

令和元年6月25日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19642

研究課題名（和文）神経イオンチャネル障害から見たレット症候群の病態解明と治療薬の探索研究

研究課題名（英文）The study about ion channel disorder of central nervous system in Rett's syndrome

研究代表者

貴田 浩志（KIDA, HIROSHI）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80529454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：レット症候群(RTT)はMeCP2遺伝子変異が主因の女児で発症する発達障害である。本研究ではMeCP2遺伝子変異が中枢神経イオンチャネル、神経伝達物質の発現に与える影響を解析した。ES細胞から分化誘導したグルタミン酸作動性神経においてイオンチャネルを含めた、その成熟障害を示唆する所見が得られた。RTTモデルマウスにおいては、脳幹における神経伝達物質発現の異常が嚥下反射障害から誤嚥性肺炎を惹起し、その予後に影響していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、RTTマウスでの脳幹機能不全からの嚥下反射障害、それに惹起される誤嚥性肺炎がその自然歴に与える影響が明らかになった。RTT症例においても、同様の機序からの誤嚥性肺炎はその生命予後に大きな影響を与えていると考えられる。本研究の成果により、今後、脳幹嚥下中枢の機能是正をターゲットとした、RTTに対する予後改善治療の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder predominantly affecting females. Most cases of RTT are caused by de novo mutations in methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) gene on X chromosome. In this study, we analyzed the effect of MeCP2 mutation on the expression of central nervous ion channels and neurotransmitters. Glutamatergic neurons induced from RTT model ES cells were tended to immature. In RTT model mice, it was revealed that abnormal neurotransmitter expression in the brainstem caused aspiration pneumonia from dysphagia and affected its prognosis.

研究分野：神経内科学

キーワード：レット症候群 モデルマウス ES細胞 イオンチャネル 神経伝達物質 誤嚥性配線

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

1. 研究開始当初の背景

Rett 症候群 (RTT) は女児の約 1-1.5 万人に 1 人の頻度で発症する重度の進行性神経発達障害である。通常、生後半年は、ほぼ正常な発達を示すが、それ以後、身体発育不全、自閉傾向、獲得言語の喪失や認知機能障害を生ずる。筋緊張低下により這々や歩行が不可能となる "ロコモーション障害" と称される運動症状を生じ、年齢依存的に特有の上肢の常同運動、ジストニア、パーキンソン症状を発現し、早くに完全臥床となる。また自律神経障害による呼吸、循環障害、てんかん発作を来し、多くが若くして死亡する予後不良の疾患である。

主な病原遺伝子として、中枢神経に発現する Methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) 遺伝子が同定されており、MeCP2 欠損マウスは、RTT 症状を再現する病態モデル動物となることが知られている。MeCP2 は、エピジェネティックな遺伝子発現調節の中核因子であり、その変異による種々の遺伝子発現の制御障害が病態に関与していると考えられている。

近年、申請者らは、MeCP2 欠損マウスの心電図の異常を解析する過程で、MeCP2 欠損マウスの心臓では、ある種のイオンチャネル遺伝子の発現に異常が起ることを発見し、その発現異常が QT 延長などの不整脈に関わる可能性を見出した (Hara M, et al. Sci Rep ' 2015)。とりわけ、MeCP2 欠損心臓における Hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels (HCNs) ファミリー遺伝子の発現低下は顕著であり、HCN1、2、3、4 遺伝子は、心臓のみならず中枢神経系にも発現していることから、HCNs の中枢神経系の病態における関与も示唆された。

HCNs は、心筋細胞や脳神経細胞に発現し、細胞膜の過分極により活性化するイオンチャネルであり、膜電位を脱分極方向に戻そうとする働きを担う。中枢神経系では、HCNs は静止膜電位の決定に寄与して細胞の興奮性に大きな影響を与えるだけでなく、樹状突起や神経終末にも存在して神経伝達の調節に対しても調節機能を有することが報告されている。従って、HCNs チャネル活性のわずかな変化が神経ネットワークに大きな影響を与える。また近年、細胞の興奮性や神経伝達効率の変化を背景とするような中枢神経疾患(パーキンソン病、アルツハイマー病、てんかん)と HCNs 機能障害との関係も示唆され、実際、HCNs 活性は、てんかん発作閾値や神経細胞の虚血に対する抵抗性に影響を与えることが報告されている。

2. 研究の目的

以上の学術的背景から、主症状としてパーキンソニズムやてんかんを生ずる RTT においても、中枢神経系の 1 次性もしくは、2 次性の HCNs チャネルパシーが、その病態形成に関与する可能性が示唆される。MeCP2 欠損マウス、及び ES 細胞を用いて、その中枢神経系における HCNs を中心としたイオンチャネルの発現、機能を解析することで、HCNs を軸とした中枢神経系イオンチャネルパシーの RTT 病態への関与を解明し、イオンチャネル作用薬のスクリーニングによる新規 RTT 治療法の開発を目的として、本研究を実施した。

3. 研究の方法

(1)MeCP2 欠損 ES 細胞から分化誘導したグルタミン酸作動性神経を用いた解析: 本施設で有する MeCP2 欠損 (Mecp2^{-/-}) およびコントロール wild-type (WT) ES 細胞を用いて、SFEB 法を改変した手法によりグルタミン酸作動性神経の分化誘導を行い、MeCP2 の欠損がイオンチャネルを含めた神経細胞の成熟に与える影響を調べた。

(2)MeCP2 欠損マウス肺の病理学的解析: 本施設では、Bird-A らに RTT モデル動物として樹立された MeCP2 欠損マウスを維持している (Guy-J, et al., Nat Genetics ' 2001)。研究を進める過程において、MeCP2 欠損マウスでは野生型と比較して、高頻度に肺組織の損傷が認められることを見出し、中枢神経機能不全とその関連を追及して研究を行った。本研究では 7-10 週齢で適合させたオスの C57BL/6 の MeCP2 欠損マウス (B6.129P2(c)-Mecp2^{tm1.1Bird/J} stain)、およびコントロール WT マウスを麻酔下でマウス開胸し、肺の損傷の有無を肉眼的、顕微鏡的に観察した。

(3)MeCP2 欠損マウスの嚙下機能評価: MeCP2 欠損マウスの中枢神経成熟評価において、その嚙下中枢の機能不全が示唆されたことから、LacZ 搭載ウイルスベクターを用いた誤嚙評価を行なった。LacZ 搭載差でのウイルスベクターを経鼻投与する手法を用いた。その後解剖してガラクトシダーゼ染色を行った。

(4)MeCP2 欠損マウスの中枢神経成熟評価: その脳組織、特に脳幹組織におけるイオンチャネル、神経伝達物質およびその合成酵素の発現を qRT-PCR および免疫染色を用いて解析した。

4. 研究成果

(1)MeCP2 欠損、およびコントロール WT-ES 細胞を SFEB 法の改変法により、グルタミン酸作動性神経を分化誘導し、そこから回収した cDNA を元に qRT-PCR を実施した。

分化誘導後、5、10 日目の試料を用い、神経分化に関わる Sox2、Mash1、MAP2、NCAM をはじめとする様々な分化マーカーの発現を比較したが、MeCP2 欠損、WT-ES 細胞由来の分化細胞では、5、10 日と経時的に分化マーカーの発現が増加するものの、MeCP2 欠損による発現の変化は認められなかった。しかしながら、HCN1,2,3,4 に関しても評価したところ、HCN1 に関しては、分化

誘導後 10 日目に MeCP2 欠損細胞で低い傾向が認められた。以上の結果から、MeCP2 欠損細胞は、神経細胞への分化能は保存されている一方で、機能発現や成熟過程に関わるイオンチャンネルなどの発現に異常が認められることが考えられる。分化誘導後の使用に関する DNA マイクロアレイによる解析を進めており、今後、病態に関連する遺伝子の探索が期待される。

(2) 吸入麻酔下でマウス開胸し、肺の損傷の有無を肉眼的に観察した。MeCP2 欠損マウスでは生前開胸のものでおよそ 60%、死後開胸のものでは 80% 以上で肺肺葉の一部に限局してうっ血しゼラチン状に変化している像が認められた。

MeCP2 欠損マウスでの肺障害は高頻度に RA ; Right anterior lobe に限局して生じることが明らかになった。肺のパラフィン切片による病理学的な評価で MeCP2 欠損マウスでは炎症細胞が集簇して浸潤している部分を認めた。偏光顕微鏡で食物塊の誤嚥によると思われる foreign body (異物) が確認され、MeCP2 欠損マウスにおける肺損傷の本態は誤嚥性肺炎であることを明らかにした(図 1)。

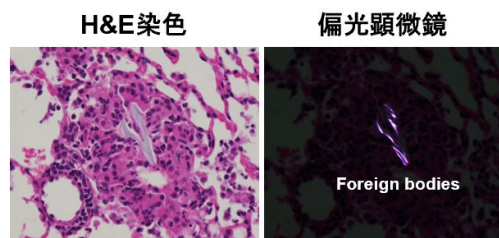


図1. MeCP2欠損マウス肺で見られた異物

(3) MeCP2 欠損マウスで実際に誤嚥を生じるかを確認するため LacZ 搭載ウイルスベクターを用いた誤嚥評価を行なった。覚醒状態のマウスに経鼻的に LacZ 搭載差でのウイルスベクターを経鼻投与する手法を用いた。その後解剖してガラクトシダーゼ染色を行い、MeCP2 欠損マウスでは 64% で誤嚥を生じていた。MeCP2 欠損マウスでは末梢および中枢神経における、嚥下反射の形成不全により、誤嚥を生じやすくなっていることが示唆された。

(4) 事前の予備実験において、全脳をサンプルとした qRT-PCR では MeCP2 欠損マウスでは HCNs のうち HCN2, HCN3 の発現が低下する傾向が認められていた。本研究ではそれらに加えて種々の神経伝達物質の合成酵素の遺伝子の発現を評価し、その多くで低下が見られた。特に SP 作動性神経マーカーである Tac, TacR の低下が著しく、GABA 作動性神経マーカー (GAD67, VGAT)、グルタミン酸作動性神経マーカー (Vglut) の発現低下も見られた。また嚥下中枢の存在する脳幹のみを摘出し、そこから回収した cDNA を用いて qRT-PCR を行ったところ、全脳の場合と同様の結果が得られた。また、嚥下中枢である延髄孤束核におけるサブスタンス P の実際の発現を確認するためにその免疫染色を行なった。MeCP2 欠損マウス、特に肺に障害が認められたものについてはその発現は著しく発現が低下しており、SP 陽性範囲の定量評価でも明らかであった。MeCP2 欠損マウスでは中枢神経回路の刺激伝達系の成熟障害からの神経伝達物質の放出障害とチャンネル機能不全から嚥下反射の形成不全を来している可能性が示唆された。

以上の結果から、MeCP2 は SP などの神経伝達物質の発現制御を介して、下位脳幹を中心とする嚥下関連神経回路における嚥下反射・咳反射の調節に関与していることが明らかになった。RTT ではその破たんによって嚥下反射・咳反射の障害から気管内への「嚥下反射不全による喉頭蓋の閉鎖不全による異物の流入」と「咳嗽反射不全による異物排泄障害」異物流入と滞留を生じやすくなり、誤嚥性肺炎の発症につながっていると考えられる。ES 細胞から分化誘導したグルタミン酸作動性神経で確認された HCNs の発現低下は神経細胞における活動電位の発生、筋収縮、神経伝達物質の放出の調節の異常を介して、脳幹における嚥下反射障害の異常をさらに悪化させている可能性が示唆される。本研究で得られたこれらの結果は RTT の病態の解明とともに、脳幹における嚥下中枢の機能是正をターゲットとした RTT の予後改善の開発につながる重要な知見であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

西尾薫理, 今石裕人, 藤本剛史, 駒井幹, 牛嶋公生, 貴田浩志, 真田咲子. 抗 NMDA 受容体脳炎の 2 例. 福岡産科婦人科学会雑誌. 2015;39:12-16. (査読有り)

Kida H, Sano K, Yorita A, Miura S, Ayabe M, Hayashi Y, Nishino I, Taniwaki T. First Japanese case of muscular dystrophy caused by a mutation in the anoctamin 5 gene. *Neurol Clin Neurosci*. 2015;3:150-152. (査読有り)

Sano K, Miura S, Fujiwara T, Fujioka R, Yorita A, Noda K, Kida H, Azuma K, Kaieda S, Yamamoto K, Taniwaki T, Fukumaki Y, Shibata H. A novel missense mutation of RYR1 in familial idiopathic hyper CK-emia. *J Neurol Sci*. 2015;356:142-147. (査読有り)

Kida H, Takahashi T, Nakamura Y, Kinoshita T, Hara M, Okamoto M, Okayama S, Nakamura K, Kosai KI, Taniwaki T, Yamashita Y, Matsuishi T. Pathogenesis of Lethal Aspiration Pneumonia in Mecp2-null Mouse Model for Rett Syndrome. *Sci Rep*. 2017;7:12032. doi: 10.1038/s41598-017-12293-8. (査読有り)

Kida H, Miura S, Yamanishi Y, Takahashi T, Kamada T, Yorita A, Ayabe M, Kida H, Hoshino

T, Taniwaki T. Cervical dystonia in Parkinson's disease: Retrospective study of later-stage clinical feature. *Neurology Asia* 2018;23:245-251. (査読有り)
Tanabe H, Higuchi Y, Yuan JH, Hashiguchi A, Yoshimura A, Ishihara S, Nozuma S, Okamoto Y, Matsuura E, Ishiura H, Mitsui J, Takashima R, Kokubun N, Maeda K, Asano Y, Sunami Y, Kono Y, Ishigaki Y, Yanamoto S, Fukae J, Kida H, Morita M, Tsuji S, Takashima H. Clinical and genetic features of Charcot-Marie-Tooth disease 2F and hereditary motor neuropathy 2B in Japan. *J Peripher Nerv Syst.* 2018;23:40-48. (査読有り)
頼田 章子, 貴田 浩志, 三浦 史郎, 森 慎一郎, 佐野 謙, 鎌田 崇嗣, 綾部 光芳, 安陪 等思, 谷脇 考恭. 脳底動脈の窓形成部に生じたアテローム血栓性脳梗塞の 1 例. *脳卒中* 2018;40:367-371(査読有り)
Kamada T, Miura S, Kida H, Irie KI, Yamanishi Y, Hoshino T, Taniwaki T. *J Neurol Sci.* MIBG myocardial scintigraphy in progressive supranuclear palsy. 2019;396:3-7. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

Kida H, Takahashi T, Nakamura Y, Kinoshita T, Okayama S, Nakamura K, Taniwaki T, Yamashita Y, Matsuishi T. Analysis of cardiac arrhythmias and gene expression in MeCP2-null mice. Lung abnormalities in Mecp2-null mouse model of Rett syndrome. XXIII World Congress of Neurology (2017 年 9 月. Kyoto, Japan)
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. レット症候群モデルマウスにおける肺病態の解析. Pathogenesis of Lung Injury in Mecp2-null Mouse Model for Rett Syndrome. 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)(2017 年 12 月. 兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

貴田浩志, 谷脇考恭. 肺疾患に伴う神経障害. 神経内科研修ノート (診断と治療社 2015)
6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 知之
ローマ字氏名：(TAKAHASHI, tomoyuki)

研究協力者氏名：松石 豊次郎
ローマ字氏名：(MATSUISHI, toyojiro)

研究協力者氏名：谷脇 考恭
ローマ字氏名：(TANIWAKI, takayuki)

研究協力者氏名：田中 永一郎
ローマ字氏名：(TANAKA, eiichiro)

研究協力者氏名：村井 恵良
ローマ字氏名：(MURAI, yoshinaka)

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。