

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06484

研究課題名(和文)MECP2を起点とした精神神経疾患の共通分子病態の解明

研究課題名(英文)Elucidation of common mechanisms of MECP2 abnormal diseases

研究代表者

辻村 啓太(Tsujimura, Keita)

名古屋大学・理学研究科・特任講師

研究者番号：60588474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：MECP2遺伝子の変異や重複は、重度の脳障害を伴うレット症候群およびMECP2重複症候群をそれぞれ引き起こすだけでなく種々の精神疾患の発症にも深く関与する。本研究ではMECP2遺伝子異常による病態発症メカニズムの詳細を解明するため、レット症候群とMECP2重複症候群の両疾患モデルの取得・構築を進めてきた。MECP2重複モデルマウスを導入しバッククロスを完了した。特定Cre系統のマウスについても導入し、細胞種特異的な解析を行う準備を進めた。疾患患者細胞の表現型解析を行い表現型を確認した。ヒトとマウスの種間での比較解析の準備を完了することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は単一遺伝性疾患であるレット症候群とMECP2重複症候群の共通病態を研究することを企図した。この目的のために、レット症候群とMECP2重複症候群の両疾患モデル生物の取得と構築に取り組んだ。また、詳細な共通病態を解析するために必要な遺伝子改変マウスとプラスミドDNAを取得し、研究の遂行を進めた。疾患モデル生物の表現型を解析し、研究リソースとしての有用性を確認した。これらにより、両疾患の共通メカニズムを研究するための準備を整備することができ、本研究以外の病態解明研究にも資する成果を得た。

研究成果の概要(英文)：MECP2 gene variations cause severe developmental disorders such as Rett syndrome and MECP2 duplication syndrome. MECP2 mutations are also linked to a variety of brain developmental disorders including autism spectrum disorder (ASD), intellectual disability and seizure. Therefore, it is anticipated that elucidation of molecular pathogenesis of developmental disorders caused by MECP2 variations leads to understanding of a broad range of developmental diseases and development of novel diagnostic and therapeutic avenues. However, mechanisms of molecular pathogenesis of developmental disorders caused by MECP2 variations are unclear. To investigate common molecular mechanisms of the MECP2 abnormal diseases, we prepared and established disease models of Rett syndrome and MECP2 duplication, respectively, in this study. These research resources contribute to studies of pathophysiology of broad developmental disorders.

研究分野：分子生物学、神経科学

キーワード：発達障害 疾患メカニズム 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

レット症候群は、女兒に起こる進行性の脳障害であり、自閉スペクトラム症、知能や言語・運動能力の発達遅延、てんかん、中枢性呼吸障害等を呈する、約 10,000 人に 1 人の頻度で発症する指定難病である。その発症は、X 染色体上の単一遺伝子 MECP2 の変異により引き起こされる。さらに、この MECP2 遺伝子変異は、統合失調症や自閉スペクトラム症等の種々の精神疾患患者にも認められる。一方、MECP2 遺伝子の重複は、重度の知能・言語・運動障害などの脳障害を呈する MECP2 重複症候群を引き起こす。このように MECP2 の異常な発現や機能異常は様々な精神神経疾患の原因となることから、MECP2 異常に起因するレット症候群や MECP2 重複症候群の分子機序が解明されれば、より広範な精神神経疾患の治療法開発につながる可能性が高く、意義深い。

レット症候群の原因遺伝子産物である MeCP2 タンパク質はメチル化 DNA に結合することから、その発症は、メチル化された標的遺伝子の転写制御不全によると考えられてきた。しかし病態に直結するような標的遺伝子はこれまでに同定されていない。

一方、タンパク質キナーゼ mTOR(mechanistic target of rapamycin)は、細胞内外の環境に応じた細胞の応答調節に中心的な役割を果たしている。mTOR シグナルは様々な生理的プロセスを制御することが知られているが、その中でも特に mRNA の翻訳(タンパク質合成)が重要とされている。近年、この mTOR シグナルの制御不全が広い範囲の精神神経疾患の発症に深く関与することが示唆され、実際に精神神経疾患の病態に翻訳制御の異常が関与することが明らかにされている(Mattioli M.C. et al., 2013; Crino P.B., 2016)。最近の研究により、レット症候群の病態にも mTOR シグナルの制御不全が関与することが報告されているが(Li et al., 2013; Marchetto et al., 2010)、MeCP2 がどのように mTOR シグナルを制御しているのかは不明であった。

申請者は最近、MeCP2 が特定マイクロ RNA のプロセッシングを促進することを独自に見出し、MeCP2 の標的として miR-199a を同定した。さらに、(1)miR-199a の発現により、MeCP2 欠損ニューロンの形態異常や興奮性シナプス伝達減弱などの表現型を改善できること、(2)最終的に mTOR シグナルを活性化すること、(3)miR-199a 欠損(KO)マウスは、MeCP2 を欠損したレット症候群モデル(MeCP2KO)マウスの多くの症状を示すことを明らかにした。以上より、レット症候群の病態に MeCP2/miR-199a/mTOR シグナル経路の制御不全が重要な役割を果たしていることを示した(Tsujimura et al., Cell Rep., 2015)。

## 2. 研究の目的

本研究では MeCP2/miR-199a/mTOR シグナルの下流で制御される標的因子を同定し、レット症候群や MECP2 重複症候群を含めた広範な精神神経疾患の発症原因となる分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。そのための研究リソースの拡充を進め、随時解析を実施する。

## 3. 研究の方法

本課題では、レット症候群/MECP2 重複症候群のモデル生物を用いて異常な発現変化を示す下流共通標的を同定し、その病態における役割を明らかにする。

両疾患のモデル生物(モデル細胞とモデルマウス)を作製・入手する。現在、既にレット症候群患者モデル細胞を複数系統樹立している。MECP2 重複症候群患者の研究協力の同意を既に取得

している。MeCP2KO および MeCP2 重複マウスは既に入手・購入済みである。レット症候群患者変異を模倣したモデルマウスは独自に作製する。

作製した各疾患モデル細胞、およびモデルマウスにおいて、miR-199a/mTOR シグナル経路の制御不全やその表現型を検証する。

両疾患モデル細胞およびモデルマウス脳組織で RNA シークエンスを実施し、共通標的因子を絞り込む。同定された標的因子の機能操作により病態への寄与を評価する。

#### 4 . 研究成果

本研究では特に研究リソースの取得・収集や拡充に注力した。レット症候群モデルについては、モデルマウス (MeCP2KO マウス) を既に所有していたが、レット症候群患者モデル細胞の例数を増やす必要があり、追加樹立を実施し例数を増やした。また、ゲノム編集技術を用いてレット症候群患者変異を模倣したノックインマウスの作製に成功し、その後の繁殖にも成功した。MECP2 重複症候群モデルについては、MECP2 重複症候群モデルマウスを入手し、C57BL/6J 系統へのバッククロスを進め、10 世代以上のバッククロスを完了した。MECP2 重複症候群モデル細胞の樹立についても開始し複数の系統を樹立することができた。特定 Cre 系統マウスの取得も進め、繁殖により十分な個体数と凍結胚ストックを確保することができた。

疾患モデルの表現型解析についても実施した。独自に作製したレット症候群変異モデルマウスの脳内における mTOR シグナル異常活性の検証を行った。その結果、野生型と比較して、レット症候群変異モデルマウスの脳内においてはリン酸化リボソームプロテイン S6 陽性細胞が有意に減少していることが明らかとなった。レット症候群モデル細胞の表現型解析を行った結果、健常者細胞と比較してレット症候群モデル細胞では細胞体サイズの減少がみられた。このことは、レット症候群モデル細胞において mTOR シグナルの活性化が減少していることを示唆している。

レット症候群モデルマウス脳において発現変化を示す遺伝子の探索を実施した。野生型及びレット症候群モデルマウス脳の特長領域より RNA を抽出し、RNA シークエンスを行った。解析の結果、レット症候群モデルマウス脳特長領域において有意に発現の変化する遺伝子を同定することに成功した。

今後はレット症候群と MECP2 重複症候群において mTOR シグナル活性の評価と表現型解析を継続すると共に、遺伝子発現プロファイリングを行い共通して発現変化を示す遺伝子の特定を進める。これらの解析により最終的には MeCP2/miR-199a/mTOR シグナル下流の標的因子の同定を目指す。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Hideyuki Nakashima, Keita Tsujimura, Koichiro Irie, Masataka Ishizu, Miao Pan, Tomonori Kameda, Kinichi Nakashima          | 4. 巻<br>38              |
| 2. 論文標題<br>Canonical TGF- Signaling Negatively Regulates Neuronal Morphogenesis through TGIF/Smad Complex-Mediated CRMP2 Suppression | 5. 発行年<br>2018年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Neuroscience  | 6. 最初と最後の頁<br>4791-4810 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1523/JNEUROSCI.2423-17.2018.   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 6件/うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>辻村啓太                                  |
| 2. 発表標題<br>Rett症候群における神経回路病態の解明と治療法開発            |
| 3. 学会等名<br>「2020レット症候群とMECP2重複症候群合同」シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2020年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>辻村 啓太   |
| 2. 発表標題<br>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とその応用 |
| 3. 学会等名<br>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）           |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Keita Tsujimura   |
| 2. 発表標題<br>Regulation of functional neural circuit development by Rett syndrome causative factor MeCP2 |
| 3. 学会等名<br>The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society 第43回日本神経科学大会（招待講演）                |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>辻村啓太                                  |
| 2. 発表標題<br>治療法開発とMRI研究                           |
| 3. 学会等名<br>2021 レット症候群とMECP2重複症候群合同シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Keita Tsujimura   |
| 2. 発表標題<br>Regulation of neuronal development by Rett syndrome causative gene MeCP2                              |
| 3. 学会等名<br>The 14th Annual Meeting for Japanese Developmental Neuroscientists Korea Japan Joint Symposium (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>辻村啓太                               |
| 2. 発表標題<br>発達障害の脳細胞系譜病態と神経幹細胞運命決定機構           |
| 3. 学会等名<br>若手新分野創成ワークショップ「脳を知り、疾患を理解する」(招待講演) |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

〔図書〕 計1件

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Keita Tsujimura and Nakashima Kinichi | 4. 発行年<br>2018年 |
| 2. 出版社<br>Springer International Publishing     | 5. 総ページ数<br>15  |
| 3. 書名<br>Rett syndrome and stem cell research   |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  |                           |                       |    |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|