

令和 3 年 4 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01390

研究課題名(和文) 非神経細胞とマイクロRNA生合成攪乱の観点から探る神経発達障害発症の分子基盤解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular bases in neurodevelopmental disorder from the aspects of non-neural cells and microRNA biosynthesis

研究代表者

中島 欽一 (Nakashima, Kinichi)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：80302892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：Rett症候群(RTT)は広汎性神経発達障害の1種であり、主にMECP2遺伝子変異によって発症する。今回我々は、MeCP2がmiR199aのプロセッシングを促進し、神経幹細胞の分化を制御していることを明らかにした。MeCP2欠損及びmiR-199a欠損海馬のシングルセル解析を行った結果、ニューロン細胞集団が減少、アストロサイト細胞集団が増加していた。また、miR-199はBMPシグナル下流の転写因子Smad1を標的とすることを示した。さらに、RTT患者由来iPS細胞を用いて作製した脳オルガノイドにBMPシグナルの阻害剤を添加したところ、その表現型を改善でき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

近年RNAプロセッシング異常が多くの神経疾患に関与するとの報告もなされていることから、本研究の成果は、他の神経疾患原因解明の一助となり得ると思われる。RTTの発症率は女児10,000人に1人とされており、遺伝病であることから治療が難しく、現時点での治療法は対症療法のみである。そのため、治療法の開発が急務となっている。本研究結果によりMeCP2によって制御されるmiRNAの標的因子やその因子が含まれるシグナル伝達経路が明らかとなったため、その因子の機能を直接、あるいは間接的に制御できる薬剤の投与により、RTTなどの精神神経疾患の病状を改善させることができるようになるのではないかと期待される。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome (RTT) is a severe neurological disorder with impaired brain development caused by mutations in MECP2, yet the underlying mechanism remains elusive. We have previously discovered that MeCP2 facilitates processing of a specific microRNA, miR-199a, by associating with Drosha complex to regulate neuronal functions. Here, we show that the MeCP2/miR-199a axis regulates neural stem/precursor cell (NS/PC) differentiation. We found a shift from neuronal to astrocytic differentiation of MeCP2- and miR-199a-deficient NS/PCs due to the upregulation of a miR-199a target, Smad1, a downstream transcription factor of bone morphogenetic protein (BMP) signaling. Moreover, miR-199a expression and treatment with BMP inhibitors rectified differentiation of RTT patient-derived NS/PCs and development of brain organoids, respectively, suggesting that facilitation of BMP signaling accounts for the impaired RTT brain development.

研究分野：神経科学

キーワード：レット症候群 MeCP2 マイクロRNA 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

精神疾患・発達障害は社会的負担の大きさや大幅な患者数の増加から、社会的な関心を強く集めている。これまで、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、「非神経細胞（主にグリア細胞）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 (Chahrouf 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るが、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の全て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。

このような状況の中、我々は以前に、MeCP2 の新たな機能を同定するため、質量分析による相互作用因子の探索を行った。その結果、MeCP2 は miRNA 生合成に関わる因子と相互作用し、特定 miRNA のプロセッシングに関与することを明らかにした (Tsujiura et al. *Cell Rep* 2015)。この論文では、MeCP2 がプロセッシングに関与する miRNA として miR-199a を同定し、そのニューロン機能における役割を解明したが、同時に miR-199a が神経幹細胞の分化にも影響を与えるという結果を得ていた。

2. 研究の目的

本研究の重要な目的は、我々が独自に同定した miRNA の神経幹細胞分化制御機構を明らかにすることであり、またその生合成破綻が RTT 発症の原因であることを生体内で証明することである。これにより、何故 MeCP2 変異が RTT を引き起こすのか、という長年の問いかけに対する答えを得ることができるものとする。また、近年 RNA プロセッシング異常が多く神経疾患に関与するとの報告もなされていることから、本研究の成果は、他の神経疾患原因解明の一助となり得ると思われる。RTT の発症率は女児 10,000 人に 1 人といわれており、遺伝病であることから治療が難しく、現時点での治療法は対症療法のみである。そのため、治療法の開発が急務となっている。本研究成果により MeCP2 によって制御される miRNA の標的因子が明らかとなれば、その因子の機能を直接、あるいは間接的に制御できる薬剤の投与により、RTT などの精神神経疾患の病状を改善させることができるようになるのではないかと期待される。

3. 研究の方法

まず脳の発生過程における MeCP2 及び miR-199a の機能を明らかにするため、生後 1 日目の MeCP2 欠損及び miR-199a 欠損マウス海馬の 1 細胞 RNA-seq (scRNA-seq) 解析を行った。次に、MeCP2、miR-199a が神経幹細胞の分化を制御しているかについて、胎生 14.5 日目の MeCP2 欠損及び miR-199a 欠損マウスから神経幹細胞を単離し、分化誘導を行った。また、MeCP2 欠損神経幹細胞に miR-199a を過剰発現させることで MeCP2 欠損神経幹細胞の分化傾向も観察した。

続いて、miR-199a がどのようなメカニズムで神経幹細胞の分化を制御しているかについて解析を行った。これまでの先行研究 (Lin et al. *J Biol Chem* 2009) により、miR-199a は骨形成因子 (BMP) シグナルの下流転写因子 Smad1 の 3'非翻訳領域に 2 つの seed 配列を保持していることが報告されている。また我々は以前、Smad1 がニューロン分化を抑制する因子、hairy and enhancer of split (Hes) や inhibitor of differentiation (Id) などの発現を促進すること (Nakashima et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001)、さらに転写共役因子 p300 と複合体を形成し、アストロサイト分化促進的に働くことを明らかにしていた (Nakashima et al. *Science* 1999)。そこで、miR-199a が Smad1 を標的にすることで神経幹細胞の分化を制御しているかどうかについて、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Smad1 mRNA-3'非翻訳領域を組み込んだレポーターコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイを行い検証した。

これまでに我々は MeCP2 が神経幹細胞のニューロンへの分化を促進し、アストロサイトへの分化を抑制することを明らかにしてきた (Tsujiura et al. *Exp Neurol* 2009)。そこで、RTT 患者由来 iPS 細胞から脳オルガノイドを作製し神経幹細胞の分化傾向を検討した。さらに、RTT 患者由来 iPS 細胞を用いて作製した脳オルガノイドに BMP シグナルの阻害剤を添加し、RTT 患者 iPS 細胞由来脳オルガノイドの表現型を改善できるかどうかを調べた。

4. 研究成果

生後 1 日目の MeCP2 欠損及び miR-199a 欠損海馬のシングルセル解析において、MeCP2 欠損及び miR-199a 欠損マウス海馬ではニューロン細胞集団が野生型マウス海馬より減少しており、アストロサイト細胞集団が野生型海馬より増加していることが明らかとなった。次に、胎生 14.5

日目の MeCP2 欠損及び miR-199a 欠損マウスから神経幹細胞を単離し、分化傾向をしらべた結果、MeCP2 欠損及び miR-199a 欠損神経幹細胞はニューロンへの分化が減少し、アストロサイトへの分化が増加していることが明らかになった。また、MeCP2 欠損神経幹細胞に miR-199a を過剰発現させることで MeCP2 欠損神経幹細胞のニューロン分化及びアストロサイト分化異常が改善することが明らかとなった。

次に、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に Smad1 mRNA-3'非翻訳領域を組み込んだレポーターコンストラクト用ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、miR-199a を過剰発現することでルシフェラーゼの活性が抑制されることがわかり、miR-199a は Smad1 を標的にしていることを突き止めた。

最後に、RTT 患者由来 iPS 細胞から脳オルガノイドを作製し神経幹細胞の分化傾向を検討した。その結果、RTT 患者由来脳オルガノイドは正常の脳オルガノイドと比較し、ニューロンへの分化が減少し、アストロサイトへの分化が増加していることがわかった。また、RTT 患者由来脳オルガノイドでは Smad1 の発現が増加しており、BMP シグナルの活性化が増加していることが明らかとなった。さらに、RTT 患者由来 iPS 細胞を用いて作製した脳オルガノイドに BMP シグナルの阻害剤を添加したところ、RTT 患者 iPS 細胞由来脳オルガノイドの表現型を改善できることが明らかとなった。

以下にこれらの結果をまとめた模式図を示す (図 1)。

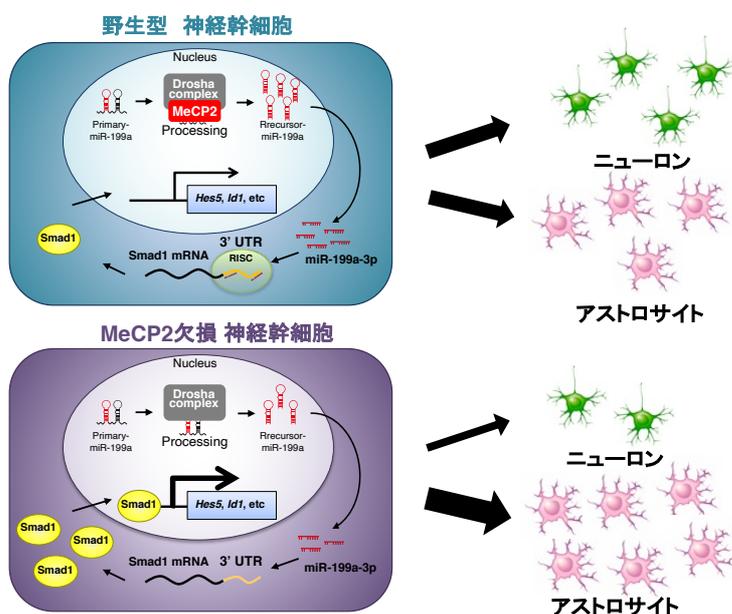


図 1. MeCP2 の miR-199a のプロセッシングを介した神経幹細胞分化制御. (上図) 野生型神経幹細胞では MeCP2 の存在により適当量の miR-199a がプロセッシングを受けて産生される。miR-199a は Smad1 mRNA を標的としその翻訳を阻害し、BMP シグナルによるニューロン分化阻害作用を適度に抑制されるため、ニューロン及びアストロサイト分化がバランス良く起きる。(下図) MeCP2 欠損神経幹細胞では、miR-199a の産生が減少しているため、BMP シグナルの亢進が起これ、アストロサイト分化が優位となる。

<引用文献>

- Chahrouh, M., and Zoghbi, H.Y. (2007). The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56, 422-437.
- Chen, R.Z., Akbarian, S., Tudor, M., and Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27, 327-331.
- Lin, E.A., Kong, L., Bai, X.H., Luan, Y., and Liu, C.J. (2009). miR-199a, a bone morphogenic protein 2-responsive MicroRNA, regulates chondrogenesis via direct targeting to Smad1. *J Biol Chem* 284, 11326-11335.
- Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Hisatsune, T., Nakafuku, M., Miyazono, K., Kishimoto, T., Kageyama, R., and Taga, T. (2001). BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5868-5873.
- Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479-482.
- Tsujimura, K., Abematsu, M., Kohyama, J., Namihira, M., and Nakashima, K. (2009). Neuronal differentiation of neural precursor cells is promoted by the methyl-CpG-binding protein MeCP2. *Exp Neurol* 219, 104-111.
- Tsujimura, K., Irie, K., Nakashima, H., Egashira, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Itoh, M., Uesaka, M., Imamura, T., Nakahata, Y., et al. (2015). miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell Rep* 12, 1887-1901.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0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 CA, Ishizu M, Uesaka M, Pan M, Noguchi H, Okada K, Aoyagi, K, Ando-Noda T, Okano H, Muotri AR, Nakashima K.	4. 巻 -
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 Rep	6. 最初と最後の頁 in press
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima H, Tsujimura K, Irie K, Ishizu M, Pan M, Kameda T, Nakashima K.	4. 巻 38
2. 論文標題 Canonical TGF- Signaling Negatively Regulates Neuronal Morphogenesis through TGIF/Smad Complex-Mediated CRMP2 Suppression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurosci	6. 最初と最後の頁 4791-4810
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2423-17.2018	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中嶋秀行、辻村啓太、中島欽一
2. 発表標題 レット症候群原因因子MeCP2のmiR-199aを介した神経幹細胞分化制御
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 レット症候群原因因子MeCP2のmiR-199aを介した神経幹細胞分化制御
3. 学会等名 NPBPPP2020合同年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 欽一
2. 発表標題 レット症候群原因因子MeCP2のマイクロRNAを介した神経幹細胞分化制御機構の解明
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 欽一
2. 発表標題 レット症候群原因因子MeCP2のmiRNAを介した神経幹細胞分化制御機構の解明
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakashima H , Tsujimura K, Irie K, Imamura T, Nakashima K
2. 発表標題 MeCP2-mediated miR-199a processing regulates fate specification of neural stem cells
3. 学会等名 Neuroscience 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋 秀行 、入江浩一郎、辻村啓太、今村拓也、石津正崇、潘森、中島 欽一
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 第17回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. NAKASHIMA, K. TSUJIMURA, K. IRIE, M. ISHIZU, M. PAN, K. NAKASHIMA
2. 発表標題 Canonical TGF- signaling negatively regulates neuronal morphogenesis through TGIF/Smad complex-mediated CRMP2 suppression
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一
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 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017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
研究協力者	中嶋 秀行 (Nakashima Hideyuki) (00835390)	九州大学・大学院医学研究院・助教 (17102)	

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