

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10002

研究課題名(和文) ミクログリアの機能制御と移植によるレット症候群の革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative therapies for Rett syndrome with cell transplantation and functions control of microglia

研究代表者

高橋 知之 (Takahashi, Tomoyui)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：20332687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：レット症候群(RTT)は、X染色体のMeCP2変異が主因の重度の神経発達症である。しかし、未だMeCP2欠損によるRTT病態の発症機構は不明であり、発症機構の解明、治療法の確立が切望されている。本課題では、RTTモデルES細胞やマウスにおけるミクログリアの病態への関わりを解析した。その結果、MeCP2欠損ミクログリアや分化誘導したミクログリア様細胞では、野生型細胞に比較して、遺伝子発現が変化する一方で、生理機能における明らかな異常は認められなかった。しかし、個体全身における免疫系は、MeCP2欠損による影響を受けており、ミクログリアをはじめとする免疫系を制御する因子に関する解析を続けている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、様々な精神疾患の病態メカニズムにおける炎症の関与が示されており、脳内の免疫を司るミクログリアの役割は注目されている。最近、神経発達症の一つとして知られるRTTにおいても、病態における免疫系の関与が示唆されている。このことから、RTT病態におけるミクログリアの働きに関する本研究は、神経精神疾患と炎症との関係を明らかにする一助になると考えられ、基礎医学的に有意義なものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rett Syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder mainly caused by mutation of MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2) gene, which is a transcriptional regulator of the X chromosome. RTT occurs mainly in females and is characterized by intellectual disability, gait abnormalities, seizures, sleep problems, autonomic dysregulation, irregular breathing, and cardiac abnormalities, and it is eagerly desired to elucidate the pathogenic mechanism and develop a therapeutic method.

We analyzed the involvement of microglia in RTT pathology using the RTT model (MeCP2-null) ES cells and mice. As a result, gene expression was changed in MeCP2-deficient microglia and differentiation-induced microglia-like cells compared with wild-type cells, but no obvious abnormality in physiological function was observed. However, MeCP2 deficiency affects the immune system in the whole body, and we continue to analyze the factors that control the immune system, including microglia.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：レット症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

レット症候群(RTT)は、X染色体上の転写調節因子である MeCP2( Methyl-CpG-binding protein 2) 遺伝子変異を主因とする進行性精神発達障害である。RTT は、主に女児で発症し、出生時は正常、しかし数ヶ月後、発達停滞、1-3 歳頃より急速な言語や運動機能の退行を示し、失調性歩行、てんかん発作や呼吸を含む自律機能の失調を呈する。また、RTT では、不整脈や呼吸の問題からの突然死も臨床上的の問題となっており、病態発症メカニズムの解明や治療法の開発が切望されている。

ミクログリアは、脳実質内グリア細胞の 10%を占め、脳内免疫細胞として脳炎や血管傷害、変性疾患など脳組織が傷害を受けると活性化し、傷害部位へ誘導される。近年、脳病理学的所見が不明瞭とされる自閉症など発達障害、統合失調症においても、ミクログリアの異常な活性が認められるなど、神経・精神疾患におけるミクログリアの役割が注目されている。

近年、ミクログリアは、RTT 病態への関与も示されてきた (Maezawa-I., et al., J Neurosci '10, Cronk-JC., et al., Immunity '15)。また、RTT モデルマウスにおける骨髄移植は、ミクログリアの正常化を介して、RTT 病態の改善、延命効果を示すことが報告され、ミクログリアの制御による RTT 治療法の開発が期待されている (Derecki-NC., et al., Nature '12)。しかしながら、直近の追試では、骨髄移植による治療効果が認められないなど、ミクログリアの病態関与について不明な部分が多いのが現状である (Wang-J., et al., Nature '15)。

これまで我々は、MeCP2 欠損の病態モデル ES/iPS 細胞やマウスを利用した RTT 病態研究を進めてきた。既に、MeCP2 欠損 ES 細胞や RTT モデルマウス由来のグリア細胞を用いた研究から、MeCP2 欠損はアストロサイトの分化やグルタミン酸代謝などに影響し、MeCP2 欠損したグリア細胞における細胞自律性の機能異常が RTT 病態に関わる可能性を示している (Okabe-Y., Takahashi-T., et al. Brain Res '10, PLoS One '12)。また最近、MeCP2 は ES 細胞由来の心筋幹細胞の発生・分化に関わり、RTT モデルマウスの心臓における遺伝子発現や構造の異常に関わることを見出し、RTT で認められる臨床症状を理解するには、神経系、ニューロンのみならず、様々な組織・細胞における病態解析が必要であることを明らかにしている (Hara-M., Takahashi-T., et al., Sci Rep '15)。

## 2. 研究の目的

本研究は、MeCP2 欠損 ES 細胞、マウスにおいて、RTT 病態におけるミクログリアの役割を解明し、ミクログリアの制御および、ES 細胞由来ミクログリアを移植、機能制御することによって、治療薬探索や新規の移植再生療法の開発を目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) RTT モデル ES 細胞由来ミクログリアの分化誘導

MeCP2 欠損、ならびにコントロール野生型 ES 細胞からミクログリア/マクロファージ様細胞を分化誘導するために、様々な細胞増殖因子、サイトカインを添加した培養液により、分化支持細胞と共培養した。分化誘導後の細胞は、shake off 法によって回収し、遺伝子発現、サイトカインへの反応性、貪食能の評価を行った。

### (2) RTT モデルマウス由来ミクログリアの特性解析

新生仔 MeCP2 欠損、ならびにコントロール野生型マウス由来ミクログリアの初代培養を行い、shake off 法により回収後、遺伝子発現、サイトカインへの反応性、貪食能の評価を行った。

### (3) RTT モデルマウス血球細胞における遺伝子発現の解析

7-9 週齢の MeCP2 欠損、ならびにコントロール野生型マウスの全血より、血漿を採取後、塩化アンモニウム溶血処理を行った。血球細胞は、溶血処理後の試料を遠心することで分離・回収した。回収後の細胞より全 RNA を抽出し、qRT-PCR により遺伝子発現を解析した。

### (4) RTT モデルマウス血清におけるサイトカイン、ケモカインのプロファイリング

7-9 週齢の MeCP2 欠損、ならびにコントロール野生型マウスマウスの全血より、遠心分離により血漿を回収し、BioPlex Pro によりサイトカイン/ケモカインの測定を行った。

### (5) RTT モデルマウス、胸腺、脾臓における遺伝子発現の解析

6,8 週齢の MeCP2 欠損、ならびにコントロール野生型マウスにおける胸腺、脾臓を摘出した。摘出した組織より全 RNA を抽出し、qRT-PCR により遺伝子発現を解析した。

### (6) RTT モデルマウスの死因の解析

RTT モデルマウスは、生後 2-3 週間は、ほぼ正常に成長、発達するが、4 週目頃より成長が遅滞するとともに、行動量が減少し、7-8 週目頃より死亡する。6-8 週の MeCP2 欠損マウスを観察、解剖、さらに脳組織を始めとする臓器の摘出後、遺伝子やタンパク質の発現を解析した。遺伝子発現は、全 RNA を抽出し、qRT-PCR により、タンパク質発現は組織の免疫染色や western blot による解析を行った。

### (7) RTT モデルマウスに対する治療因子の投与による治療効果の検討

6 週齢の MeCP2 欠損、ならびにコントロール野生型マウスに治療候補因子を投与することで、その体重、生存率及び組織における遺伝子発現を調べた。治療候補因子の投与は MeCP2 欠損マウスに対しては、毎日、死亡時まで行い、体重を測定した。目的の組織に及ぼす影響は、治療因子を 2 週間投与後、目的の組織を摘出し、遺伝子発現を解析した。摘出した組織から全 RNA 抽出後、qRT-PCR による遺伝子発現を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) RTT モデル ES 細胞由来ミクログリアの分化誘導

コントロール野生型、及び MeCP2 欠損 ES 細胞を分化支持細胞とともに共培養し、ミクログリア/マクロファージの分化を促進するために、macrophage colony stimulating factor (M-CSF) を添加したところ、10 日以降に浮遊する細胞が観察された。この浮遊細胞を shake off 法によって回収し、免疫染色を行った結果、ミクログリアやマクロファージのマーカーとして知られる Iba1、CD11b、F4/80 を発現していた。回収したほとんどの細胞で CD11b を発現することから、この分化細胞をミクログリア/マクロファージ様細胞として実験に用いることにした。分化細胞の性質を比較評価するために、分化誘導後 5 日、10 日目の分化細胞を回収し、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現を解析した結果、コントロール細胞に対して、MeCP2 欠損細胞で 2 倍以上の差で増減した遺伝子が多数抽出された。また、その中には、免疫システムに関連する遺伝子がいくつか認められ、これらの遺伝子の病態との関連を進めている。その一方で、LPS、IL4 刺激への反応性や蛍光ビーズを用いた貪食能の解析では、大きな機能的な違いは認められず、遺伝子発現以外での生理活性の違いは見出せなかった。

### (2) RTT モデルマウス由来ミクログリアの特性解析

更に、MeCP2 欠損マウス由来のミクログリアの解析を行うため、新生仔マウスの主に皮質領域をトリプシン処理後、グリア細胞を 10 日間培養し、浮遊してくる細胞を回収した。回収した細胞は、そのほとんどが CD11b 陽性細胞であったため、それぞれ野生型、MeCP2 欠損マウス由来のミクログリアとして遺伝子発現の比較を行った。その結果、qRT-PCR によってミクログリ

アや免疫に関わる 31 遺伝子に関して発現を比較したところ、6 遺伝子で発現が低下する傾向が認められた。しかし、ES 細胞由来分化細胞と同様に、野生型と MeCP2 細胞において、遺伝子発現の変化は認められる一方で、サイトカイン刺激への反応性、貪食能など生理的な活性としての異常は認められなかった。以上の結果より、マウス由来初代培養マイクログリアや ES 細胞由来マイクログリア/マクロファージ様細胞は、MeCP2 欠損により遺伝子発現が変化する一方、生理機能は維持していると考えられた。

#### ( 3 ) RTT モデルマウス血球細胞における遺伝子発現の解析

先の実験により、MeCP2 欠損した ES 細胞由来マイクログリア/マクロファージ様細胞や、初代培養マイクログリアでは、コントロールの野生型細胞に比較して、遺伝子発現の変化が認められた。そこで、脳組織以外での *in vivo* の免疫系における MeCP2 欠損の影響を調べるために、野生型及び、MeCP2 欠損マウスにおける末梢血の白血球細胞における遺伝子発現を比較した。採血後、簡易的に白血球を濃縮するために、溶血処理後の細胞沈殿における遺伝子発現を qRT-PCR によって調べた結果、免疫関連の 16 遺伝子のうち、6 遺伝子で MeCP2 欠損による有意な増減が見出された。

#### ( 4 ) RTT モデルマウス血清におけるサイトカイン、ケモカインのプロファイリング

MeCP2 欠損により、*in vivo* の末梢血白血球細胞において遺伝子発現が変化することから、更に、血中のサイトカイン、ケモカインのプロファイリングを行った。その結果、23 因子を調べた中で、MeCP2 欠損により増減する 3 因子を見出した。これに関連して、3 種類の因子について血中濃度を比較したところ、MeCP2 欠損により、有意に血中濃度が変化する 2 つの因子を見出している。

#### ( 5 ) MeCP2 欠損マウスの脾臓、胸腺における遺伝子発現の解析

これまでの実験から、ES 由来マイクログリア/マクロファージ様分化細胞、初代培養マイクログリアともに、MeCP2 欠損細胞は、野生型と比較して、いくつかの遺伝子の発現が異なるものの、病態に関連する生理的活性の異常は見出せなかった、その一方で、*in vivo* の末梢血におけるサイトカインプロファイルが異なることから、免疫細胞の教育器官である脾臓、胸腺における遺伝子の発現を調べた。まず、6 または 8 週齢マウスの脾臓、胸腺を摘出した結果、MeCP2 欠損マウスの脾臓、胸腺は野生型マウスと比較して有意に小さかった。また更に、それぞれの組織から全 RNA を抽出後、qRT-PCR を行った結果、組織における免疫細胞の成熟や分化に関わる胸腺 18 遺伝子、脾臓 19 遺伝子のうち、それぞれ、10、7 遺伝子で発現の有意な変化が認められた。以上の結果から、MeCP2 欠損は免疫細胞の成熟組織である胸腺、脾臓の遺伝子発現を変化させ、機能に影響を及ぼす可能性が示された。

#### ( 6 ) RTT モデルマウスの死因の解析

MeCP2 欠損マウスは、生後 2-3 週目まで、ほぼ正常に発育するが、4 週目以降、発育遅滞、行動量低下などが認められ、7 週以降、死亡する個体がでてくる。これまで、その死因は、不整脈や呼吸異常による突然死とされてきたが、MeCP2 欠損マウスの病態を観察する過程で、死亡するまでには、劇的に衰弱する期間が存在し、突然死は多くないこと、更に、組織の摘出のための解剖の過程で、肺における部位特異的なゼリー状の傷害を見出した。そこで、肺組織を詳細に解析した結果、肺の傷害部位に、免疫細胞が集積し、foreign body の存在が明らかとなった。また、*in vivo* の誤嚥モデルによって MeCP2 欠損マウスでは、誤嚥を起こしやすいこと、更には、脳幹において、嚥下や咳反射に関わる Substance P の発現が低下することが示された。また、特に部位特異的な肺傷害の認められた個体では、全身の強い炎症反応を示す SAP (血清アミロイド P 成分: ヒトの C 反応性タンパク質に相当する)濃度が高く、MeCP2 欠損マウスは、

誤嚥性肺炎による強い全身性炎症反応により死亡している可能性が示された(Kida et al., Sci Rep 2017)。

#### (7) RTT モデルマウスに対する治療因子の投与による治療効果の検討

先の実験で、MeCP2 欠損マウスは誤嚥性肺炎による強い全身性炎症反応で死亡することが明らかとなった。そこで、現在、これまでの解析から治療効果が期待される因子を投与することで、マウスの病態に及ぼす影響の解析を試みている。予備実験ではあるが、治療候補因子の連日投与によって、体重を増加させる傾向が認められた。また、誤嚥による肺傷害に対する影響を調べるために、治療候補因子投与の有無における MeCP2 欠損マウス肺における炎症マーカー遺伝子の発現を調べたところ、投与群の肺では、炎症マーカー遺伝子の発現が低下する傾向が認められ、本治療候補因子の治療因子としての可能性が期待された。

以上のように、本研究課題において、RTT モデル ES 細胞やマウスにおけるミクログリアの病態への関わりを解析した。その結果、MeCP2 欠損ミクログリアや分化誘導したミクログリア/マクロファージ様細胞では、野生型細胞に比較して、遺伝子発現が変化する一方で、生理機能における明らかな異常は認められなかった。しかし、個体全身における免疫系は、MeCP2 欠損による影響を受けており、ミクログリアをはじめとする免疫系を制御する因子に関しては引き続き解析を続けている。

#### 5. 引用文献

Maizawa I, et al., Rett Syndrome Microglia Damage Dendrites and Synapses by the Elevated Release of Glutamate. *J Neurosci*, 2010, 30(15):5346-56.

Cronk JC, et al., Methyl-CpG Binding Protein 2 Regulates Microglia and Macrophage Gene Expression in Response to Inflammatory Stimuli. *Immunity*. 2015, 42(4):679-91.

Derecki MC., et al., Wild-type Microglia Arrest Pathology in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Nature*, 2012, 18;484(7392):105-9.

Wang J, et al., Wild-type microglia do not reverse pathology in mouse models of Rett syndrome. *Nature*, 2015, 521(7552):E1-4.

Okabe Y, et al., Neural development of methyl-CpG-binding protein 2 null embryonic stem cells: a system for studying Rett syndrome. *Brain Res*, 2010, 1360:17-27.

Okabe Y, et al., Alterations of gene expression and glutamate clearance in astrocytes derived from an MeCP2-null mouse model of Rett syndrome. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35354.

Hara M, et al., Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes Mecp2-null mice to arrhythmias. *Sci Rep*, 2015, 5:11204.

Kida H, et al., Pathogenesis of Lethal Aspiration Pneumonia in Mecp2-null Mouse Model for Rett Syndrome. *Sci Rep*, 2017, 7(1):12032.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kida H., Miura S., Yamanishi Y., Takahashi T., Kamada T., Yorita A., Ayabea M., Kida H., Hoshino T., Taniwaki T.	4. 巻 23(3)
2. 論文標題 Cervical dystonia in Parkinson's disease: Retrospective study of later-stage clinical features	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurol Asia	6. 最初と最後の頁 245-251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高橋知之・弓削康太郎・松石豊次郎・山下裕史朗	4. 巻 Vol. 81 No. 11, 12
2. 論文標題 レット症候群の病態とMeCP2の多様な役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 久留米医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 265-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kida H., Takahashi T., Nakamura Y., Kinoshita T., Hara M., Okamoto M., Okayama S., Nakamura K., Kosai K., Taniwaki T., Yamashita Y., Matsuishi T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Pathogenesis of Lethal Aspiration Pneumonia in Mecp2-null Mouse Model for Rett Syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 12032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-12293-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Goto K., Takemura G., Takahashi T., Okada H., Kanamori H., Kawamura I., Watanabe T., Morishita K., Tsujimoto A., Miyazaki N., Ushikoshi H., Kawasaki M., Mikami A., Kosai K., Minatoguchi S.	4. 巻 5
2. 論文標題 Intravenous Administration of Endothelial Colony-Forming Cells Overexpressing Integrin 1 Augments Angiogenesis in Ischemic Legs	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Stem Cells Transl Med	6. 最初と最後の頁 218-226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5966/sctm.2015-0096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mitsui K., Ide K., Takahashi T., Kosai K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Viral Vector-based Innovative Approaches to Directly Abolishing Tumorigenic Pluripotent Stem Cells for Safer Regenerative Medicine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 51-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2017.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 松石 豊次郎、弓削 康太郎、高橋 知之、永光 信一郎、山下 裕史朗
2. 発表標題 グレリンによるレット症候群の新規治療法の開発
3. 学会等名 第60回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 貴田 浩志、高橋 知之、中村 祐樹、木下 隆、岡山 聡子、中村 桂一郎、小賤 健一郎、谷脇 考恭、山下 裕史朗、松石 豊次郎
2. 発表標題 Pathogenesis of Lung Injury in Mecp2-null Mouse Model for Rett Syndrome
3. 学会等名 Conbio2017生命科学系学会合同年次大会(第90回日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kida H., Takahashi T., Nakamura Y., Kinoshita T., Okayama S., Nakamura K., Taniwaki T., Yamashita Y., Matsuishi T.
2. 発表標題 Lung abnormalities in Mecp2-null mouse model of Rett syndrome
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芳野 信、高橋 知之、福井 香織、渡邊 順子、石原 直忠、松成 ひとみ、板倉 鮎子、長嶋 比呂志
2. 発表標題 高アンモニア血症の新規治療法の開発
3. 学会等名 第1回ファーマラボEXPO
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松石豊次郎、弓削康太郎、織本健司、高橋知之、池田 恭
2. 発表標題 レット症候群のジストニアにグレリンは有効か？
3. 学会等名 第 34 回 日本大脳基底核研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaori Fukui, Tomoyuki Takahashi, Yoriko Watanabe, Yushiro Yamashita, Naotada Ishihara, Hitomi Matsunari, Ayuko Uchikura, Hiroshi Nagashima, Makoto Yoshino
2. 発表標題 A novel therapeutic strategy for hyperammonemia
3. 学会等名 第61回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 高アンモニア血症を治療するための医薬組成物	発明者 芳野 信、高橋知之、 福井 香織、石原 直 忠、長嶋 比呂志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、263487	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 高アンモニア血症を治療するための医薬組成物	発明者 芳野 信、高橋知之、 福井 香織、石原 直 忠、長嶋 比呂志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、675354	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	松石 豊次郎 (Matsuishi Toyojiro) (60157237)	久留米大学・高次脳疾患研究所・教授  (37104)	
連携研究者	隆弘 隆弘 (Kunisada Takahiro) (30205108)	岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  (13701)	
連携研究者	田中 永一郎 (Tanaka Eiichiro) (80188284)	久留米大学・医学部・教授  (37104)	
連携研究者	村井 恵良 (Murai Yoshinaka) (40322820)	久留米大学・医学部・准教授  (37104)	