

令和元年5月20日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18391

研究課題名(和文) 神経発達障害原因遺伝子MeCP2による神経細胞極性・軸索形成制御

研究課題名(英文) Regulation of axon formation by Rett syndrome gene MeCP2

研究代表者

辻村 啓太 (Tsujimura, Keita)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：60588474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、研究代表者がこれまでに明らかにした発達障害であるレット症候群の原因遺伝子産物MeCP2の新しい作用に基づいて実施した。培養神経細胞やマウスを用いた実験により、MeCP2が機能性小分子RNAを介して軸索形成を促進することを明らかにした。また、特定したMeCP2の下流分子の機能を操作することでレット症候群モデルマウスの表現型を改善できることを見出した。これらの研究成果は、発達障害の病態メカニズムと新しい治療戦略を提示する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、発達障害の原因因子が軸索形成を制御する分子基盤が明らかになった。これらは軸索形成の新たな分子基盤を提示した成果であり、学術的に重要な成果である。また、医学的にも発達障害の病態メカニズムの一端を解明した重要な成果であり、これらの病態機序に基づいた新規の治療法開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：This research project was performed based on the novel function of MeCP2, Rett syndrome responsible gene product, identified by principal investigator (PI) in the previous study. By conducting experiments using cultured neurons and mice, we found that MeCP2 promotes axon formation through functional small non-coding RNA. Also, we showed that manipulation of function of MeCP2 downstream molecule can restores phenotypes of Rett syndrome model mice. Taken together, these results show novel mechanism of developmental disorders and new avenues for therapy of Rett syndrome.

研究分野：神経科学

キーワード：MeCP2 レット症候群 発達障害 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

MeCP2 遺伝子の変異は、Rett 症候群を含めた種々の発達障害・精神疾患を引き起こすことが分かっているが、発症機序の詳細は不明である。RTT は、自閉症スペクトラム障害の一つであり、獲得された運動・言語能力の喪失、精神遅滞などによって特徴づけられる神経発達障害である。MeCP2 遺伝子を欠損したマウスでは RTT 患者と同様の表現型を示すことから、RTT モデルマウスとしてこのマウスを用いた組織・細胞レベルでの多くの研究が展開されている。例えば、レット症候群患者・モデルマウスの脳組織では、特にニューロンの細胞体サイズの減少および興奮性シナプス伝達の異常などが見られる(Chao T.H. et al., Neuron 2007)。しかし、MeCP2 遺伝子の変異が原因で RTT を含めた種々の発達障害・精神疾患が引き起こされる発症機序の詳細は不明である。

代表者は、これまでに知られていない MeCP2 の機能が存在する可能性を考慮し、プロテオミクス技術や次世代シーケンシング技術を用いた網羅的な解析から、MeCP2 が microRNA(miRNA) マイクロプロセッサーである Drosha 複合体と会合して、特定 miRNA の生合成(プロセッシング)を促進することを見いだした。また、MeCP2 標的 miRNA として miR-199a を同定し、この miR-199a が異常な興奮性シナプス伝達/形成、細胞体サイズの減少などの MeCP2 欠損ニューロンの代表的な各種表現型を改善できることを明らかにした。さらに詳細な解析により、miR-199a は mTOR シグナルを負に制御する因子の発現を抑制することで、最終的に mTOR シグナルの活性化を亢進すること、遺伝学的に miR-199a を欠損させたマウスは MeCP2 欠損マウスに見られる多くの表現型を示すことをつきとめた (Tsujiura et al., Cell Rep 2015)。これらの結果は、miR-199a が MeCP2 の下流で機能し、病態発症に決定的な役割を担っていることを強く示唆している。加えて、MeCP2/miR-199a が細胞極性・軸索形成の主要制御因子である GSK3 を標的することを見いだした。

MeCP2/miR-199a の下流標的である両者(mTOR シグナルと GSK3 )は神経細胞極性を制御することが報告されているから、MeCP2/miR-199a が神経細胞極性・軸索形成を制御するという着想に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、MeCP2/miR-199 による GSK3 (mTOR シグナル)を介した神経細胞極性・軸索形成制御を立証し、病態発症への寄与を明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

研究代表者はすでに MeCP2 が miR-199a を介して神経細胞極性・軸索形成の主要制御因子である GSK3 の発現を制御していることを見いだしている。本研究では、MeCP2/miR-199a/GSK3 軸が神経細胞極性・軸索形成を制御することを *in vitro* および *in vivo* において実証する。また、RTT 患者由来 iPS 細胞から誘導したニューロンや脳組織においても同様の結果が得られるか検証する。さらに MeCP2 欠損マウスに対して、GSK3 阻害剤の投与を行い、各種表現型の改善を評価することにより、マウス個体レベルで細胞極性・軸索形成制御不全の病態発症への寄与を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 海馬初代培養ニューロンに MeCP2、miR-199a、および GSK3 を発現させ、軸索の伸展を評価した。その結果、MeCP2 および miR-199a は軸索の長さと同様に GSK3 は軸索伸長を阻害することがわかった。MeCP2 と GSK3 の共発現では、MeCP2 の作用が消失したことから、GSK3 が下流で作用していることが考えられた。

(2) MeCP2 下流標的 miR-199a が MeCP2 欠損ニューロンの軸索形成不全を改善することができるか調べるために、MeCP2 欠損ニューロンに MeCP2 および miR-199a を発現させ、軸索形成を評価した。その結果、miR-199a は MeCP2 欠損ニューロンの軸索形成不全を野生型ニューロンと同程度にまで改善させた。このことから、独自に同定した MeCP2 標的 miR-199a が MeCP2 の下流で軸索形成を制御しているこ

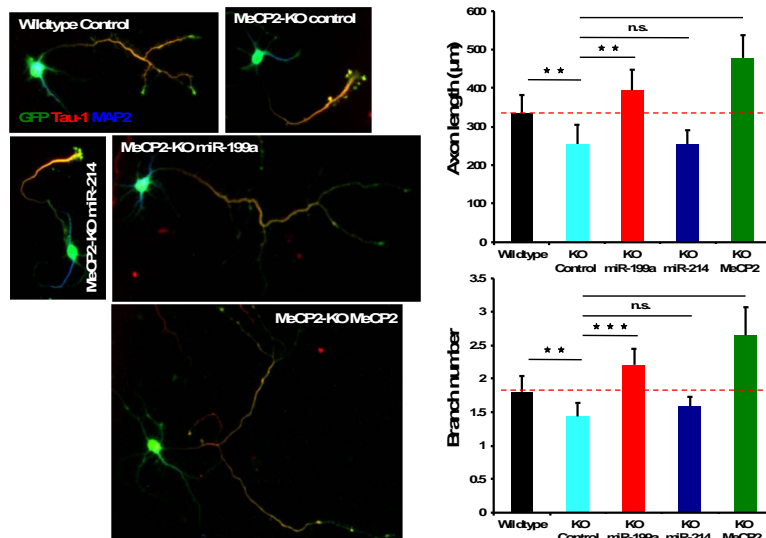


図1. MeCP2およびmiR-199aは、MeCP2欠損ニューロンの軸索形成不全を改善する

とが示唆された。

(3) miR-199a の阻害剤処理条件下においても軸索形成を評価した。その結果、miR-199a の阻害剤処理により野生型マウス由来ニューロンの軸索形成が阻害された。この結果は miR-199a が軸索形成に必須の役割を果たしていることを示している。

(4) *in vivo* マウス脳における MeCP2/miR-199a/GSK3 経路が軸索形成を制御するか否かについて検討を行なった。In utero エレクトロポレーション法により、*in vivo* マウス脳の神経細胞に MeCP2、miR-199a および GSK3 を導入し、軸索伸長を評価した。その結果、MeCP2 および miR-199a を発現するニューロンの突起伸長が促進された。MeCP2 と GSK3 を共発現するニューロンでは MeCP2 の作用が消失した。これらの結果は、*in vivo* マウス脳においても、MeCP2、miR-199a が軸索形成を促進すること、MeCP2 の下流で GSK3 が作用していることを示唆している。

(5) MeCP2 欠損マウスにおいて GSK3 を阻害することで、MeCP2 欠損マウスの表現型の改善がみられるかを調べた。MeCP2 欠損マウスに GSK3 阻害剤を投与した結果、MeCP2 欠損マウスにみられるいくつかの表現型の改善がみられた。このことから、MeCP2 による miRNA を介した GSK3 の制御不全がレット症候群の病態に寄与していることが考えられる。したがって、MeCP2/miR-199a/GSK3 経路はレット症候群の新規治療法の標的となることが示された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hideyuki Nakashima, **Keita Tsujimura# (#Corresponding author)**, Koichiro Irie, Masataka Ishizu, Miao Pan, Tomonori Kameda, Kinichi Nakashima#. Canonical TGF- $\beta$  Signaling Negatively Regulates Neuronal Morphogenesis through TGIF/Smad Complex-Mediated CRMP2 Suppression, *J Neurosci.*, 38(20), 4791-4810 (2018), 査読有

**Keita Tsujimura# (#Corresponding author)**, Hideyuki Nakashima, Koichiro Irie, Kinichi Nakashima#. Emerging roles for miRNA-based post-transcriptional regulation in neuronal morphogenesis and neurodevelopmental disorders. *RNA & DISEASE*, 3, e1456 (2016), 査読有 #These authors contributed equally to this work

Koichiro Irie, **Keita Tsujimura# (#Corresponding author)**, Hideyuki Nakashima, Kinichi Nakashima#. miR-214 regulates dendrite development by targeting Qki, *Journal of Biological Chemistry*, 291, 13891-13904 (2016), 査読有 #These authors contributed equally to this work

〔学会発表〕(計 4 件)

**辻村啓太**, Rett 症候群原因因子 MeCP2 による microRNA プロセッシングを起点とした神経機能制御のその応用、シンポジウム；マルチスケールに理解する脳機能 2018 年、10 月 2 日、名古屋、名古屋大学 研究大学強化促進事業 若手新分野フロンティア シンポジウム (招待講演)

**辻村啓太**, 精神障害の分子病態研究と治療法開発、名古屋大学の卓越・先端・次世代シンポジウム；生命科学のフロンティア、2018 年、1 月 11 日講演、名古屋、**名古屋大学** (招待講演)

**辻村啓太**, Rett 症候群の新たな分子病態メカニズム、公開セミナー；遺伝子疾患の治療展望、2017 年、12 月 26 日講演、春日井、**愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所** (招待講演)

**辻村啓太**, 神経発達障害原因因子 MeCP2 による神経機能制御の分子基盤、シンポジウム；神経・精神疾患における予防・治療標的探索研究の新展開、2017 年、3 月 24 日講演、仙台、**日本薬学会第 137 年会** (招待講演)

〔図書〕(計 3 件)

< 英文図書 >

**Keita Tsujimura# (#Corresponding author)**, Kinichi Nakashima#. Stem Cell Genetics for Biomedical Research 「Rett Syndrome and Stem Cell Research」*Springer (book)*, p27-41 (2018)

< 日本語図書 >

**辻村啓太**, 尾崎紀夫 最新医学社 マイクロ RNA を介した発達障害・精神障害の分子病態 最新医学 274 巻 3 号 p118-125 (2019)

**辻村啓太**, 中島欽一 日本生化学会 レット症候群病態に重要な MeCP2 の新機能:MeCP2 による microRNA プロセッシングを介した mTOR シグナル制御 生化学 89, p51-61 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<アウトリーチ活動>

辻村啓太、「脳の発達と病気のはなし」、名古屋大学オープンレクチャー、2019年3月21日

6. 研究組織

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。