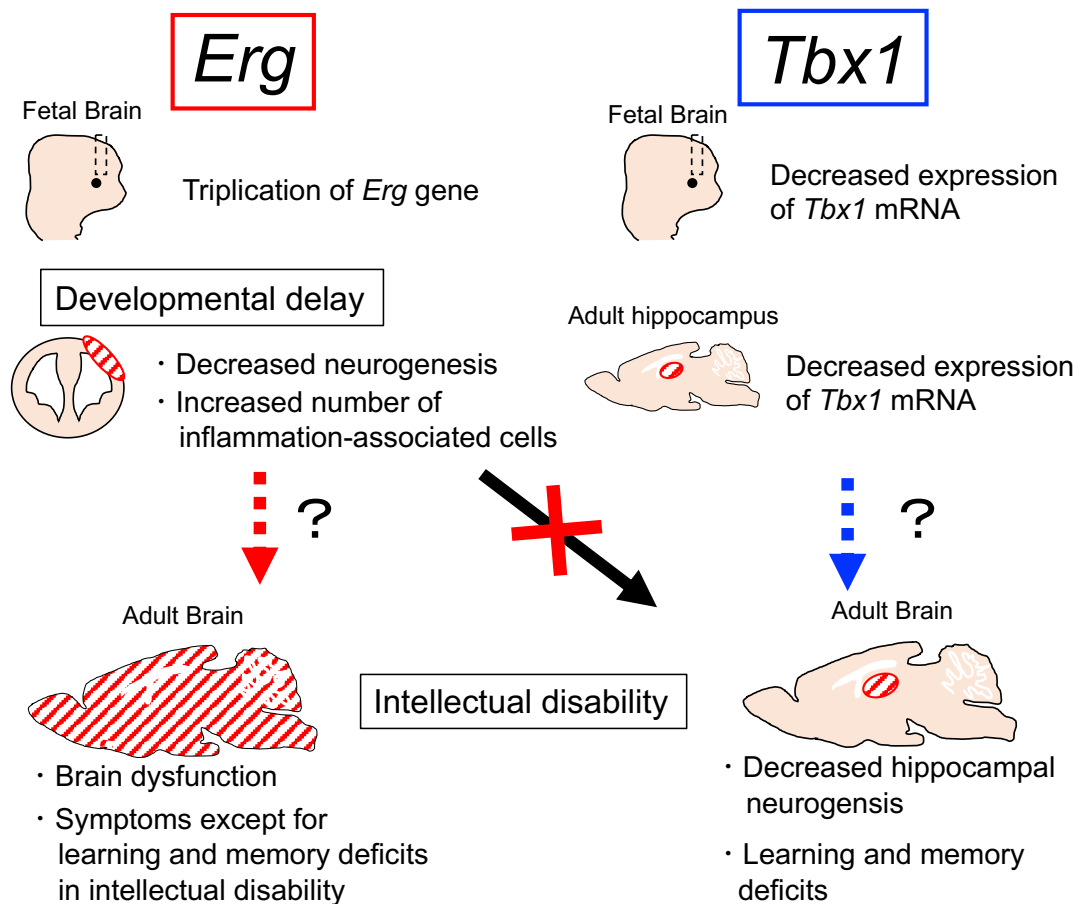
## 総括

本研究では、DS の知的障害における胎生期脳発達遅滞との関連性や、胎生期脳発達遅滞および知的障害の症状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、脳発達遅滞と記憶学習障害と関連性について検証を試みた。第 1 章では、E14.5 の Ts1Cje マウス脳のトランスクリプトーム解析を行い、脳発達遅滞に関連する分子を同定し、さらにその原因遺伝子を探索した。第 2 章では、第 1 章で同定した原因遺伝子の中樞神経系異常における役割を検証した。第 3 章では、知的障害の症状に関連する分子の同定を目的として、Ts1Cje マウスの成体期海馬のトランスクリプトーム解析を行い、第 1 章のトランスクリプトーム解析結果と比較することで、知的障害発症に関連する分子を探索した。これらの検証結果から、以下の知見を得た。

1. Ts1Cje マウスの胎生期脳では、炎症性細胞数の増加によると推察される炎症関連遺伝子の発現が増加していた。また、Ts1Cje マウス胎生期脳での脳内マクロファージ数は減少していたが、その多くが炎症性の形態であった。これらの Ts1Cje マウスの異常表現型の原因が *Erg* 遺伝子の 3 コピー化であることを、*Erg* 遺伝子のみを 2 コピーとした Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスを作出・解析することで明らかとした。
2. Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスでは、Ts1Cje マウスで観察される胎生期大脳皮質領域における神経新生の低下が認められなかったことから、脳発達遅滞は *Erg* 遺伝子の 3 コピー化が一因であることを明らかとした。一方、Ts1Cje-*Erg*<sup>+/+mld2</sup> マウスでも Ts1Cje マウスと同様の記憶学習障害の傾向を示したことから、脳発達遅滞が成体期における記憶学習障害に関与していない可能性が示された。
3. Ts1Cje マウスの成体期海馬のトランスクリプトーム解析では、胎生期脳で認められた炎症関連遺伝子群の mRNA 発現増加は検出されなかったが、胎生期脳と成体期海馬の両時期において唯一共通して mRNA 発現が半減している *Tbx1* 遺伝子を発見した。さらに、他の DS モデルマウスを用いた検討では、モリス水迷路試験で空間記憶学習障害を示すモデルマウスでのみ、成体期で本遺伝子の mRNA 発現が減少していたことから、*Tbx1* 遺伝子の発現減少が DS 知的障害に関連している可能性が考えられた。

以上本研究において明らかとしたことを Figure 16 にまとめた。DS モデルマウスのトリソミー領域に存在する *Erg* 遺伝子の発現増加が胎生期脳発達遅滞の一因であったが、*Erg* 遺伝子の 3 コピー化と記憶学習障害との関連性は見出せなかった。知的障害としては、記憶学習障害の他にも言語発達の遅れなど様々な症状が知られており、ERG 発現増加に伴う胎生期脳発達遅滞が記憶学習障害以外の知的障害の症状に関与している可能性は十分に考えられる。一方で、Ts1Cje マウス胎生期脳および成体期海馬において、*Tbx1* 遺伝子の発現が共通して半減していた。*Tbx1* 遺伝子は知的障害など DS と類似した症状を呈する 22q11.2 欠失症候群の欠失領域に存在し、その多くの症状の主な責任遺伝子であると考えられていることから、*Tbx1* 遺伝子の発現減少が DS 知的障害に関連している可能性は高いと考えられる。さらに、記憶学習障害が軽度である DS モデルマウスでは、成体期海馬での *Tbx1* mRNA の発現がほと

んど減少していなかったことから、*Tbx1* 遺伝子は特に記憶学習障害に関与する可能性が考えられた。今後は、*Tbx1* 遺伝子の発現減少の原因であるトリソミー領域遺伝子を同定し、記憶学習障害への関与を明らかにする必要がある。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。これら両遺伝子は、DS の発達遅滞・知的障害の治療標的となる可能性が期待され、本研究成果は DS の薬物治療の実現化の礎となると考えられる。



**Figure 16. The working model of *Erg* and *Tbx1* genes in DS intellectual disability.**



## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学病態生化学分野の秋葉聡教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり、ご助言とご高閲を賜りました京都薬科大学衛生化学分野の長澤一樹教授ならびに京都薬科大学生化学分野の中山祐治教授に深謝し厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧なご指導と激励を賜りました京都薬科大学病態生化学分野の石原慶一准教授に深厚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、Ets2<sup>+/-</sup>マウスをご供与いただきました、名古屋市立大学の山川和弘教授および Erg<sup>mid2/+</sup>マウスをご供与いただきました Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research の Warren S. Alexander 教授に謹んで深く感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、実験にご協力および種々の貴重なご助言、ご指導を賜りました、京都薬科大学統合薬科学系の高田和幸教授ならびに京都薬科大学病態生化学分野の河下映里助教、国立研究開発法人国立成育医療研究センターの左合治彦副院長、摂南大学の奈邊健教授、神戸学院大学薬学部の水谷健一特任教授、シンガポール Agency for Science, Technology and Research の Florent Ginhoux 博士、同 Donovan Low 博士、元理化学研究所神経遺伝研究チームの研究員（現東邦大学医療センター大森病院）の天野賢治博士、元理化学研究所神経遺伝研究チームの研究員（現日本医科大学）の下畑充志博士に心より御礼申し上げます。

そして、京都薬科大学病態生化学分野および同卒業生の諸氏、特に実験にご協力頂いた山本美穂氏、竹腰良輔氏、都志見文子氏、中野愛理氏、杉本早希氏、京都薬科大学病態生理学分野の金田生乃氏に深く御礼申し上げます。

また、末筆ながら、大学院生活を送るにあたり、ご指導、ご鞭撻、激励をいただきました先生方、他分野の大学院生の皆様に感謝の意を表すると共に益々のご活躍を祈念致します。

最後に、4年間の長きにわたり陰ながら生活面・精神面ならびに健康面で支えていただきました家族に深く感謝の意を表します。

## 参考文献

1. Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP, Sherman SL. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and national Down syndrome projects. *Hum. Genet.* **2009**, 125, 41-52.
2. Ghosh S, Feingold E, Dey SK. Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction, and maternal age across populations. *Am. J. Med. Genet. A.* **2009**, 149A, 1415-1420.
3. Saifee M, Kong L, Yen KG. Outcomes of cataract surgery in children with Down syndrome. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **2017**, 12, 243-244.
4. Sun R, Liu M, Lu L, Zheng Y, Zhang P. Congenital heart disease: causes, diagnosis, symptoms, and treatments. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, 72, 857-860.
5. Santoro JD, Pagarkar D, Chu DT, Rosso M, Paulsen KC, Levitt P, Rafii MS. Neurologic complications of Down syndrome: a systematic review. *J. Neurol.* **2020**, doi: 10.1007/s00415-020-10179-w.
6. Karam SM, Riegel M, Segal SL, Félix TM, Barros AJ, Santos IS, Matijasevich A, Giugliani R, Black M. Genetic causes of intellectual disability in a birth cohort: a population-based study. *Am. J. Med. Genet. A.* **2015**, 167, 1204-1214.
7. Bull MJ. Health supervision for children with Down syndrome. *Pediatrics* **2011**, 128, 393-406.
8. Määttä T, Tervo-Määttä T, Taanila A, Kaski M, Iivanainen M. Mental health, behaviour and intellectual abilities of people with Down syndrome. *Downs Syndr. Res. Pract.* **2006**, 11, 37-43.
9. Chapman RS, Hesketh LJ. Behavioral phenotype of individuals with Down syndrome. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* **2000**, 6, 84-95.
10. Rachidi M, Lopes C. Mental retardation in Down syndrome: from gene dosage imbalance to molecular and cellular mechanisms. *Neurosci. Res.* **2007**, 59, 349-369.
11. Lott IT. Neurological phenotypes for Down syndrome across the life span. *Prog. Brain Res.* **2012**, 197, 101-121.
12. Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yáñez I, de Lagrán MM, Elston G, Estivill X, Fillat C, Defelipe J, Dierssen M. On dendrites in Down syndrome and DS murine models: a spiny way to learn. *Prog. Neurobiol.* **2004**, 74, 111-126.
13. Takashima S, Ieshima A, Nakamura H, Becker LE. Dendrites, dementia and the Down syndrome. *Brain Dev.* **1989**, 11, 131-133.
14. Larsen KB, Laursen H, Graem N, Samuelsen GB, Bogdanovic N, Pakkenberg B. Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down syndrome. *Ann. Anat.* **2008**, 190, 421-427.
15. Guihard-Costa AM, Khung S, Delbecque K, Ménez F, Delezoide AL. Biometry of face and brain in fetuses with trisomy 21. *Pediatr. Res.* **2006**, 59, 33-38.

16. Engidawork E, Lubec G. Molecular changes in fetal Down syndrome brain. *J. Neurochem.* **2003**, 84, 895-904.
17. Liu C, Belichenko PV, Zhang L, Fu D, Kleschevnikov AM, Baldini A, Antonarakis SE, Mobley WC, Yu YE. Mouse models for Down syndrome-associated developmental cognitive disabilities. *Dev. Neurosci.* **2011**, 33, 404-413.
18. Rueda N, Flórez J, Martínez-Cué C. Mouse models of Down syndrome as a tool to unravel the causes of mental disabilities. *Neural Plast.* **2012**, 584071.
19. Duchon A, Raveau M, Chevalier C, Nalesso V, Sharp AJ, Herault Y. Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling Down syndrome. *Mamm. Genome* **2011**, 22, 674-684.
20. Moore CS, Hawkins C, Franca A, Lawler A, Devenney B, Das I, Reeves RH. Increased male reproductive success in Ts65Dn "Down syndrome" mice. *Mamm. Genome* **2010**, 21, 543-549.
21. Villar AJ, Belichenko PV, Gillespie AM, Kozy HM, Mobley WC, Epstein CJ. Identification and characterization of a new Down syndrome model, Ts[Rb(12.1716)]2Cje, resulting from a spontaneous Robertsonian fusion between T(171)65Dn and mouse chromosome 12. *Mamm. Genome* **2005**, 16, 79-90.
22. Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM, Mobley WC, Epstein CJ, Huang TT. 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.
23. Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer C, Dignan P, Distech C. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 4997-5001.
24. Olson LE, Richtsmeier JT, Leszl J, Reeves RH. A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science* **2004**, 306, 687-690.
25. Olson LE, Roper RJ, Sengstaken CL, Peterson EA, Aquino V, Galdzicki Z, Siarey R, Pletnikov M, Moran TH, Reeves RH. Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, 16, 774-782.
26. Belichenko NP, Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Reeves RH, Mobley WC. The "Down syndrome critical region" is sufficient in the mouse model to confer behavioral, neurophysiological, and synaptic phenotypes characteristic of Down syndrome. *J. Neurosci.* **2009**, 29, 5938-5948.
27. Li Z, Yu T, Morishima M, Pao A, LaDuca J, Conroy J, Nowak N, Matsui S, Shiraishi I, Yu YE. Duplication of the entire 22.9 Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, 16, 1359-1366.
28. Yu T, Liu C, Belichenko P, Clapcote SJ, Li S, Pao A, Kleschevnikov A, Bechard AR, Asrar S, Chen R, Fan N, Zhou Z, Jia Z, Chen C, Roder JC, Liu B, Baldini A, Mobley WC, Yu YE. Effects of individual segmental trisomies of human chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice. *Brain Res.* **2010**, 1366, 162-171.

29. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.* **2001**, 36, 60-90.
30. Galdzicki Z, Siarey RJ. Understanding mental retardation in Down's syndrome using trisomy 16 mouse models. *Genes Brain Behav.* **2003**, 2, 167-178.
31. Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Salehi A, Epstein CJ, Mobley WC. Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of Down syndrome: exploring genotype-phenotype relationships. *J. Comp. Neurol.* **2007**, 504, 329-345.
32. Ishihara K, Amano K, Takaki E, Shimohata A, Sago H, Epstein CJ, Yamakawa K. Enlarged brain ventricles and impaired neurogenesis in the Ts1Cje and Ts2Cje mouse models of Down syndrome. *Cereb. Cortex* **2010**, 20, 1131-1143.
33. Chakrabarti L, Galdzicki Z, Haydar TF. 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.
34. Malt EA, Dahl RC, Haugsand TM., Ulvestad IH, Emilsen NM, Hansen B, Cardenas YE, Skøld RO, Thorsen AT, Davidsen EM. Health and disease in adults with Down syndrome. *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* **2013**, 133, 290-294.
35. Nadel L. Down's syndrome: a genetic disorder in biobehavioral perspective. *Genes Brain Behav.* **2003**, 2, 156-166.
36. Guidi S, Bonasoni P, Ceccarelli C, Santini D, Gualtieri F, Ciani E, Bartesaghi R. Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol.* **2008**, 18, 180-197.
37. Weitzdoerfer R, Dierssen M, Fountoulakis M, Lubec G. Fetal life in Down syndrome starts with normal neuronal density but impaired dendritic spines and synaptosomal structure. *J. Neural Transm. Suppl.* **2001**, 61, 59-70.
38. Richtsmeier JT, Zumwalt A, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH. Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **2002**, 07, 317-324.
39. Ferrés MA, Bianchi DW, Siegel AE, Bronson RT, Huggins GS, Guedj F. Perinatal natural history of the Ts1Cje mouse model of Down syndrome: Growth restriction, early mortality, heart defects, and delayed development. *PLoS One* **2016**, 11, e0168009.
40. Ishihara K, Amano K, Takaki E, Ebrahim AS, Shimohata A, Shibazaki N, Inoue I, Takaki M, Ueda Y, Sago H, Epstein CJ, Yamakawa K. Increased lipid peroxidation in Down's syndrome mouse models. *J. Neurochem.* **2009**, 110, 1965-1976.
41. Shimohata A, Ishihara K, Hattori S, Miyamoto H, Morishita H, Ornthanalai G, Raveau M, Ebrahim AS, Amano K, Yamada K, Sago H, Akiba S, Mataga N, Murphy NP, Miyakawa T, Yamakawa K. 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.
42. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol.* **2003**, 4, 3.

43. Akamine R, Yamamoto T, Watanabe M, Yamazaki N, Kataoka M, Ishikawa M, Ooie T, Baba Y, Shinohara Y. Usefulness of the 5' region of the cDNA encoding acidic ribosomal phosphoprotein P0 conserved among rats, mice, and humans as a standard probe for gene expression analysis in different tissues and animal species. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2007**, 70, 481-486.
44. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
45. Yuan P, Condello C, Keene CD, Wang Y, Bird TD, Paul SM, Luo W, Colonna M, Baddeley D, Grutzendler J. TREM2 haplodeficiency in mice and humans impairs the microglia barrier function leading to decreased amyloid compaction and severe axonal dystrophy. *Neuron* **2016**, 90, 724-739.
46. Wei G, Guo J, Doseff AI, Kusewitt DF, Man AK, Oshima RG, Ostrowski MC. Activated Ets2 is required for persistent inflammatory responses in the motheaten viable model. *J. Immunol.* **2004**, 173, 1374-1379.
47. Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* **2003**, 303, 11-34.
48. Ng AP, Hyland CD, Metcalf D, Carmichael CL, Loughran SJ, Di Rago L, Kile BT, Alexander WS. Trisomy of Erg is required for myeloproliferation in a mouse model of Down syndrome. *Blood* **2010**, 115, 3966-3969.
49. Loughran SJ, Kruse EA, Hacking DF, de Graaf CA, Hyland CD, Willson TA, Henley KJ, Ellis S, Voss AK, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS, Kile BT. The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nat. Immunol.* **2008**, 9, 810-819.
50. Magister S, Kos J. Cystatins in immune system. *J. Cancer* **2013**, 4, 45-56.
51. Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 72, 1622-1631.
52. Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **2014**, 41, 21-35.
53. Mammana S, Fagone P, Cavalli E, Basile MS, Petralia MC, Nicoletti F, Bramanti P, Mazzone E. The role of macrophages in neuroinflammatory and neurodegenerative pathways of Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and multiple sclerosis: pathogenetic cellular effectors and potential therapeutic targets. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 831.
54. Xiong XY, Liu L, Yang QW. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog. Neurobiol.* **2016**, 142, 23-44.
55. Aziz NM, Guedj F, Pennings JLA, Olmos-Serrano JL, Siegel A, Haydar TF, Bianchi DW. Lifespan analysis of brain development, gene expression and behavioral phenotypes in the Ts1Cje, Ts65Dn and Dp(16)1/Yey mouse models of Down syndrome. *Dis. Model Mech.* **2018**, 11, dmm031013.
56. Yusof HH, Lee HC, Seth EA, Wu X, Hewitt CA, Scott HS, Cheah PS, Li YM, Chau DM, Ling KH. Expression profiling of Notch signalling pathway and Gamma-secretase activity in the brain of Ts1Cje mouse model of Down syndrome. *J. Mol. Neurosci.* **2019**, 67, 632-642.
57. Guedj F, Pennings JL, Wick HC, Bianchi DW. Analysis of adult cerebral cortex and hippocampus

- transcriptomes reveals unique molecular changes in the TslCje mouse model of down syndrome. *Brain Pathol.* **2015**, 25, 11-23.
58. Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase: a key regulator of neutrophil oxidant production. *Redox Rep.* **1997**, 3, 3-15.
  59. Shah AV, Birdsey GM, Randi AM. Regulation of endothelial homeostasis, vascular development and angiogenesis by the transcription factor ERG. *Vascul. Pharmacol.* **2016**, 86, 3-13.
  60. Birdsey GM, Dryden NH, Amsellem V, Gebhardt F, Sahnan K, Haskard DO, Dejana E, Mason JC, Randi AM. Transcription factor Erg regulates angiogenesis and endothelial apoptosis through VE-cadherin. *Blood* **2008**, 111, 3498-3506.
  61. Birdsey GM, Shah AV, Dufton N, Reynolds LE, Osuna Almagro L, Yang Y, Aspalter IM, Khan ST, Mason JC, Dejana E, Göttgens B, Hodivala-Dilke K, Gerhardt H, Adams RH, Randi AM. The endothelial transcription factor ERG promotes vascular stability and growth through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Dev. Cell* **2015**, 32, 82-96.
  62. Sidibé A, Imhof BA. VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis. *Nat. Immunol.* **2014**, 15,215-217.
  63. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* **2008**, 121, 2115-2122.
  64. Baek KH, Zaslavsky A, Lynch RC, Britt C, Okada Y, Siarey RJ, Lensch MW, Park IH, Yoon SS, Minami T, Korenberg JR, Folkman J, Daley GQ, Aird WC, Galdzicki Z, Ryeom S. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* **2009**, 459, 1126-1130.
  65. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **2010**, 330, 841-845.
  66. Taoudi S, Bee T, Hilton A, Knezevic K, Scott J, Willson TA, Collin C, Thomas T, Voss AK, Kile BT, Alexander WS, Pimanda JE, Hilton DJ. ERG dependence distinguishes developmental control of hematopoietic stem cell maintenance from hematopoietic specification. *Genes Dev.* **2011**, 25, 251-262.
  67. Munn DH, Beall AC, Song D, Wrenn RW, Throckmorton DC. Activation-induced apoptosis in human macrophages: developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *J. Exp. Med.* **1995**, 181, 127-136.
  68. Thion MS, Ginhoux F, Garel S. Microglia and early brain development: An intimate journey. *Science*. 2018 Oct 12;362(6411):185-189.
  69. Kaushik G, Zarbalis KS. Prenatal neurogenesis in autism spectrum disorders. *Front. Chem.* **2016**, 4, 12.
  70. Selemon LD, Zecevic N. Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. *Transl. Psychiatry.* **2015**, 5, e623.
  71. Tong CK, Vidyadaran S. Role of microglia in embryonic neurogenesis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **2016**, 241, 1669-1675.

72. Morante-Redolat JM, Fariñas I. Fetal neurogenesis: breathe HIF you can. *EMBO J.* **2016**, *35*, 901-903.
73. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* **2012**, *74*, 691-705.
74. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 3974-3980.
75. Chapman RS, Hesketh LJ. Language, cognition, and short-term memory in individuals with Down syndrome. *Downs Syndr. Res. Pract.* **2001**, *7*, 1-7.
76. Lott IT, Dierssen M. Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *Lancet Neurol.* **2010**, *9*, 623-633.
77. Haydar TF, Nowakowski RS, Yarowsky PJ, Krueger BK. Role of founder cell deficit and delayed neurogenesis in microencephaly of the trisomy 16 mouse. *J. Neurosci.* **2000**, *20*, 4156-4164.
78. Baburamani AA, Patkee PA, Arichi T, Rutherford MA. New approaches to studying early brain development in Down syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* **2019**, *61*, 867-879.
79. Guidi S, Stagni F, Bianchi P, Ciani E, Giacomini A, De Franceschi M, Moldrich R, Kurniawan N, Mardon K, Giuliani A, Calzà L, Bartesaghi R. Prenatal pharmacotherapy rescues brain development in a Down's syndrome mouse model. *Brain* **2014**, *137*, 380-401.
80. Nakano-Kobayashi A, Awaya T, Kii I, Sumida Y, Okuno Y, Yoshida S, Sumida T, Inoue H, Hosoya T, Hagiwara M. Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 10268-10273.
81. Williams RW, Rakic P. Three-dimensional counting: an accurate and direct method to estimate numbers of cells in sectioned material. *J. Comp. Neurol.* **1988**, *278*, 344-352.
82. Gil-Mohapel J, Brocardo PS, Choquette W, Gothard R, Simpson JM, Christie BR. Hippocampal neurogenesis levels predict WATERMAZE search strategies in the aging brain. *PLoS One.* **2013**, *8*, e75125.
83. Kohman RA, Rhodes JS. Neurogenesis, inflammation and behavior. *Brain Behav. Immun.* **2013**, *27*, 22-32.
84. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 2231-2243.
85. Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, Garel S. Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Rep.* **2014**, *8*, 1271-1279.
86. Mira H, Morante J. Neurogenesis from embryo to adult - lessons from flies and mice. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 533.
87. Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front. Cell Neurosci.* **2014**, *8*, 396.
88. Panchision DM, Pickel JM, Studer L, Lee SH, Turner PA, Hazel TG, McKay RD. Sequential actions

- of BMP receptors control neural precursor cell production and fate. *Genes Dev.* **2001**, 15, 2094-2110.
89. Copp AJ, Harding BN. Neuronal migration disorders in humans and in mouse models--an overview. *Epilepsy Res.* **1999**, 36, 133-141.
  90. McManus MF, Golden JA. Neuronal migration in developmental disorders. *J. Child Neurol.* **2005**, 20, 280-286.
  91. Roumier A, Pascual O, Béchade C, Wakselman S, Poncer JC, Réal E, Triller A, Bessis A. Prenatal activation of microglia induces delayed impairment of glutamatergic synaptic function. *PLoS One.* **2008**, 3, e2595.
  92. Mottahedin A, Ardalan M, Chumak T, Riebe I, Ek J, Mallard C. Effect of neuroinflammation on synaptic organization and function in the developing brain: implications for neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Front. Cell Neurosci.* **2017**, 11, 190.
  93. Valenti D, de Bari L, de Rasmio D, Signorile A, Henrion-Caude A, Contestabile A, Vacca RA. The polyphenols resveratrol and epigallocatechin-3-gallate restore the severe impairment of mitochondria in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model. *Biochim. Biophys. Acta* **2016**, 1862, 1093-1104.
  94. Izzo A, Mollo N, Nitti M, Paladino S, Cali G, Genesio R, Bonfiglio F, Cicatiello R, Barbato M, Sarnataro V, Conti A, Nitsch L. Mitochondrial dysfunction in down syndrome: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Mol. Med.* **2018**, 24, 2.
  95. Piccoli C, Izzo A, Scrima R, Bonfiglio F, Manco R, Negri R, Quarato G, Cela O, Ripoli M, Prisco M, Gentile F, Calì G, Pinton P, Conti A, Nitsch L, Capitano N. Chronic pro-oxidative state and mitochondrial dysfunctions are more pronounced in fibroblasts from Down syndrome foeti with congenital heart defects. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, 22,1218-1232.
  96. Valenti D, Manente GA, Moro L, Marra E, Vacca RA. Deficit of complex I activity in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy and overproduction of reactive oxygen species by mitochondria: involvement of the cAMP/PKA signalling pathway. *Biochem. J.* **2011**, 435, 679-688.
  97. Chakrabarti L, Best TK, Cramer NP, Carney RS, Isaac JT, Galdzicki Z, Haydar TF. Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat. Neurosci.* **2010**, 13, 927-934.
  98. Ishihara K, Kanai S, Sago H, Yamakawa K, Akiba S. Comparative proteomic profiling reveals aberrant cell proliferation in the brain of embryonic Ts1Cje, a mouse model of Down syndrome. *Neuroscience* **2014**, 281, 1-15.
  99. Kleschevnikov AM, Belichenko PV, Villar AJ, Epstein CJ, Malenka RC, Mobley WC. Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J. Neurosci.* **2004**, 24, 8153-8160.
  100. Belichenko PV, Kleschevnikov AM, Masliah E, Wu C, Takimoto-Kimura R, Salehi A, Mobley WC. Excitatory-inhibitory relationship in the fascia dentata in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J. Comp. Neurol.* **2009**, 512, 453-466.
  101. Amano K, Sago H, Uchikawa C, Suzuki T, Kotliarova SE, Nukina N, Epstein CJ, Yamakawa K.



- Dosage-dependent over-expression of genes in the trisomic region of Ts1Cje mouse model for Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, 13, 1333-1340.
102. Meechan DW, Maynard TM, Tucker ES, LaMantia AS. Three phases of DiGeorge/22q11 deletion syndrome pathogenesis during brain development: patterning, proliferation, and mitochondrial functions of 22q11 genes. *Int. J. Dev. Neurosci.* **2011**, 29, 283-294.
103. Baker K, Chaddock CA, Baldeweg T, Skuse D. Neuroanatomy in adolescents and young adults with 22q11 deletion syndrome: comparison to an IQ-matched group. *Neuroimage* **2011**, 55, 491-499.
104. Ogata T, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashima S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y. TBX1 mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. *PLoS One.* **2014**, 9, e91598.
105. Paylor R, Glaser B, Mupo A, Ataliotis P, Spencer C, Sobotka A, Sparks C, Choi CH, Oghalai J, Curran S, Murphy KC, Monks S, Williams N, O'Donovan MC, Owen MJ, Scambler PJ, Lindsay E. Tbx1 haploinsufficiency is linked to behavioral disorders in mice and humans: implications for 22q11 deletion syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 7729-7234.
106. Flore G, Cioffi S, Bilio M, Illingworth E. Cortical development requires mesodermal expression of Tbx1, a gene haploinsufficient in 22q11.2 deletion syndrome. *Cereb. Cortex* **2017**, 27, 2210-2225.
107. Okubo T, Kawamura A, Takahashi J, Yagi H, Morishima M, Matsuoka R, Takada S. Ripply3, a Tbx1 repressor, is required for development of the pharyngeal apparatus and its derivatives in mice. *Development* **2011**, 138, 339-348.
108. Cioffi S, Martucciello S, Fulcoli FG, Bilio M, Ferrentino R, Nusco E, Illingworth E. Tbx1 regulates brain vascularization. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, 23, 78-89.
109. Baldini A. Dissecting contiguous gene defects: TBX1. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, 15, 279-284.
110. Cancrini C, Puliafito P, Digilio MC, Soresina A, Martino S, Rondelli R, Consolini R, Ruga EM, Cardinale F, Finocchi A, Romiti ML, Martire B, Bacchetta R, Albano V, Carotti A, Specchia F, Montin D, Cirillo E, Cocchi G, Trizzino A, Bossi G, Milanese O, Azzari C, Corsello G, Pignata C, Aiuti A, Pietrogrande MC, Marino B, Ugazio AG, Plebani A, Rossi P. Italian network for primary immunodeficiencies. Clinical features and follow-up in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *J. Pediatr.* **2014**, 164, 1475-1480.
111. Di Cesare S, Puliafito P, Ariganello P, Marcovecchio GE, Mandolesi M, Capolino R, Digilio MC, Aiuti A, Rossi P, Cancrini C. Autoimmunity and regulatory T cells in 22q11.2 deletion syndrome patients. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2015**, 26, 591-594.
112. Bloemers BL, Bont L, de Weger RA, Otto SA, Borghans JA, Tesselaar K. Decreased thymic output accounts for decreased naive T cell numbers in children with Down syndrome. *J. Immunol.* **2011**, 186, 4500-4507.