

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08224

研究課題名(和文) Rett症候群治療を目指したmiRNA補充療法のモデル動物での検討

研究課題名(英文) miRNA administration therapy for Rett syndrome model mice

研究代表者

中山 敦雄 (Nakayama, Atsuo)

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・部長

研究者番号：50227964

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)：レット症候群原因遺伝子MECP2の遺伝子治療は適切な発現制御が困難なため、臨床応用に至っていない。MECP2下流の機能分子miR-199aを新規の補充遺伝子とした当初の研究計画は、Mecp2-KOマウスが生後4-5週で死亡しmiR-199aの効果判定が困難だったため、KOマウスの延命効果があるMecp2自体を発現させる新たなベクター開発に目的を変更した。治療標的細部をオリゴデンドログリアに絞り、この細胞で高活性のCNP遺伝子プロモーター下でMecp2を発現するベクターを構築した。このベクターは経静脈投与によって期待した延命効果が得られたが、延命後の筋力低下は十分改善されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多機能分子MECP2の遺伝子変化によるレット症候群では、原因遺伝子がわかっているにも関わらず遺伝子治療の臨床応用は困難となっている。これはMECP2を過不足なくさまざまな細胞腫で発現させることが必要だが、それが難しいためである。今回の研究ではレット症候群遺伝子治療に向けて、神経細胞のみでなくオリゴデンドログリアでのMECP2発現回復が生命予後改善に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：MECP2 gene, whose mutations are the common cause of Rett syndrome, is also harmful for normal CNS development, when its expression is excessive. Therefore we originally planned to search other target genes useful for the gene therapy against Rett syndrome. We originally focused on miR-199a, which is one of downstream effector of Mecp2. However, Mecp2 KO mice (Mecp2^{-/-}/y) could survive no longer than 5 weeks after birth, and were not available for gene therapy assessment. Therefore, we changed the original plan and tried to develop gene therapy vectors that enable KO mice to survive longer. Among AAV vectors to express Mecp2 itself under several different promoters including Mecp2 promoter itself, only AAV.PHP.eB-CNPpro-Mecp2-2A-RFP vector, which induce Mecp2 expression in oligodendrocyte, showed life-prolonging effects on KO mice by intravenous administration. This suggested that the early death of KO mice is due to loss of MECP2 in oligodendrocytes.

研究分野：病理学

キーワード：Rett syndrome MECP2 gene therapy oligodendrocyte AAV

1. 研究開始当初の背景

Rett 症候群は女児 1 万人に 1 人弱の有病率を示す発達障害で、大部分はメチル化 DNA 結合タンパク Methyl-CpG-binding protein2 (MeCP2) をコードする *MECP2* 遺伝子の変異により引き起こされる。遺伝子改変モデルマウスや iPS 細胞を含む患者検体を用いた精力的な研究にも関わらず、MeCP2 の機能が複雑かつ多岐に及ぶため、神経発達障害に至る病態機構は十分解明されていない。一方で大多数の患者は *MECP2* の機能喪失型変異によるハプロ不全が原因になっているため、正常遺伝子補充治療を目指した研究も進められている。しかし、*MECP2* は発現過剰でも有害となる至適発現範囲の狭い遺伝子であるため、その発現制御や投与方法を動物実験で検討する段階で停滞している。

2. 研究の目的

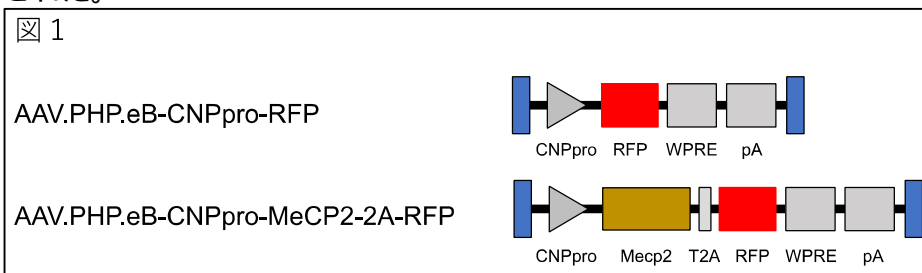
至適発現制御の困難な *MECP2* そのものの代替遺伝子として MeCP2 シグナル下流の制御因子として同定された miRNA である miR-199a に着目する。miR-199a 遺伝子が Rett 症候群での実用的な遺伝子治療標的になりうるか否かをモデルマウスにて検討し、明らかにすることが当初の目的であった。しかし、モデルとして用いた *Mecp2*-KO オスマウス (*Mecp2*^{-y}) は文献報告されているよりも生存期間が短く、神経症状を呈する以前の生後 6 週までに全て死亡した。さらに出生直後に *Mecp2* プロモーター制御下で *Mecp2* (コントロール) または miR-199a を発現するウイルスベクターを導入しても、延命効果は見られなかった。このため当初の目的を修正し、*Mecp2*-KO オスマウス (*Mecp2*^{-y}) の延命効果が得られる *Mecp2* 発現ベクターの開発を目的とした。

3. 研究の方法

我々は *Mecp2*-KO オスマウスが白質形成不全モデルマウスの様に全身発育低下と衰弱により死亡していくこと、*Mecp2* がオリゴデンドログリアの正常分化に必要 (Sharma et al, J Mol Neurosci 2015) であること、オリゴデンドログリアでの *Mecp2* 欠損がモデルマウスの神経症状に寄与している (Nguyen et al, J Neurosci 2013) ことから、モデルマウス延命にはオリゴデンドログリアでの *Mecp2* 発現回復が必要であると考え、オリゴデンドログリアとシュワン細胞に高発現する 2', 3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase (CNP) プロモーター制御下で *Mecp2* を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを構築し、これを *Mecp2*-KO オスマウスに経静脈投与し、生存評価と神経学的な評価を行った。

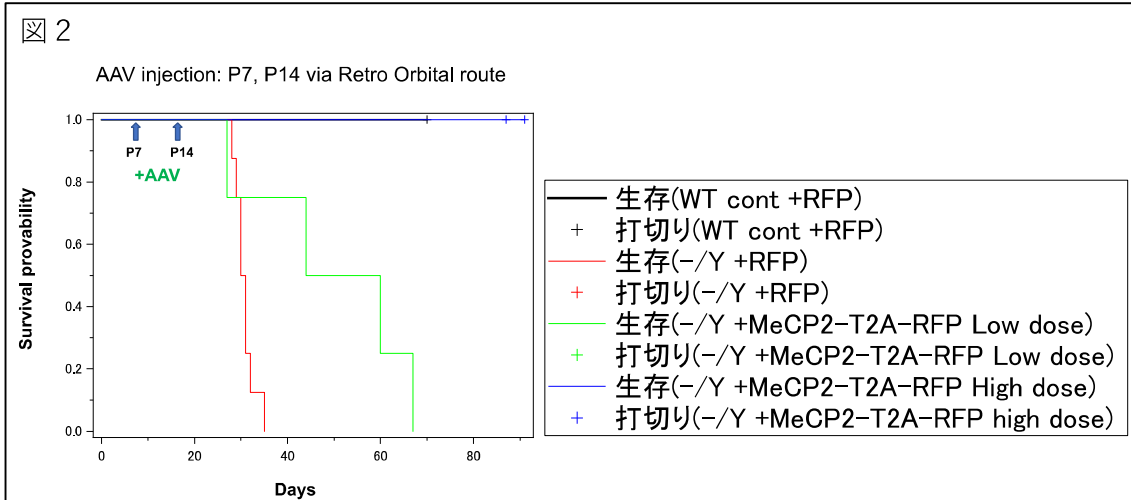
4. 研究成果

図 1 にマウス AAV ベクターのシェーマを示す。AAV.PHP.eB-CNPpro-MeCP2-2A-RFP が今回実験に使われたベクターであり、AAV.PHP.eB-CNPpro-RFP はコントロールとして使用された。

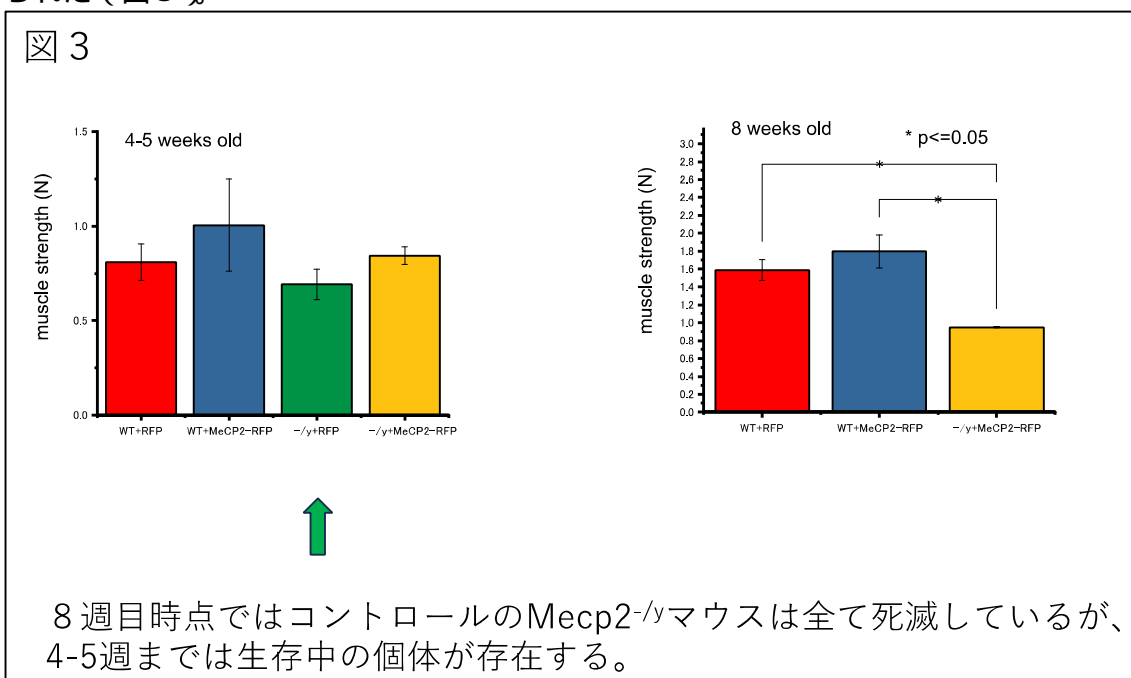


このベクターを 2 種類のタイター (High: 1×10^{13} vg/ml, Low: 1×10^{11} vg/ml) で準備し、それぞれを同様のプロトコールで眼窩後静脈叢に投与した。[投与プロトコール: 生後 7 日 $20 \mu\text{l}$ 、生後 14 日 $60 \mu\text{l}$]

その結果、投与量に応じた延命効果が見られた (図 2)。すなわちコントロール群 (図中赤線) が生後 5 週までに全て死亡するのに対し、低タイター投与群 (図中緑線: Low dose) は最長生後 10 週までの延命が見られ、高タイター投与群 (図中青線: High dose) は全て生後 12 週まで生存した。



高タイター投与群に関しては8週時点での筋力測定を行ったところ、筋力の低下が認められた(図3)。



以上の結果から、*Mecp2*-KO オスマウスの出生後早期死亡はオリゴデンドログリアでの *Mecp2* 発現欠如によるものであることが強く示唆された。しかし筋力低下が進行したことから、オリゴデンドログリアでの *Mecp2* 発現のみではこのモデルマウスの筋力低下の発症を止めることはできないことが示唆された。*Mecp2*-KO オスマウス、ひいては Rett 症候群患者の多様な症状は様々な細胞種での *Mecp2* 欠損や低下による細胞機能障害の複合的な結果であることが再確認された。Rett 症候群遺伝子治療の臨床適用のためには種々の細胞で適切な時期に、適切な量の MECP2 を発現させることが肝要で、さらなる詳細な知見の集積が必要と考えられた。

なお本研究は繁殖が困難な *Mecp2*-KO マウスを用いたため、期間内に必要十分なマウスを得ることができなかったため、引き続き *Mecp2*-KO マウスのコロニーを維持して論文作成のための追加実験を行なっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Toya Akie, Fukada Masahide, Aoki Eiko, Matsuki Tohru, Ueda Masashi, Eda Shima, Hashizume Yoshio, Iio Akio, Masaki Shigeo, Nakayama Atsuo	4. 巻 16
2. 論文標題 The distribution of neuroligin4, an autism-related postsynaptic molecule, in the human brain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-023-00999-y	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 Adachi Junya, Aoki Yoshihiko, Izumi Hiroto, Nishiyama Takeshi, Nakayama Atsuo, Sana Masatoshi, Morimoto Kyoko, Kaetsu Atsuo, Shirozu Takamasa, Osumi Eriko, Matsuoka Michiko, Hayakawa Eri, Maeda Nasel, Machida Junichiro, Nagao Toru, Tokita Yoshihito	4. 巻 10
2. 論文標題 Novel WNT10A variant in a Japanese case of nonsyndromic oligodontia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-023-00230-3	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 Inamura Naoko, Go Shinji, Watanabe Takashi, Takase Hiroshi, Takakura Nobuyuki, Nakayama Atsuo, Takebayashi Hirohide, Matsuda Junko, Enokido Yasushi	4. 巻 31
2. 論文標題 Reduction in miR-219 expression underlies cellular pathogenesis of oligodendrocytes in a mouse model of Krabbe disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bpa.12951	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 Matsuki Tohru, Iio Akio, Ueda Masashi, Tsuneura Yumi, Howell Brian W., Nakayama Atsuo	4. 巻 41
2. 論文標題 STK25 and MST3 Have Overlapping Roles to Regulate Rho GTPases during Cortical Development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8887 ~ 8903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0523-21.2021	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 Ueda Masashi, Matsuki Tohru, Fukada Masahide, Eda Shima, Toya Akie, Iio Akio, Tabata Hidenori, Nakayama Atsuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Knockdown of Son, a mouse homologue of the ZTTK syndrome gene, causes neuronal migration defects and dendritic spine abnormalities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 00-00
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00622-4	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 Inamura Naoko, Go Shinji, Watanabe Takashi, Takase Hiroshi, Takakura Nobuyuki, Nakayama Atsuo, Takebayashi Hirohide, Matsuda Junko, Enokido Yasushi	4. 巻 online ahead of print
2. 論文標題 Reduction in miR 219 expression underlies cellular pathogenesis of oligodendrocytes in a mouse model of Krabbe disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 00-00
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa.12951	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 Tsuneura Yumi, Kawai Taeko, Yamada Keitaro, Aoki Shintaro, Nakashima Mitsuko, Eda Shima, Matsuki Tohru, Nishikawa Masashi, Nagata Koh-ichi, Enokido Yasushi, Saitsu Hiroto, Nakayama Atsuo	4. 巻 2023
2. 論文標題 A Novel Constitutively Active c.98G>C, p.(R33P) Variant in RAB11A Associated with Intellectual Disability Promotes Neuritogenesis and Affects Oligodendroglial Arborization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Mutation	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2023/8126544	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Inamura N, Go S, Watanabe T, Takase H, Nakayama A, Takebayashi H, Matsuda J, Enokido Y
2. 発表標題 miR-219 restored oligodendrocyte development impaired in a mouse model of Krabbe disease
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inamura N, Go S, Watanabe T, Takase H, Nakayama A, Takebayashi H, Matsuda J, Enokido Y
2. 発表標題 miR-219 ameliorates pathogenesis of oligodendrocyte in a mouse model of Krabbe disease
3. 学会等名 第44回分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松木亨、上田昌史、戸谷明恵、田畑秀典、永田浩一、伊藤秀明、笠井謙次、中山敦雄
2. 発表標題 原発性常染色体劣性小頭症原因遺伝子STILがシナプス可塑性に果たす役割
3. 学会等名 第93回日本組織培養学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山敦雄、松木亨、田畑秀典、永田浩一、伊藤秀明、笠井謙次
2. 発表標題 原発性小頭症遺伝子MCPH7(STIL)の神経発生における役割の解析
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 常浦祐未、松木亨、榎戸靖、稲村直子、河合妙子、江田志磨、中山敦雄
2. 発表標題 神経発達障害・知的障害患者から同定されたRAB11A遺伝子多型が神経形態に与える影響
3. 学会等名 第95回日本組織培養学会大会
4. 発表年 2023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
研究 分担者	松木 亨 (Matsuki Tour) (90332329)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・細胞病態研究部・主任研究員 (83902)	

	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
研究 協力者	榎戸 靖 (Enokido Yasushi)		
研究 協力者	稲村 直子 (Inamura Naoko)		

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
---------	---------