

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16918

研究課題名（和文）ミクログリア機能異常と神経発達障害の発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanisms of microglial dysfunction and neurodevelopmental disorder

研究代表者

中嶋 秀行（Nakashima, Hideyuki）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00835390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は脳内免疫担当細胞ミクログリアに高発現し、細菌・ウイルス由来DNAを認識するToll様受容体9(TLR9)の遺伝子欠損マウスと MeCP2遺伝子欠損マウスを交配させ得られたTLR9/MeCP2ダブル欠損マウスでは、MeCP2単独欠損マウスと比べミクログリアの活性化が抑制され、寿命が著しく伸びることを見出した。そこで、TLR9のリガンドと想定している物質Xの阻害剤をMeCP2欠損マウスに投与したところ、MeCP2欠損マウスでみられるRTT様の表現型の改善及び寿命の延伸が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MeCP2遺伝子変異は、Rett症候群(RTT)をはじめ、自閉症、統合失調症などを含めた様々な精神疾患・発達障害への関与が示唆されているが、発症機序の詳細は不明である。本研究では、MeCP2KOマウスで観察されるミクログリアの活性化がRTT病態発症に関与しているとの仮説のもと、TLR9シグナルを抑制することでRTT様の表現型が改善することを見出した。今後は、TLR9のリガンドを同定しそのシグナル阻害剤などを投与することでRTT様の表現型が改善するかどうかを解析し、治療薬の開発へと繋げていきたい。

研究成果の概要（英文）：We crossed MeCP2-KO mice and Toll-like receptor 9 (TLR9), which is highly expressed in the microglia of immune-competent cells in the brain and recognizes DNA derived from bacteria and viruses, -KO mice. We found that TLR9/MeCP2 double-KO mice had a significantly longer life span than MeCP2-KO mice. We also found that microglial activation was suppressed in TLR9/MeCP2 double-KO mice compared to MeCP2-KO mice. Treatment of MeCP2-deficient mice with X, an inhibitor of the putative ligand for TLR9, improved the RTT-like phenotype observed in MeCP2-KO mice and extended their life span.

研究分野：神経科学

キーワード：レット症候群 MeCP2 ミクログリア TLR9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精神疾患・神経発達障害は「神経細胞（ニューロン）に生じた自律的な障害が疾患発症の原因になる」と考えられてきたが、最近、「非ニューロン細胞（アストロサイトやミクログリアなど）の機能異常に起因する非自律的な神経障害が疾患発症に深く関わること」が明らかになってきた。X染色体上に存在する *methyl-CpG binding protein 2* (*MeCP2*) 遺伝子の変異は、Rett 症候群 (RTT) をはじめ、自閉症、てんかん、統合失調症などを含めた様々な精神疾患・神経発達障害への関与が示唆されている (Chahrour et al. *Neuron* 2007)。RTT は獲得された運動、言語能力の喪失、精神遅滞、自閉症傾向などを示す進行性の神経発達障害であり、神経系細胞特異的に MeCP2 を欠損したマウスは RTT 患者と類似の表現型を示すこと (Chen et al. *Nat Genet* 2001) から、MeCP2 の神経系での機能が重要であることが示唆されているものの、RTT の表現型に関与する下流標的因子は未だに同定されておらず、RTT 発症機序の全貌は依然不明なままである。

これまで MeCP2 はニューロンの成熟調節が主な作用と考えられてきた (Kishi et al. *Mol cell Neurosci* 2004)。そのため、初期の研究ではニューロンにおける機能解析が特に進められ、MeCP2 欠損ニューロンではスパイン形成不全、興奮性シナプス伝達の異常を示すことなどが明らかにされてきた。しかし、最近 MeCP2 はニューロン以外の神経系細胞においても発現し機能していることが報告された。ミクログリアは中枢神経系における唯一の免疫細胞として知られているが、MeCP2 欠損ミクログリアは前シナプスを過剰に取り込むことにより病態形成に寄与することが明らかとなった (Schafer et al. *eLIFE* 2016)。さらに、MeCP2 欠損マウスにミクログリア特異的に MeCP2 を再発現させると、寿命の延長や体重の減少が回復することが示され (Clonk et al. *Immunity* 2015)、ミクログリアの機能異常が RTT 病態発症の一因である可能性が示唆され始めている。

近年、細菌・ウイルス由来の DNA を認識することが知られている TLR9 が、実は自己 DNA などの内因性リガンドを認識することで免疫細胞の活性化及び炎症性サイトカインの分泌を引き起こし、自己免疫疾患に関与することがわかり始めている (Kawai et al. *Nat Immunol* 2010)。また、MeCP2 欠損脳では樹状突起の長さ・分岐数が減少しており、異常な神経活動を示しけいれん発作を引き起こす。これまでの先行研究から、過剰に興奮することで傷害されたニューロンから放出される DNA 断片をミクログリアに高発現している TLR9 が認識することが報告されており、申請者は MeCP2 欠損脳では異常な神経活動による傷害されたニューロン由来の DNA 断片により、ミクログリアの TLR9 シグナルが活性化されることで、慢性的な炎症を引き起こされていると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、TLR9 欠損マウスと MeCP2 欠損マウスを交配させ得られる TLR9/MeCP2 ダブル欠損 (DKO) マウスおよび TLR9 のアダプター分子 MyD88 欠損マウスと MeCP2 欠損マウスを交配させ得られる MyD88/MeCP2-DKO マウスを解析し、TLR9 シグナルの異常が RTT 病態発症の一因であること及びそのメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

TLR9/MeCP2-DKO マウス、MyD88/MeCP2-DKO マウスにおいて MeCP2 欠損による表現型が改善されるかどうかを、組織学的評価および行動解析を行い検討した。組織学的評価に関しては、ミクログリアのマーカーである Iba1 抗体と活性化ミクログリアマーカーである CD68 抗体を用いて免疫染色を行った。また、ニューロンの形態はゴルジ染色を行い評価した。行動実験については MeCP2 欠損マウスで異常が見られているオープンフィールドテストを行い評価した。

4. 研究成果

TLR9/MeCP2-DKO マウスでは、MeCP2-KO マウスと比べ CD68 陽性かつ Iba1 陽性のミクログリアの数が減少しており、ミクログリアの活性化が抑制されていることが明らかとなった。また、ゴルジ染色を行った結果、MeCP2-KO マウスと比較し TLR9/MeCP2-DKO マウス海馬ではニューロンの突起の数が増加していることがわかった。さらに、TLR9/MeCP2-DKO マウスは、MeCP2-KO マウスと比べ寿命が著しく伸びることを見出した。オープンフィールドテストの結果、MeCP2-KO マウスと比較し TLR9/MeCP2-DKO マウスは自発的活動が増加していることが明らかとなった。

次に MyD88/MeCP2-DKO マウスにおいても同様の解析を行った。その結果、MyD88/MeCP2-DKO マウスは TLR9/MeCP2-DKO マウスと同様に、MeCP2-KO マウスと比べミクログリアの活性化が抑制されていることが明らかとなった。また、MeCP2-KO マウスと比較し寿命が著しく伸びることも見出した。

さらに、TLR9 のリガンドと想定している物質 X の阻害剤を MeCP2 欠損マウスに投与したところ、MeCP2 欠損マウスでみられる RTT 様の表現型の改善及び寿命の延伸が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Imamura T, Trujillo C, Ishizu M, Uesaka M, Pan M, Noguchi H, Okada K, Aoyagi K, Anodoh-Noda T, Okano H, Muotri A, Nakashima K	4. 巻 23
2. 論文標題 MeCP2 controls neural stem cell fate specification through miR-199a-mediated inhibition of BMP-Smad signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109124	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中嶋秀行、中島欽一
2. 発表標題 MeCP2-mediated miR-199a processing regulates fate specification of neural stem cells
3. 学会等名 NPBPPP2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋秀行、中島欽一
2. 発表標題 MeCP2-mediated miRNA processing regulates fate specification of neural stem cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋秀行、中島欽一
2. 発表標題 MeCP2 のマイクロ RNA プロセッシングを介した神経幹細胞分化制御機構
3. 学会等名 第14回神経発生討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hideyuki Nakashima, Keita Tsujimura, Koichiro Irie, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima
2. 発表標題 Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, mediated by microRNA in neural stem cells fate specification
3. 学会等名 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideyuki Nakashima, Keita Tsujimura, Koichiro Irie, Takuya Imamura, Kinichi Nakashima
2. 発表標題 MeCP2-mediated miR-199a processing regulates fate specification of neural stem cells
3. 学会等名 SFN2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、今村拓也、中島欽一
2. 発表標題 Rett症候群原因因子MeCP2はmiR-199aを介して神経幹細胞の分化運命決定を制御する
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋秀行
2. 発表標題 自己内在性リガンドを介したミクログリア活性化に起因するレット症候群発症機構の解明と治療法の確立
3. 学会等名 2020レット症候群とMeCP2重複症候群(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中嶋秀行、中嶋欽一
2. 発表標題 内在性DNAを介したミクログリア活性化によるレッド症候群発症の可能性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中嶋秀行、中嶋欽一
2. 発表標題 内在性DNAを介したミクログリア活性化によるレッド症候群発症の可能性
3. 学会等名 第15回神経発生討論会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関