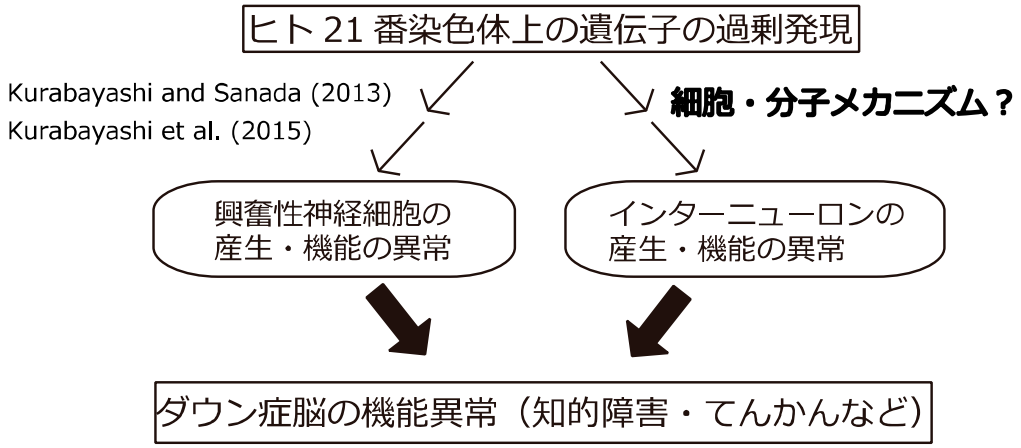
140　ダウン症モデル脳における抑制性神経細胞の機能解析	倉林　伸博

【目的】ダウン症はヒト第 21 番染色体の三倍体化（トリソミー）によって誘発され、およそ 700〜800 人の新生児あたり 1 人の割合で発症する。ほぼ全てのダウン症患者は知的障害を呈し、これに伴って脳の発生異常が認められることから、この発生異常が知的障害などの脳機能異常に寄与していると考えられている。これまでに私たちは、ダウン症モデルマウスを用いた研究から、大脳新皮質において興奮性の神経細胞の産生異常が引き起こされるメカニズムの一端を解明してきた。しかしながら一方で、ダウン症モデルマウス脳における抑制性の神経細胞（インターニューロン）の産生や機能の異常はほとんど理解されていない（図）。これを明らかにすることは、ダウン症において知的障害などの脳機能障害が引き起こされる機序の理解の前進に寄与すると期待できる。そこで本研究では、ダウン症モデルマウスの発生期大脳新皮質におけるインターニューロンの異常を明らかにすることを目的とした。

【方法】胎児期の大脳新皮質におけるインターニューロンを可視化するため、Nkx2.1-CreER マウスと Cre の活性依存的に TdTomato を発現するマウス（Ai9 マウス）を掛け合わせたマウスを使用した。このマウスとダウン症モデルマウス（Ts1Cje）とをさらに交配させることで Ts1Cje 胎仔脳におけるインターニューロンを可視化し、その大脳新皮質における分布を定量した。また一方で、成体脳におけるインターニューロンの分布を解析するため、Ts1Cje 成体脳の切片をインターニューロンのマーカー分子に対する抗体を用いて免疫染色し、各サブタイプのインターニューロンの分布を定量した。

【結果】Ts1Cje の胎仔を用いた解析から、胎児期の大脳新皮質において、移動中のインターニューロンの分布が異常になっていることを見出した。具体的には、脳室側の領域に存在するインターニューロンの割合が、Ts1Cje において増加していることが判明した。また一方で、Ts1Cje の成体脳の大脳新皮質においてインターニューロンのマーカーの一つである PV を発現する細胞の分布が変化していることが明らかになった。具体的には、第 2/3 層に位置する PV 陽性細胞の割合が減少していたのに対し、第 5 層に位置する PV 陽性細胞の割合が増加していた。

ダウン症の大脳新皮質における発生異常（モデル）



140. ダウン症モデル脳における抑制性神経細胞の機能解析

倉林　伸博

富山大学 研究推進機構 生命科学先端研究支援ユニット

Key words：大脳新皮質，インターニューロン，ダウン症モデル

緒　言

ダウン症はヒト第 21 番染色体の三倍体化（トリソミー）によって誘発され、およそ 700～800 人の新生児あたり 1 人の割合で発症する。ほぼ全てのダウン症患者は知的障害を呈するため、ダウン症は知的障害の最も主要な原因となっており、知的障害のほかにも様々な症状が様々な頻度で認められる。近年、外科技術や新生児管理の進歩により、ダウン症者の平均寿命は 60 歳にまで伸びている。このことは今、この社会が成人期ダウン症者に初めて直面しつつある、ということを意味しており、ダウン症者にみられる知的障害などの病態に対し、どのように対処するのかという問題を浮き彫りにしている。このことは欧米ではすでに大きな問題として捉えられており、例えば NIH のダウン症関連研究費は年々増額され、近年では約 60 億円もの研究費が投入されている。

従来、ダウン症における脳機能障害を理解する目的で、研究例は多くないものの、ダウン症患者脳の異常が調べられてきた。その結果、大脳新皮質における神経細胞の密度および数が減少していることに加え、神経細胞の興奮と抑制のバランスの乱れが認められることが明らかになった［1，2］。このことから、知的障害が起こる機序の一つとして、神経細胞の産生異常や、機能（神経回路の形成など）の異常が示唆されている。また神経細胞の回路形成異常は、ダウン症患者の約 10%に認められるてんかんとの連関も示唆されている［3］。このようなダウン症脳の発生異常と機能異常のメカニズムを理解するため、ヒト 21 番染色体の相同領域の一部を 3 倍体化したマウスが作製された。このマウスは脳の発生異常に伴って記憶障害などの機能異常を示すことから、ダウン症の知的障害のメカニズムを解明するためのモデルとして広く用いられている［4］。これまでに私たちは、ダウン症モデルマウスを用いた研究から、大脳新皮質において興奮性の神経細胞の産生異常が引き起こされるメカニズムの一端を解明してきた［5，6］。しかしながら一方で、ダウン症モデルマウス脳における抑制性の神経細胞（インターニューロン）の産生や機能の異常はほとんど理解されていない。これを明らかにすることは、ダウン症において知的障害などの脳機能障害が引き起こされる機序の理解の前進に寄与すると期待できる。

そこで本研究では、ダウン症モデルマウスの発生期大脳新皮質におけるインターニューロンの異常を明らかにすることを目的とした。本研究の遂行によって、ダウン症モデルマウスの胎仔脳において、移動中のインターニューロンの分布に異常が認められることが明らかになった。さらにこれに伴って、成体のモデルマウスの大脳新皮質においても特定のサブタイプのインターニューロンの分布が変化していた。以上の結果から、ダウン症における知的障害が起こる機序の一つとして、大脳新皮質におけるインターニューロンの分布異常の寄与が示唆された。

方　法

1. 動物

ダウン症モデルマウスとしてはTs1Cjeマウス［7］を山川和弘博士（理化学研究所 脳科学総合研究センター）から分与していただき、使用した。また、胎仔脳におけるインターニューロンを可視化するため、B6.Cg-Gt (ROSA) 26Sor$^{tm9(CAG-tdTomato)Hze}$/J (Ai9)（Jax Stock No: 007909）、およびNkx2-1t$^{m1.1(cre/ERT2)Zjh}$/J (Nkx2.1-CreER)（Jax Stock No: 014552）を交配させたマウスを使用した。このマウスの妊娠12日目にタモキシフェンを腹腔内投与し、胎仔脳において産生されたインターニューロンにTdTomatoタンパク質を発現させることによって当該細胞を可視化した。

2. 免疫組織染色

胎仔脳については、マウス胎仔から脳を氷冷PBS中で単離し、4%paraformaldehyde含有PBSを用いて固定した（室温で30分）。その後、30%Sucrose含有PBSにより凍結保護をし（4℃、overnight）、OCT compound（sakura）と30% Sucrose含有PBSを1：2で混合した溶液に包埋した。それを液体窒素で凍結し、使用時まで−80℃で保存した。凍結切片（20μm厚）を作製し、30分以上風乾した。成体脳については、深麻酔下において4% paraformaldehyde含有PBSを用いてマウスを還流固定し、その後に脳を摘出した。4% paraformaldehyde含有PBSで後固定（4℃、overnight）した脳からビブラトームを用いて切片（60μm厚）を作製した。各切片につき、ブロッキング溶液（5% fetal bovine serum （FBS）、3% bovine serum albumin （BSA）および0.2% TritonX-100含有PBS）中で切片をインキュベートし（室温で30分）、一次抗体と反応させた（4℃、overnight）。PBSで洗浄した後、Alexa®488/Cy3標識二次抗体と反応させ（4℃、overnight）、PBS洗浄の後Prolong Gold mounting solution（Thermo Fisher）により封入した。

結　果

1. ダウン症モデルマウス胎仔脳における移動中のインターニューロンの分布異常

大脳新皮質における神経細胞の約20%はインターニューロンから構成されることが知られており、これらの細胞の多くは内側基底核原基（MGE）と呼ばれる領域に存在する神経前駆細胞から、発生期において産生される［8］。発生期のインターニューロンを可視化する方法として、転写因子Nkx2.1のコード領域にCreERをノックインしたマウス(Nkx2.1-CreER)と、Creの活性依存的に蛍光タンパク質を発現するマウスを掛け合わせたマウスを利用する方法が広く知られる。そこで、この発生期インターニューロンを可視化できるマウスとダウン症モデルマウスであるTs1Cjeをさらに掛け合わせ、ダウン症モデルの発生期脳におけるインターニューロンを可視化した。その結果、Ts1Cjeの大脳新皮質において、移動中のインターニューロンの分布が異常になっていることを見出した（図1）。具体的には、脳室側の領域に存在するインターニューロンの割合が、Ts1Cjeにおいて増加していることが判明した。

2. ダウン症モデルマウス成体脳におけるインターニューロンの分布異常

Ts1Cjeの発生期脳におけるインターニューロンの分布異常が認められたため、成体脳におけるインターニューロンの分布も変化している可能性が考えられた。MGE由来のインターニューロンは皮質内に進入したのち、主にパルブアルブミン（parvalubumin：PV）陽性またはソマトスタチン（somatostatin：SOM）陽性の神経細胞となる［8］。そこで次に、Ts1Cjeの成体脳をPVおよびSOMに対する抗体を用いて免疫染色し、各サブタイプのインターニューロンの分布を解析した。その結果、Ts1Cjeの大脳新皮質においてPV陽性細胞の分布が変化していることが明らかになった（図2）。具体的には、第2/3層に位置するPV陽性細胞の割合が減少していたのに対し、第5層に位置するPV陽性細胞の割合が増加していた。一方で、SOM陽性細胞の分布は野生型との間で有意な差は認められなかった（data not shown）。

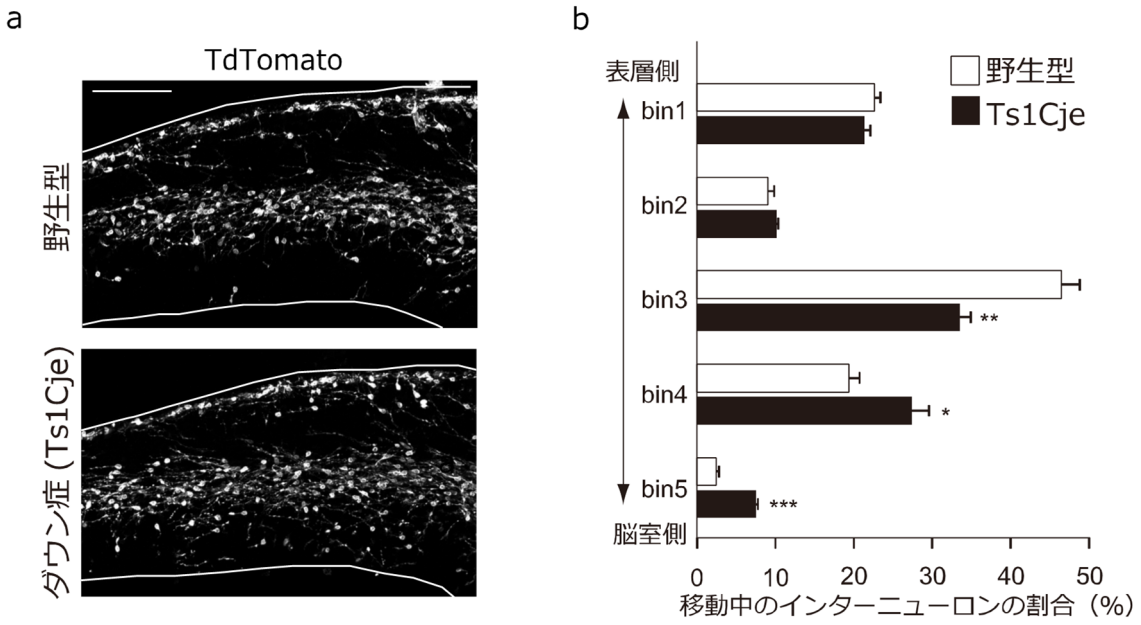


図 1. Ts1Cje 胎仔の大脳新皮質におけるインターニューロンの分布異常

a）胎生 14 日目 Nkx2.1-CreER/Ai9 マウスの大脳新皮質における移動中のインターニューロン（TdTomato 陽性細胞）。脳表面と脳室面を実線で表している。スケールバー：100 μm。

b）大脳新皮質の脳の表層側から脳室側までを 5 つの等間隔の区画に分割し、各区画における TdTomato 陽性細胞の割合を示した。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001（two-tailed Student t-test）。

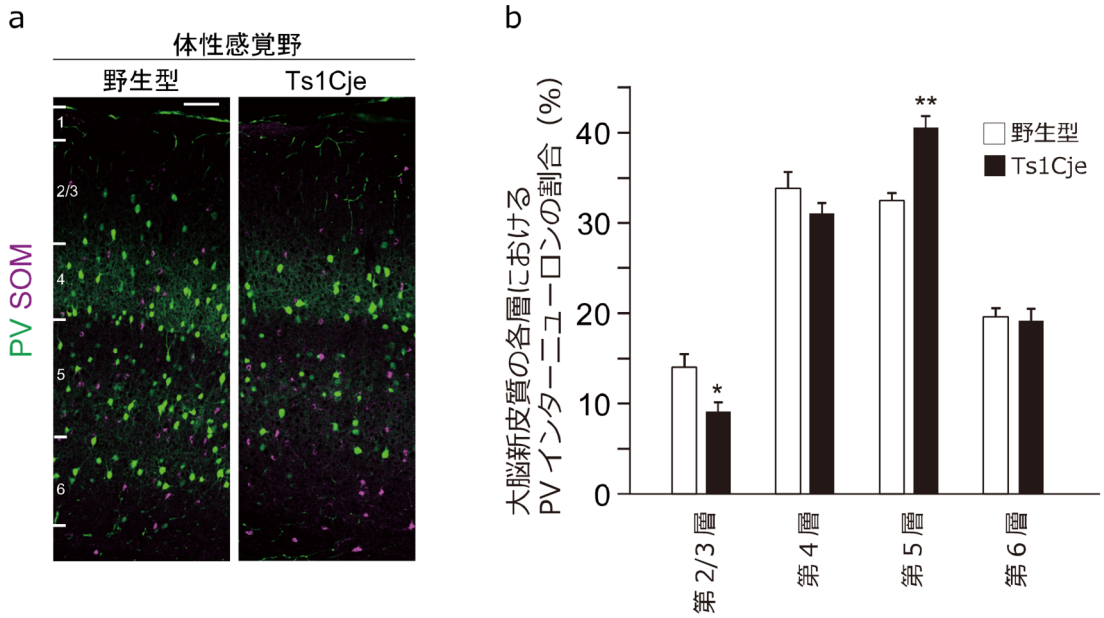


図 2. Ts1Cje 成体の大脳新皮質における PV 陽性インターニューロンの分布異常

a）成体の Ts1Cje マウス大脳新皮質の PV および SOM に対する抗体を用いた免疫染色像（緑：PV、紫：SOM）。スケールバー：100 μm。

b）大脳新皮質の各層について PV 陽性細胞の数を計測し、その割合を算出した。*P＜0.05、**P＜0.01（two-tailed Student t-test）。

考　察

本研究から、ダウン症モデルマウスの一つである Ts1Cje において、インターニューロンの分布異常が認められた。胎仔脳を用いた解析によって移動中のインターニューロンの分布異常が認められたことから、Ts1Cje マウスにおいてはインターニューロンの移動の制御機構が異常になっている可能性が示唆された。さらに、これに伴って成体脳における PV 陽性ニューロンの分布異常が観察されたことから、胎生期におけるインターニューロンの移動の障害が成体脳における分布異常に寄与している可能性が高い。今後は、異なる胎生ステージにおける実験や、実際の移動中ニューロンをタイムラプスイメージングするなど、胎生期におけるインターニューロンの移動に焦点を絞った解析を進めたい。これにより、ダウン症モデルマウスのインターニューロンの分布異常が引き起こされる細胞・分子メカニズムにさらに迫っていきたいと考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院理学系研究科附属遺伝子実験施設の眞田佳門准教授、富山大学学術研究部医学系行動生理学講座の高雄啓三教授である。本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました先生方、ならびに上原記念生命科学財団に心から感謝申し上げます。

文　献

1) Golden, JA., Hyman, BT. Development of the superior temporal neocortex is anomalous in trisomy 21. J Neuropathol Exp Neurol. 1994 Sep;53(5):513-20. PMID: 8083693 DOI: 10.1097/00005072-199409000-00011
2) Haydar TF, Reeves RH. Trisomy 21 and early brain development. Trends Neurosci. 2012 Feb;35(2):81-91. Epub 2011 Dec 9. PMID: 22169531 DOI: 10.1016/j.tins.2011.11.001.
3) Goldberg-Stern H, Strawsburg RH, Patterson B, Hickey F, Bare M, Gadoth N, Degrauw TJ. Seizure frequency and characteristics in children with Down syndrome. Brain Dev. 2001 Oct;23(6):375-8. PMID: 11578846 DOI: 10.1016/s0387-7604(01)00239-x.
4) Herault Y, Delabar JM, Fisher EMC, Tybulewicz VLJ, Yu E, Brault V. Rodent models in Down syndrome research: impact and future opportunities. Dis Model Mech. 2017 Oct 1;10(10):1165-1186. PMID: 28993310 DOI: 10.1242/dmm.029728.
5) Kurabayashi N, Sanada K. Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. Genes Dev. 2013 Dec 15;27(24):2708-21. PMID: 24352425 DOI: 10.1101/gad.226381.113.
6) Kurabayashi N, Nguyen MD, Sanada K. DYRK1A overexpression enhances STAT activity and astrogliogenesis in a Down syndrome mouse model. EMBO Rep. 2015 Nov;16(11):1548-62. Epub 2015 Sep 15. PMID: 26373433 DOI: 10.15252/embr.201540374.
7) 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 Jul 1;13(13):1333-40. Epub 2004 May 11. PMID: 15138197 DOI: 10.1093/hmg/ddh154.
8) Fogarty M, Grist M, Gelman D, Marín O, Pachnis V, Kessaris N. Spatial genetic patterning of the embryonic neuroepithelium generates GABAergic interneuron diversity in the adult cortex. J Neurosci. 2007 Oct 10;27(41):10935-46. PMID: 17928435 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1629-07.2007.