

令和 7 年 6 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2024

課題番号：22K15201

研究課題名（和文）内在性DNAリガンドによる脳内免疫担当細胞を介したレット症候群発症の分子病態解明

研究課題名（英文）Molecular pathogenesis of Rett syndrome by brain immune cells via endogenous DNA ligands

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：MECP2遺伝子変異は、Rett症候群(RTT)をはじめ、自閉症など様々な精神疾患・発達障害への関与が示唆されているが、その発症機序の詳細は不明である。本研究では、「レトロトランスポゾン（L1）由来のcDNAによりグリア細胞の異常な活性化が引き起こされる」との仮説のもと、遺伝子欠損マウスの行動解析やグリア機能性分子の探索・同定を行った。その結果、L1由来のcDNAの産生を阻害することでMeCP2欠損マウスでのRTT様の行動表現型が改善することがわかった。また、L1由来のcDNAの産生を阻害することでグリア細胞の異常な活性化やニューロンの形態異常が改善することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MeCP2はその発見の経緯からメチル化DNA結合性の転写抑制因子として考えられ、DNAメチル化と精神疾患・神経発達障害を結びつける分子として世界中で研究が行われてきた。しかしながら、RTT患者やMeCP2欠損マウス脳を用いたトランスクリプトーム解析では、転写レベルにおける有意な遺伝子発現変化は確認されておらず、RTTの特徴的な表現型と直接結びつくような標的遺伝子の発現異常は現在までに明らかとなっていない。そのため、レトロトランスポゾン由来cDNAに着目した本研究成果は、RTTの新規な分子病態理解につながると同時に、治療法開発においても重要な手がかりとなる可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：Mutations in the MECP2 gene have been implicated in a variety of neuropsychiatric and developmental disorders, including Rett syndrome (RTT) and autism, although the precise mechanisms underlying these conditions remain unclear. In this study, we tested the hypothesis that aberrant activation of glial cells is induced by cDNA derived from the retrotransposon LINE-1 (L1). To evaluate this, we performed behavioral assessments in MECP2-KO mice and conducted a comprehensive analysis to identify functional molecules involved in glial cell activity. As a result, we found that inhibiting the production of L1-cDNA ameliorated RTT-like behavioral phenotypes in MeCP2-KO mice. Furthermore, inhibition of L1-cDNA production also improved the aberrant activation of glial cells and neuronal morphological abnormalities.

研究分野：神経科学

キーワード：レット症候群 MeCP2 レトロトランスポゾン ミクログリア

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おり、その病態発症メカニズムの解明が急務となっている。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 (Neniskyte and Gross. *Nat Rev Neurosci* 2017)。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から (Chen et al. *Nat Genet* 2001)、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。この様な状況の中、申請者は MeCP2 欠損脳ではミクログリアが異常に活性化していることを見出した。ミクログリアは活性化すると神経栄養因子を生産する一方、炎症性サイトカインを産生することが知られており、神経保護と神経障害の二面性を持つ。しかしながら、MeCP2 欠損脳でミクログリアが異常に活性化している原因は何か、またミクログリアの活性化が RTT 病態発症に寄与しているかについては明らかになっていない。

MeCP2 はメチル化 DNA 結合性の転写抑制因子として同定され、その後、神経幹（前駆）細胞及びニューロンで特異的にレトロトランスポゾン LINE1 (L1) の遺伝子発現を抑制することが報告された (Muotri et al. *Nature* 2010)。RTT 患者の死後脳において

も L1 の発現亢進が報告され、L1 が脳発達関連ゲノム部位に転移しその遺伝子の発現異常を引き起こすことが RTT 病態発症の一因になり得ると考えられてきた。しかし、L1 の転移はほぼランダムと想定されており、またその頻度も低いため、少数の細胞個々の性質への影響は説明できるものの、RTT 病態発症に及ぼす影響は説明できていない。近年、L1-mRNA から逆転写された L1-cDNA が機能性分子として作用することで炎症反応を引き起こすことが報告された (Cecco et al. *Nature* 2019)。そこで申請者は、MeCP2 欠損脳では MeCP2 欠損細胞から分泌される L1-cDNA が内因性リガンドとなることで、近接するミクログリアで DNA センサーである TLR9 のシグナル活性化を誘導し、それにより慢性的な炎症が引き起こされるという新規病態発症メカニズムを着想した。

2. 研究の目的

本研究では、ミクログリア活性化責任細胞の同定、遺伝子欠損マウスの行動・組織学的解析、ミクログリア機能性分子の探索・同定を行うことで、DNA センサーである 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。また、そのメカニズムに基づき、L1 の逆転写を阻害する薬剤 (3TC) を MeCP2 欠損マウスに投与し、効果を検証しつつ RTT 病状改善法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) L1 を発現するミクログリア活性化責任細胞の同定

野生型 (WT)、MeCP2 欠損マウス脳から神経系細胞 (ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、神経幹/前駆細胞及びミクログリア) を単離・培養し、RT-PCR にて L1 異常発現細胞を同定する。

(2) TLR9 シグナルの減少による MeCP2 欠損マウスにおける RTT 病態の回復評価

TLR9/MeCP2 ダブル欠損マウスにおいて MeCP2 欠損によるミクログリアの活性化や寿命短縮以外の表現型が改善されるかどうかを、行動及び組織学的評価を行い検討する。

(3) ミクログリア機能性分子の同定

野生型、MeCP2 欠損、TLR9/MeCP2 二重欠損マウスからミクログリアを単離しシングルセル RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現を網羅的に解析する。

(4) RTT 病態改善法の開発

MeCP2 欠損マウスに逆転写酵素阻害剤である 3TC を投与し、MeCP2 欠損表現型の回復効果が見られるかどうかを評価することで RTT 病態改善法の開発を行う。

4. 研究成果

(1) WT、MeCP2 欠損マウス脳から神経系細胞（ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、神経幹/前駆細胞及びミクログリア）を単離・培養し、RT-PCR にて L1 の発現量を測定したところ、MeCP2 欠損ニューロン、アストロサイト、神経幹/前駆細胞が WT と比較して L1 の発現が増加していることが明らかとなった。

(2) 社会性を評価するスリーチャンバーテストや記憶形成を評価する恐怖条件付けテストを行った結果、MeCP2 欠損マウスと比較し、TLR9/MeCP2 ダブル欠損マウスは社会性や記憶形成の異常が改善することが明らかとなった。

(3) 野生型、MeCP2 欠損、TLR9/MeCP2 二重欠損マウスからミクログリアを単離し、シングルセル RNA-seq 解析を行った。その結果、MeCP2 欠損ミクログリアと比較して、TLR9/MeCP2 二重欠損ミクログリアでは炎症性サイトカインの発現が減少していることがわかった。

(4) MeCP2 欠損マウスに逆転写酵素阻害剤である 3TC を投与した結果、MeCP2 欠損マウスで観察される RTT 様の表現型が改善することが明らかとなった。

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mesci Pinar, LaRock Christopher N, Jeziorski Jacob J, Nakashima Hideyuki, Chermont Natalia, Ferrasa Adriano, Herai Roberto H, Ozaki Tomoka, Saleh Aurian, Snethlage Cedric E, Sanchez Sandra, Goldberg Gabriela, Trujillo Cleber A, Nakashima Kinichi, Nizet Victor, Muotri Alysson R.	4. 巻 19
2. 論文標題 Human microglial cells as a therapeutic target in a neurodevelopmental disease model	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1074 ~ 1091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2024.06.013	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

1. 著者名 Kunoh Shu, Nakashima Hideyuki, Nakashima Kinichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Epigenetic Regulation of Neural Stem Cells in Developmental and Adult Stages	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Epigenomes	6. 最初と最後の頁 22 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/epigenomes8020022	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 青柳圭、中嶋秀行、中島欽一
2. 発表標題 内在性DNAリガンドによる正常脳発達制御とその自閉スペクトラム症様病態への関与
3. 学会等名 第18回神経発生討論会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中嶋秀行、青柳圭、中島欽一
2. 発表標題 正常脳発達に必須な逆転写酵素を介した新規神経系細胞制御機構
3. 学会等名 Neuro2024
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中嶋秀行
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ト症候群発症機構
3. 学会等名 第16回エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋秀行、渡邊紗羽、中嶋欽一
2. 発表標題 レット症候群の新規病態発症機序の解明と治療法の開発
3. 学会等名 日本科学振興協会 年次大会2023 「会いに行ける科学者フェス」
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋秀行、中嶋欽一
2. 発表標題 内在性DNAによるミクログリア活性化を介したレット症候群発症機構
3. 学会等名 第96回日本生化学大会（招待講演）
4. 発表年 2023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ト症候群発症の可能性
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideyuki Nakashima, Kinichi Nakashima
2. 発表標題 Possible involvement of endogenous DNA-induced microglial activation in the pathogenesis of Rett syndrome
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋秀行、松田あかね、本庄雅則、岡内辰夫、藤野武彦、中島欽一
2. 発表標題 プラズマローゲン誘導体を用いたレット症候群治療法の開発
3. 学会等名 第 9 回 一般社団法人プラズマローゲン研究会 研究発表会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hideyuki Nakashima, Kinichi Nakashima
2. 発表標題 Possible involvement of endogenous DNA-induced microglial activation in the pathogenesis of Rett syndrome
3. 学会等名 第16回神経発生討論会
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

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